

Résumé

Le succès de la reproduction humaine dépend du bon fonctionnement de l'appareil génital masculin et féminin. Un dysfonctionnement d'un organe génital conduit soit à une infertilité, une fausse couche ou à la naissance d'un nouveau-né avec une anomalie de développement. Cette thèse de doctorat vise à approfondir nos connaissances dans la génétique de la reproduction humaine en trois parties. La première partie consiste à déterminer la nature et la fréquence des anomalies chromosomiques chez les couples avec des fausses couches spontanées à répétition, chez des patients présentant une ambiguïté génitale, une aménorrhée et un phénotype de Turner qui ont été référés au département de cytogénétique-IPM entre 1996 et 2016. L'analyse de caryotype a été réalisée selon la méthode standard. La deuxième partie consiste à identifier des nouveaux gènes et/ou mutations génétiques impliqués (es) dans l'apparition d'une anomalie du développement sexuel en utilisant la nouvelle génération de séquençage. La troisième partie consiste à déterminer les variants faux-sens les plus délétères du gène PIWIL1 et leurs impacts sur la structure, la stabilité, la flexibilité et la dimension du domaine PAZ en utilisant la modélisation moléculaire et la simulation de la dynamique moléculaire. Ainsi, nous avons identifié que 23,20% des patients avec un phénotype de Turner, 17,39% des patients avec aménorrhée, 11% des couples avec des fausses couches spontanées à répétition et 7,13% des patients avec ambiguïté génitale ont une anomalie chromosomique. Après le regroupement des résultats de 27 études sur les fausses couches spontanées à répétition, nous avons constaté que 5,16% des patients ont une anomalie chromosomique. L'analyse de l'exome de 3 patients marocains atteints de différents phénotypes d'anomalie du développement sexuel a révélé la présence d'une nouvelle mutation au niveau du gène HSD3B2 chez un patient avec hypospadias périnéal et avec un taux élevé de 17 α -hydroxyprogestérone, déhydroépiandrostérone, AMH, testostérone, rénine et androstènedione. L'étude in silico des polymorphismes du gène PIWIL1 a permis d'identifier 18 variants faux-sens comme délétères dont 11 variants touchant des acides aminés hautement conservés. L'étude de l'impact des variants localisés dans la région qui code pour le domaine PAZ sur ce dernier a révélé que les variants G305S, Y317C et Y346C affectent, avec des niveaux différents, la stabilité, la flexibilité et la dimension globale du domaine PAZ.

Abstract

The success of human reproduction depends on the good function of male and female genitalia. A dysfunction of a genital organ leads to either infertility, miscarriage or developmental abnormality. This doctoral thesis aims to deepen our knowledge in the genetics of human reproduction by determining: 1) The nature and frequency of chromosomal abnormalities in couples with recurrent spontaneous miscarriages, in patients with genital ambiguity, amenorrhea, and a Turner phenotype who were referred to the cytogenetic department, Pasteur Institute of Morocco between 1996 and 2016. Cytogenetic analysis was performed according to the standard method. 2) The new genes and / or genetic mutations involved in disorder of sex development using the next generation sequencing. 3) The most deleterious nsSNPs of PIWIL1 gene and their impacts on the structure, stability, flexibility and dimension of the PAZ domain by in silico study. Thus, we have identified that 23.20% of patients with a Turner's phenotype, 17.39% of patients with amenorrhea, 11% of couples with recurrent spontaneous miscarriages and 7.13% of patients with ambiguous genitalia have a chromosomal abnormality. After regrouping the results of 27 studies on recurrent spontaneous miscarriages, we found that 5.16% of patients have a chromosomal abnormality. The exome analysis of 3 Moroccan patients with different phenotypes of disorder of sex development revealed the presence of a new mutation in the HSD3B2 gene in one patient with perineal hypospadias, and a high level of testosterone, 17 α -hydroxyprogesterone, dehydroepiandrosterone, AMH, renin and androstenedione. Using in silico analyses, we identified 18 deleterious missense variants of PIWIL1 gene including 11 variants involving highly conserved amino acids. The study of the impact of the variants, located in the region which codes for the PAZ domain, revealed that the variants G305S, Y317C and Y346C affect, with different levels, the stability, the flexibility and the global dimension of the PAZ domain.



Université Hassan 1^{er}
Centre d'Études Doctorales



Faculté des Sciences et Techniques
Settat

THÈSE DE DOCTORAT

Pour l'obtention de grade de Docteur en Génétique humaine et biologie moléculaire

Formation Doctorale : Biologie, Santé et Environnement

Spécialité : Génétique humaine et biologie moléculaire

Sous le thème

**Les anomalies de la reproduction chez l'homme :
Etude Cytogénétique, Génomique et Bioinformatique**

Présentée par :

Zouhair ELKARHAT

Soutenu le : 12/12/2020

A la Faculté des Sciences et Techniques de Settat devant le jury composé de :

Pr. Abderraouf HILALI	PES, Université Hassan 1er- ISSS, Settat	Président
Pr. Jamila ELBAGHDADI	PES, Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V, Rabat	Rapporteur
Pr. Abderrahim MALKI	PES, Université HassanII - FS Ben Msik, Casablanca	Rapporteur
Pr. Aziz BAIDANI	PH, Université Hassan 1er- FST, Settat	Rapporteur
Pr. Abdel Khalid ESSAMADI	PES, Université Hassan 1er- FST, Settat	Examineur
Dr. Hassan ROUBA	Directeur de Recherches, Institut Pasteur, Casablanca	Co-Directeur de Thèse
Pr. Boubker NASSER	PES, Université Hassan 1er- FST, Settat	Directeur de Thèse

Année Universitaire : 2020/2021

Zouhair ELKARHAT

Les anomalies de la reproduction chez l'homme : Etude Cytogénétique,
Génomique et Bioinformatique

2020,
Biologie, Santé et Environnement



À MES PARENTS RACHID ET KHADIJA
À MON FRÈRE WADII ET SA FEMME SAFAA
À MON NEVEU LABIB
À MES DEUX SOEURS GHITA ET YASMINE
À MA GRANDE FAMILLE ET À TOUS MES AMIS (ES)



REMERCIEMENT

Cette thèse est l'aboutissement d'un long travail encadré et soutenu par plusieurs personnes à qui je tiens à dire sincèrement et profondément Merci.

Mes remerciements vont en premier lieu au **Dr. Hassan ROUBA**, Chef du Laboratoire de Génomique et Génétique Humaine à l'Institut Pasteur du Maroc (IPM), pour m'avoir accordé l'opportunité de travailler, au sein de son équipe, sur le projet principal du laboratoire "Infertilité et anomalies de développement sexuel", de m'avoir guidé dans les travaux de recherche qui ont abouti à la réalisation de ce manuscrit et d'avoir mis à ma disposition tout ce qui m'a été nécessaire à l'accomplissement de ces études. Mes vifs remerciements pour sa simplicité, ses qualités humaines, son accompagnement, ses précieuses recommandations et ses corrections.

Toutes mes gratitude et mes remerciements sont adressé à mon Directeur de thèse **Pr. Boubker NASSER**, Professeur et Vice-Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération à la Faculté des Sciences et Techniques de Settat, pour son encadrement, sa grande disponibilité, ses précieux conseils, sa patience, ses encouragements, ses corrections et ses directives.

Je souhaite remercier chaleureusement le **Dr. Abdelhamid BARAKAT**, responsable du laboratoire de Génomique et Génétique Humaine, pour son accompagnement et son encadrement. Il a veillé à ce que je passe ma période de thèse dans les meilleures conditions possible. Merci Infiniment.

Je remercie également **Pr. Abderraouf HILALI**, Directeur de l'Institut Supérieur des Sciences de la Santé, pour son encadrement, son accompagnement, ses conseils et pour avoir accepté de présider cette thèse.

Mes vives reconnaissances et mon profond respect aux rapporteurs de cette thèse, **Pr. Jamila ELBAGHDADI** de l'Hôpital militaire d'instruction Mohammed V, Rabat, **Pr. Abderrahim MALKI** de la Faculté des Sciences Ben Msik, Casablanca et **Pr. Aziz BAIDANI** de la Faculté des Sciences et Techniques de Settat pour avoir accepté de rapporter ce travail de thèse, pour l'intérêt qu'ils y ont apporté et pour leurs conseils avisés.

Mes remerciements vont également au **Pr. Abdel Khalid ESSAMADI** de la Faculté des Sciences et Techniques de Settat, d'avoir accepté d'examiner mon travail. Vous trouvez ici l'expression de toute ma gratitude de m'avoir fait l'honneur de participer au jury de cette thèse.

De même, je ne manquerai pas de remercier le **Dr. Sanaa NASSEREDDINE**, responsable du laboratoire de Cytogénétique à l'IPM, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et pour

REMERCIEMENT

l'intérêt et la collaboration qu'elle a porté pour ce travail. Je remercie également toute l'équipe de cytogénétique : Jamila ABOULFARAJ, Latifa RAZOKI et Lunda ZAROUF.

Je dois aussi une grande reconnaissance au **Dr. Kenneth MCELREAVEY**, responsable du laboratoire de Génétique du Développement Humain, et au **Dr. Anu BASHAMBOO**, directrice de recherche à l'Institut Pasteur Paris. Je les remercie pour leur sympathie, leur collaboration, leur aide, leurs conseils et discussions stimulantes que j'ai l'honneur de recevoir.

Je remercie également **Dr. Guy LENAERS**, Directeur de l'équipe MitoLab, Institut MitoVasc, Université d'Angers, d'avoir accepté de m'accueillir au sein de son laboratoire pour effectuer un stage de recherche. Un stage qui m'a permis de découvrir un environnement de travail de haut niveau et d'acquérir des connaissances et des compétences liées à l'utilisation des techniques de biologie de dernières générations.

Mes remerciements vont également à **toute l'équipe MitoLab de l'Institut Mitovasc, Université d'Angers**, qui m'ont bien accueillie parmi eux et qui ont veillé de loin et de près sur le bon déroulement de ma période de stage.

Mes remerciements vont aussi à toutes les personnes qui m'ont aidé d'une façon ou d'une autre, qu'il s'agisse de la fourniture d'informations précieuses, de documents, de produits, de conseils, d'assistance technique ou d'explications.

Parmi ces personnes Dr. Halima NAHILI, Dr Hicham CHAROUTE, chercheurs à l'IPM, Mr. Abdellatif ERROUAGUI, Ingénieur d'état au même laboratoire, Dr Yassine NAASSE, chercheur au CHU Marrakech, Dr Zineb KINDIL, Dr Sara SALIM, Pr Amal BOUSFIHA ainsi que tous mes collègues Soukaina ELRHARCHI, Boutaina BELKADY, Imane MORJANE, Ghita AMALOU, Lamiae ELKHATTABI, Aymen BOUZIDI, Al-Mehdi KRAMI, soukaina ESSADSSI et Francis CAREY.

Enfin, je remercie toutes les personnes qui ont rendu ce travail possible : famille, collègues et amis (es), si j'en suis arrivé là, c'est bien grâce à vous. Recevez toutes mes admirations pour votre soutien constant.

LISTE DES PUBLICATIONS

1. **Elkarhat Z**, Kindil Z, Zarouf L, Razoki L, Aboulfaraj J, Elbakay C, Nasserredine S, Nasser B, Barakat A, Rouba H. **2018**. Chromosomal abnormalities in couples with recurrent spontaneous miscarriage: a 21-year retrospective study, a report of a novel insertion, and a literature review. *J. Assist. Reprod. Genet.*
2. Belkady B, Elkhatabi L, **Elkarhat Z**, Zarouf L, Razoki L, Aboulfaraj J, Nasserredine S, Cadi R, Rouba H, Barakat A. **2018**. Chromosomal Abnormalities in Patients with Intellectual Disability: A 21-Year Retrospective Study. *Hum. Hered.* 83: 274–282.
3. **Elkarhat Z**, Belkady B, Charoute H, Zarouf L, Razoki L, Aboulfaraj J, Nasserredine S, Elbakay C, Nasser B, Barakat A, Rouba H. **2019**. Cytogenetic profile of patients with clinical spectrum of ambiguous genitalia, amenorrhea, and Turner phenotype: A 21-year single-center experience. *Am. J. Med. Genet. A.* 179: 1516–1524.
4. Elkhatabi L, Morjane I, Charoute H, Amghar S, Bouafi H, **Elkarhat Z**, Saile R, Rouba H, Barakat A. **2019**. In Silico Analysis of Coding/Noncoding SNPs of Human RETN Gene and Characterization of Their Impact on Resistin Stability and Structure. *J. Diabetes Res.* 2019: 4951627.
5. **Elkarhat Z**, Elkhatabi L, Charoute H, Morjane I, Errouagui A, Carey F, Nasser B, Barakat A, Rouba H. **2019**. Identification of deleterious missense variants of human Piwi like RNA-mediated gene silencing 1 gene and their impact on PAZ domain structure, stability, flexibility and dimension: in silico analysis. *J. Biomol. Struct. Dyn.*: 1–7.
6. Essadssi S, Krami AM, Elkhatabi L, **Elkarhat Z**, Amalou G, Abdelghaffar H, Rouba H, Barakat A. **2019**. Computational Analysis of nsSNPs of ADA Gene in Severe Combined Immunodeficiency Using Molecular Modeling and Dynamics Simulation. *J. Immunol. Res.* 2019: 5902391.
7. Al Mehdi K, Fouad B, **Zouhair E**, Boutaina B, Yassine N, Chaimaa AEC, Najat S, Hassan R, Rachida R, Abdelhamid B, Halima N. **2019**. Molecular Modelling and Dynamics Study of nsSNP in STXBP1 Gene in Early Infantile Epileptic Encephalopathy Disease. *BioMed Res. Int.* 2019 : 4872101.
8. Ait El Cadi, C., Krami, A. M., Charoute, H., **Elkarhat, Z.**, Sifeddine, N., Lakhari, H., Rouba, H., Barakat, A., & Nahili, H. **2020**. Prediction of the Impact of Deleterious Nonsynonymous Single Nucleotide Polymorphisms on the Human RRM2B Gene: A Molecular Modeling Study. *BioMed research international*, 7614634.

LISTE DES PUBLICATIONS

9. **Elkarhat, Z.**, Charoute, H., Elkhatabi, L., Barakat, A., & Rouba, H. **2020**. Potential inhibitors of SARS-cov-2 RNA dependent RNA polymerase protein: molecular docking, molecular dynamics simulations and MM-PBSA analyses. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, 1–14.
10. **Elkarhat Z** et al. (**En cours**). New homozygous missense mutation of *HSD3B2* gene cause disorder of sex development in 46,XY patient.

LISTE DES COMMUNICATIONS

Communication orale :

1. **Elkarhat Z**, Belkady B, Charoute H, Zarouf L, Razoki L, Aboulfaraj J, Nassereddine S, Elbakay C, Nasser B, Barakat A, Rouba H. Les anomalies chromosomiques identifiées chez des patients marocains atteints d'une anomalie de développement sexuel. Journées scientifiques de Pédagogie, Recherche et Santé. Faculté de Médecine Dentaire de Casablanca-Maroc (26 et 27 avril 2018).

Communications affichées :

1. **Elkarhat Z**, Nasser B, Hilali A, Barakat A and Rouba H. Screening for the most common CFTR mutations (F508del, G542X, G551D, W1282X) in Moroccan men with idiopathic azoospermia. Colloque International Substances Naturelles : Stress et métabolisme cellulaires. Faculté des Sciences et Techniques de Settat-Maroc (le 15 et le 16 novembre 2016).
2. **Elkarhat Z**, Charoute H, Zarouf L, Razoki L, Aboulfaraj J, Nassereddine S, Nasser B, Barakat A, Rouba H. Types et fréquences des anomalies chromosomiques identifiées chez des filles marocaines atteintes d'une aménorrhée primaire. 9èmes Assises de Génétique Humaine et Médicale- Nantes, France (du 24 au 26 janvier 2018).
3. **Elkarhat Z**, Charoute H, Zarouf L, Razoki L, Aboulfaraj J, Nassereddine S, Nasser B, Barakat A, Rouba H. Etude rétrospective sur les anomalies chromosomiques identifiées chez des patients marocains atteints d'une anomalie de développement sexuel. 9èmes Assises de Génétique Humaine et Médicale- Nantes, France (du 24 au 26 janvier 2018).
4. **Elkarhat Z**, Charoute H, Zarouf L, Razoki L, Aboulfaraj J, Nassereddine S, Nasser B, Barakat A, Rouba H. 2018. Analyses chromosomiques des couples ayant subi des avortements spontanés récurrents. 9èmes Assises de Génétique Humaine et Médicale- Nantes, France (du 24 au 26 janvier 2018).
5. **Elkarhat Z**, Belkady B. Charoute H, Zarouf L, Razoki L, Aboulfaraj J, Nassereddine S, Nasser B, Barakat A, Rouba H. Types et fréquences des anomalies chromosomiques identifiées chez des filles marocaines atteintes d'une aménorrhée primaire. Journées scientifiques de Pédagogie, Recherche et Santé. Faculté de Médecine Dentaire de Casablanca (26 et 27 avril 2018)
6. **Elkarhat Z**, Belkady B. Charoute H, Zarouf L, Razoki L, Aboulfaraj J, Nassereddine S, Nasser B, Barakat A, Rouba H. Cytogenetic profile of Moroccan couples with Recurrent Spontaneous Miscarriage. Journées scientifiques de Pédagogie, Recherche et Santé. Faculté de Médecine Dentaire de Casablanca-Maroc (26 et 27 avril 2018).

LISTE DES COMMUNICATIONS

7. **Elkarhat Z**, Belkady B, Charoute H, Zarouf L, Razoki L, Aboulfaraj J, Nassereddine S, Nasser B, Barakat A, Rouba H. Chromosomal abnormalities in Moroccan patients with Hypospadias. Journées scientifiques de Pédagogie, Recherche et Santé. Faculté de Médecine Dentaire de Casablanca-Maroc (26 et 27 avril 2018).

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENT	3
LISTE DES PUBLICATIONS	5
LISTE DES COMMUNICATIONS	7
LISTES DES FIGURES ET DES TABLEAUX	11
PRINCIPALES ABRÉVIATIONS	13
RÉSUMÉ	14
ABSTRACT	15
INTRODUCTION	16
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	18
1. La gamétogenèse	18
1.1. La spermatogenèse	18
1.2. L'ovogenèse, la folliculogenèse et l'ovulation	24
1.3. La régulation épigénétique des ET dans la lignée germinale	30
2. Le développement des appareils génitaux	37
2.1. Le développement d'un appareil génital indifférencié	37
2.2. Le développement de l'appareil génital masculin	40
2.3. Le développement de l'appareil génital féminin	45
3. Les fausses couches spontanées à répétition	48
3.1. Les facteurs cytogénétiques	49
3.2. Les facteurs anatomiques, immunologiques, endocriniens, infectieux et environnementaux	52
4. Les anomalies de développement sexuel (DSD)	53
4.1. Chromosome DSD	53
4.2. DSD 46,XY	60
4.3. DSD 46,XX	71
MATÉRIELS ET MÉTHODES	77
1. Patients	77
1.1. Cohorte des couples avec FCSR	77
1.2. Cohorte des patients avec une ambiguïté génitale, une aménorrhée et un phénotype de Turner	77
1.3. Cohorte des patients DSD	77
1.4. Conformité et éthique	77
2. Analyse cytogénétique conventionnelle	77
3. Analyse génétique moléculaire	78
3.1. Extraction de l'ADN	78

TABLE DES MATIERES

3.2. Identification de nouvelles mutations chez les patients DSD	79
4. Analyse bio-informatique	81
4.1. Récupération du jeu de données	81
4.2. Identification des variants les plus délétères	81
4.3. Analyse de conservation.....	82
4.4. Structure tridimensionnelle du domaine PAZ de la protéine PIWIL1	83
4.5. Analyse des changements de structures locales	83
4.6. Simulation de la dynamique moléculaire	83
5. Analyse statistique.....	84
RESULTATS ET DISCUSSION.....	85
Chapitre 1 : Nature et fréquence des anomalies chromosomiques chez des couples ayant subi des fausses couches spontanées à répétition	85
1. Introduction	85
2. Article 1	86
3. Résultats et Discussion.....	96
4. Conclusion.....	99
Chapitre 2 : Profile cytogénétique des patients présentant une ambiguïté génitale, une aménorrhée et un phénotype de Turner	100
1. Introduction	100
2. Article 2.....	101
3. Résultats et Discussion.....	111
4. Conclusion.....	114
Chapitre 3 : Identification d'une nouvelle mutation chez un patient DSD avec le séquençage d'exome complet.....	115
1. Introduction	115
2. Article 3.....	115
3. Résultats et Discussion.....	128
4. Conclusion.....	129
Chapitre 4 : Identification des nsSNPs les plus délétères du gène PIWIL1 et leur impact sur la structure, la stabilité, la flexibilité et la dimension du domaine PAZ : Analyse in silico.....	130
1. Introduction	130
2. Article 4.....	131
3. Résultats et Discussion.....	139
4. Conclusion.....	141
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	142
RÉFÉRENCES	144

LISTES DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Liste des Figures

Figure 1: Appareil génital masculin	18
Figure 2: Étapes de la spermatogenèse et de la spermiogenèse	19
Figure 3: Représentation schématique de la mitose et la méiose des cellules humaines	20
Figure 4: Spermiogenèse dans les testicules humains.....	21
Figure 5: Représentation schématique des principales régulations hormonales de la spermatogenèse	23
Figure 6: Schéma de l'ovaire représentant le follicule et l'ovocyte en développement dans le cortex ovarien.....	24
Figure 7: Etapes de l'ovogenèse	25
Figure 8: Différents stage de maturation ovocytaire	26
Figure 9: Illustration séquentielle de la folliculogenèse dans l'ovaire humain	27
Figure 10: Les mécanismes de transposition des deux classes d'éléments transposables	31
Figure 11: La famille des protéines Argonautes	32
Figure 12: Schéma représentant les petits ARN interférents, leurs protéines partenaires de la famille Argonaute, leurs complexes RISC et leurs gènes cibles.....	33
Figure 13: Mécanisme primaire et secondaire de la production des piARN	35
Figure 14: Le mode de régulation épigénétique des éléments transposables par la voie PIWI-piARN	36
Figure 15: Schéma illustrant la différenciation des organes génitaux masculins et féminins.....	37
Figure 16: Embryologie des gonades	38
Figure 17: Schéma illustrant les gènes impliqués dans la différenciation de la gonade bipotentielle.....	39
Figure 18: Migration testiculaire chez le fœtus mâle.....	41
Figure 19: Schéma illustrant les gènes impliqués dans la migration testiculaire.....	42
Figure 20: Différenciation des organes génitaux externes chez l'homme	44
Figure 21: Schéma illustrant les gènes impliqués dans la différenciation des organes génitaux masculins et féminins	46
Figure 22: Développement des organes génitaux internes chez la femme	48
Figure 23: Anomalies chromosomiques au cours de la méiose 1 et 2	50
Figure 24: Anomalies chromosomiques de structure	51
Figure 25: Non-disjonction paternelle en méiose I conduit au syndrome de Klinefelter 47,XXY	54

LISTES DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 26: Non-disjonction paternelle en méiose II conduit au syndrome de Turner 45,X.....	55
Figure 27: Organes génitaux externes d'un patient 45,X/46,XY.....	57
Figure 28: Voie de la biosynthèse des stéroïdes et défauts de la stéroïdogénèse.....	62
Figure 29: Organes génitaux externes d'un patient 46,XY avec une déficience en 5-alpha réductase.....	68
Figure 30: Organes génitaux externes des 2 patients 46,XY avec une insensibilité partielle aux androgènes.....	69
Figure 31: Cas d'une famille marocaine avec deux enfants atteints d'une anomalie de développement sexuel et keroderma palmoplantaire	74
Figure 32: Méthode de détermination de degré de virilisation de Prader	75

Liste des Tableaux

Tableau 1: Exemple d'un système de classification des anomalies de développement sexuel.....	54
Tableau 2: Liste des gènes (non exhaustive) impliquées dans la survenue des troubles du développement testiculaire chez des patients 46,XY	61
Tableau 3: Liste des gènes (non exhaustive) impliquées dans la survenue des troubles de la synthèse ou de l'action hormonale.....	64
Tableau 4: Liste des gènes (non exhaustive) impliquées dans la survenue des troubles du développement ovarien et de l'excès d'androgène	72
Tableau 5: Description des outils de prédiction computationnelle utilisés dans la présente étude	82

PRINCIPALES ABRÉVIATIONS

3β-HSD	3 β -Hydroxystéroïde Déshydrogénase
AC	Anomalie chromosomique
ACTH	Hormone adrénocorticotrope
ADAM	A disintegrin and metalloprotease
AG	Ambiguïté génitale
AGO3	Argonaute 3
AMH	Hormone anti-mullerienne
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
CBX2	Chromobox homolog 2
ddNTP	Didésoxyribonucléotide
DHEA	Déhydroépiandrostérone
DM	Dynamique moléculaire
DSD	Anomalies de développement sexuelle
ET	Éléments transposables
FSH	Hormone folliculo-stimulante
FST	Follistatine
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
HCLS	Hyperplasie congénitale lipoïde des surrénales
IGF I	Facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline
IPM	Institut Pasteur du Maroc
INSL3	Insulin-like 3
KO	Knock-out
LH	Hormone lutéinisante
MAP3K1	Protéine activée par un mitogène Kinase Kinase Kinase-1
NGS	Nouvelle génération de séquençage
nsSNP	Polymorphismes non synonymes
OGE	Organes génitaux externes
PC	Produits de conception
PCR	Réaction de polymérisation en chaine
piARN	ARN interagissant avec les protéines Piwi
PMDS	Syndrome de persistance des canaux de Müller
PIWIL1	Piwi like RNA-mediated gene silencing 1
RSPO1	R-spondin 1
SRY	Région déterminante du sexe
ST	Syndrome de Turner
WES	Whole exome sequencing
WT1	Wilm's tumor 1
WT-PAZ	Domaine PAZ native

RÉSUMÉ

Le succès de la reproduction humaine dépend du bon fonctionnement de l'appareil génital masculin et féminin. Un dysfonctionnement d'un organe génital conduit soit à une infertilité, une fausse couche ou à la naissance d'un nouveau-né avec une anomalie de développement. Cette thèse de doctorat vise à approfondir nos connaissances dans la génétique de la reproduction humaine en trois parties. La première partie consiste à déterminer la nature et la fréquence des anomalies chromosomiques chez les couples avec des fausses couches spontanées à répétition, chez des patients présentant une ambiguïté génitale, une aménorrhée et un phénotype de Turner qui ont été référés au département de cytogénétique-IPM entre 1996 et 2016. L'analyse de caryotype a été réalisée selon la méthode standard. La deuxième partie consiste à identifier des nouveaux gènes et/ou mutations génétiques impliqués (es) dans l'apparition d'une anomalie du développement sexuel en utilisant la nouvelle génération de séquençage. La troisième partie consiste à déterminer les variants faux-sens les plus délétères du gène *PIWILI* et leurs impacts sur la structure, la stabilité, la flexibilité et la dimension du domaine PAZ en utilisant la modélisation moléculaire et la simulation de la dynamique moléculaire. Ainsi, nous avons identifié que 23,20% des patients avec un phénotype de Turner, 17,39% des patients avec aménorrhée, 11% des couples avec des fausses couches spontanées à répétition et 7,13% des patients avec ambiguïté génitale ont une anomalie chromosomique. Après le regroupement des résultats de 27 études sur les fausses couches spontanées à répétition, nous avons constaté que 5,16% des patients ont une anomalie chromosomique. L'analyse de l'exome de 3 patients marocains atteints de différents phénotypes d'anomalie du développement sexuel a révélé la présence d'une nouvelle mutation au niveau du gène *HSD3B2* chez un patient avec hypospadias périnéal et avec un taux élevé de 17α -hydroxyprogestérone, déhydroépiandrostérone, AMH, testostérone, rénine et androstènedione. L'étude *in silico* des polymorphismes du gène *PIWILI* a permis d'identifier 18 variants faux-sens comme délétères dont 11 variants touchant des acides aminés hautement conservés. L'étude de l'impact des variants localisés dans la région qui code pour le domaine PAZ sur ce dernier a révélé que les variants G305S, Y317C et Y346C affectent, avec des niveaux différents, la stabilité, la flexibilité et la dimension globale du domaine PAZ.

ABSTRACT

The success of human reproduction depends on the good function of male and female genitalia. A dysfunction of a genital organ leads to either infertility, miscarriage or developmental abnormality. This doctoral thesis aims to deepen our knowledge in the genetics of human reproduction by determining: 1) The nature and frequency of chromosomal abnormalities in couples with recurrent spontaneous miscarriages, in patients with genital ambiguity, amenorrhea, and a Turner phenotype who were referred to the cytogenetic department, Pasteur Institute of Morocco between 1996 and 2016. Cytogenetic analysis was performed according to the standard method. 2) The new genes and / or genetic mutations involved in disorder of sex development using the next generation sequencing. 3) The most deleterious nsSNPs of *PIWIL1* gene and their impacts on the structure, stability, flexibility and dimension of the PAZ domain by in silico study. Thus, we have identified that 23.20% of patients with a Turner's phenotype, 17.39% of patients with amenorrhea, 11% of couples with recurrent spontaneous miscarriages and 7.13% of patients with ambiguous genitalia have a chromosomal abnormality. After regrouping the results of 27 studies on recurrent spontaneous miscarriages, we found that 5.16% of patients have a chromosomal abnormality. The exome analysis of 3 Moroccan patients with different phenotypes of disorder of sex development revealed the presence of a new mutation in the *HSD3B2* gene in one patient with perineal hypospadias, and a high level of testosterone, 17 α -hydroxyprogesterone, dehydroepiandrosterone, AMH, renin and androstenedione. Using in silico analyses, we identified 18 deleterious missense variants of *PIWIL1* gene including 11 variants involving highly conserved amino acids. The study of the impact of the variants, located in the region which codes for the PAZ domain, revealed that the variants G305S, Y317C and Y346C affect, with different levels, the stability, the flexibility and the global dimension of the PAZ domain.

INTRODUCTION

La reproduction humaine est bien assurée après le succès de plusieurs processus masculins et féminins. Chez l'homme, la production d'un spermatozoïde mature, capable de féconder un ovocyte secondaire, résulte d'un processus très complexe appelé la spermatogenèse. Chez la femme, la production d'un ovocyte secondaire résulte de la combinaison de deux processus dépendants, l'ovogenèse et la folliculogenèse. L'union d'un spermatozoïde mature et d'un ovocyte secondaire conduit à la formation d'un zygote avec le matériel génétique du père et de la mère, la fécondation. Le zygote subit plusieurs divisions et plusieurs processus de l'organogenèse. Cependant, une erreur au niveau de l'un de ces processus peut conduire soit à une infertilité masculine, soit à une infertilité féminine, soit à l'apparition des fausses couches, soit à la naissance d'un nouveau-né avec une anomalie de développement.

Les éléments transposables (ET) sont des séquences, répétées et mobiles, capables de transporter du matériel génétique d'un endroit du génome à un autre, et leur mouvement peut avoir un effet néfaste sur les organismes, entraînant des réarrangements structuraux génomiques, tels que des délétions, des duplications et des inversions. La voie PIWI-piARN est une voie de répression majeure des éléments transposables dans les gonades animales. Les piARNs s'associent avec les protéines PIWIs pour former des complexes ribonucléoprotéiques, *piARN-induced silencing complex* (piRISC), impliqués notamment dans la répression des rétrotransposons au sein de la lignée germinale mâle. Ce mécanisme pourrait être comparé à celui d'un système immunitaire à l'échelle du génome. Ainsi, la perte de fonction d'un seul type de protéine PIWI induit une altération de l'ovogenèse et de la spermatogenèse, ce qui peut causer une infertilité.

Une fausse couche spontanée est la perte spontanée du produit de conception avant sa viabilité entre la conception et la 20^{ème} semaine d'aménorrhée. Environ 15 à 20% des grossesses se terminent par une fausse couche spontanée, et environ 25% à 50% des femmes expérimentent une ou plusieurs fausses couches spontanées, souvent dues à des anomalies chromosomiques du conceptus.

La mise en place de l'appareil génital commence, à la 3^{ème} semaine de développement embryonnaire, par le développement d'une gonade indifférenciée et identique chez les embryons XX et XY, appelée crête génitale. Si l'embryon est XX, la gonade se différenciera en ovaires, les canaux de Müller persisteront et se différencieront en utérus, trompes de Fallope, col de l'utérus et vagin. Néanmoins, si l'embryon est XY, la gonade se différenciera en testicules. Les canaux de Müller régresseront et les canaux de Wolff se développeront en un appareil reproducteur masculin.

INTRODUCTION

Ainsi, la survenue d'une erreur au cours de l'une de ces étapes de développement conduit directement à la naissance d'un nouveau-né avec une anomalie de développement sexuel.

Durant ma période de thèse, nous nous sommes intéressés, dans un premier temps, à déterminer la nature et la fréquence des anomalies chromosomiques chez les couples marocains qui ont subi des fausses couches spontanées à répétition et chez des patients marocains présentant une ambiguïté génitale, une aménorrhée et un phénotype de Turner afin de comparer nos résultats à ceux obtenus par d'autres pays ayant suivi la même méthode. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à identifier de nouveaux gènes et/ou mutations génétiques impliquées dans l'apparition des anomalies de développement sexuel chez des patients marocains en utilisant la nouvelle génération de séquençage, notamment le séquençage de l'exome entier, connu sous le nom du Whole Exome Sequencing (WES). Dans un troisième temps, nous nous sommes intéressés à identifier les variants faux-sens les plus délétères du gène *PIWILI* à l'aide d'un certain nombre d'outils de prédiction computationnelle et d'évaluer leurs impacts sur la structure et la fonction du domaine PAZ à l'aide de la simulation de la dynamique moléculaire.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. La gamétogenèse

1.1. La spermatogenèse

La spermatogenèse est un processus complexe et dynamique par lequel les cellules souches de la lignée germinale, les spermatogonies, se transforment en cellules matures hautement spécialisées, les spermatozoïdes [de Kretser et al., 2016]. Elle se déroule au niveau des testicules (Figure 1) et elle débute à partir de la puberté tout en se poursuivant durant toute la vie de l'homme.

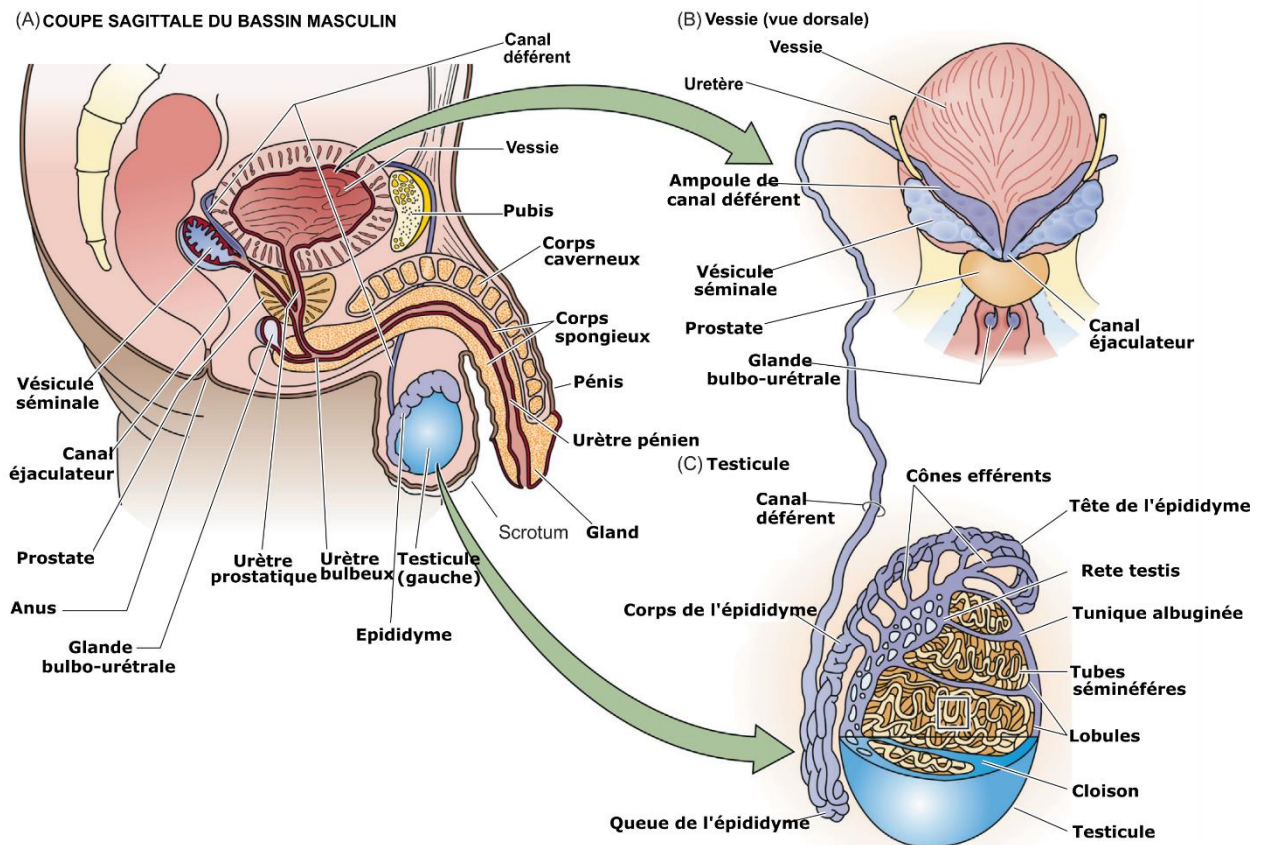


Figure 1: Appareil génital masculin

A) Coupe sagittale du bassin masculin, B) Vessie (vue dorsale), C) Testicule

L'appareil génital masculin est constitué de : deux gonades mâles (testicules) qui permettent la production des spermatozoïdes, des voies excrétrices qui permettent la sécrétion des spermatozoïdes vers l'extérieur (canaux déférents, des épидидymes et des canaux efférents), des glandes annexes (glandes de Cowper, vésicules séminales, et prostate) sécrétrices du liquide qui, avec les spermatozoïdes, constitue le sperme, et du tractus uro-génital (urètre) qui s'ouvre à l'extérieur par le méat urinaire [Carlson, 2019]

Le déroulement de la spermatogenèse, chez l'homme, comme chez tous les mammifères, comprend trois phases majeures : une phase de multiplication, une phase de méiose et une phase de différenciation appelé spermiogenèse. À la fin, le spermatozoïde acquit son pouvoir fécondant au niveau de l'épididyme (Figure 2) [Guérin, 2016].

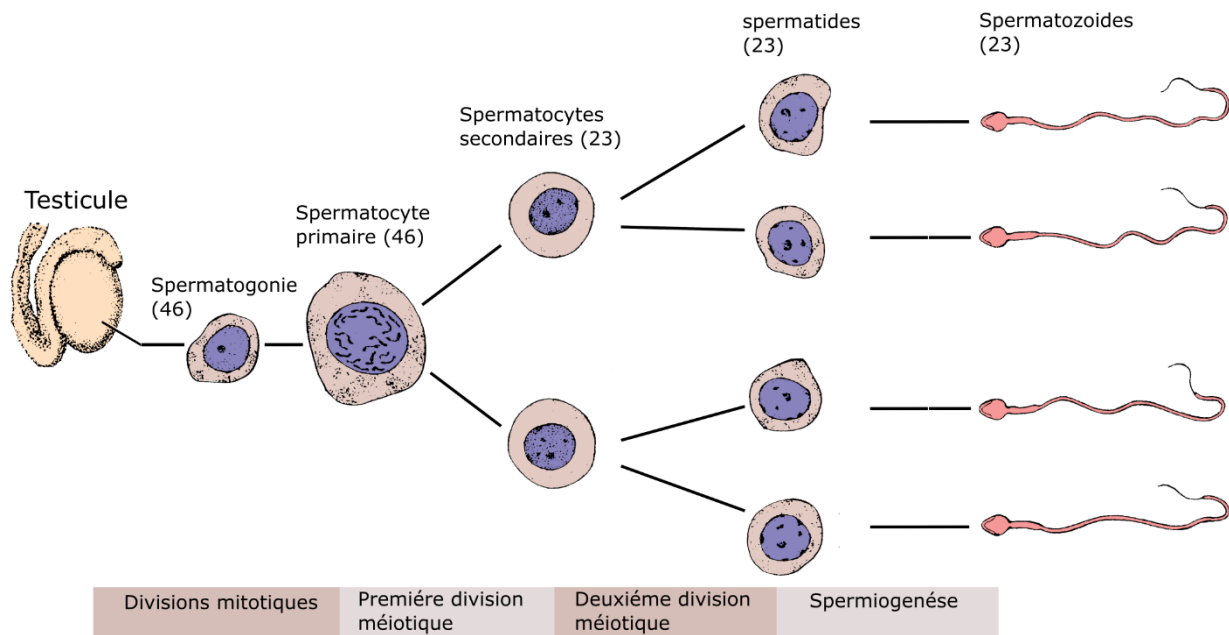


Figure 2: Étapes de la spermatogenèse et de la spermiogenèse

[Jones and Lopez, 2006]

1.1.1. Les phases de la spermatogenèse

1.1.1.1. La phase de multiplication

La première phase de la spermatogenèse concerne les spermatogonies et dure environ 27 jours [Clermont, 1963]. Les spermatogonies apparaissent à la sixième semaine du développement embryonnaire au niveau des ébauches des glandes génitales et subissent des mitoses presque sans arrêt [Nagano et al., 2000]. Ces mitoses ne produisent que des spermatogonies qui restent inactives jusqu'à la puberté. En effet, il en existe trois types qui se différencient principalement par l'aspect de leurs chromatine nucléaire sous microscope optique : les spermatogonies Ad ont une chromatine dense d'aspect sombre (dark), les spermatogonies Ap ont une chromatine poussiéreuse claire (pâle) et les spermatogonies B ont une chromatine mottée et irrégulière [de Kretser et al., 2016].

Les spermatogonies Ad sont considérées comme les spermatogonies souches qui constituent le pool réserve. En 1972, Clermont a décrit le mode particulier de division des spermatogonies dans le sens où les deux cellules filles ont des destinées différentes. La première reste strictement identique à la cellule mère et la deuxième évolue en spermatogonie Ap. Cette dernière subit une division cellulaire et donne naissance à deux cellules filles, spermatogonies B, qui subissent une ultime division pour donner des spermatocytes de premier ordre appelés spermatocytes primaires 1 [Clermont, 1972]. Les spermatocytes primaires répliquent leur ADN pour se préparer à la deuxième phase de la spermatogenèse, qui est la phase de méiose. Les spermatocytes primaires ont donc un contenu (4C) d'ADN [Nagano et al., 2000].

1.1.1.2. La phase de méiose

Les spermatocytes primaires rentrent en première division de méiose qui aboutit à la formation de deux cellules filles à 23 chromosomes, appelées spermatocytes secondaires 2, ayant un contenu (2C) d'ADN. Les spermatocytes 2 subissent une deuxième division de méiose qui aboutit à la constitution de quatre spermatides contenant 23 chromosomes à un chromatide, soit donc un contenu (1C) d'ADN (Figure 3). Les spermatides ne se divisent pas mais subissent une spermiogenèse [Heller and Clermont, 1964; de Kretser et al., 2016].

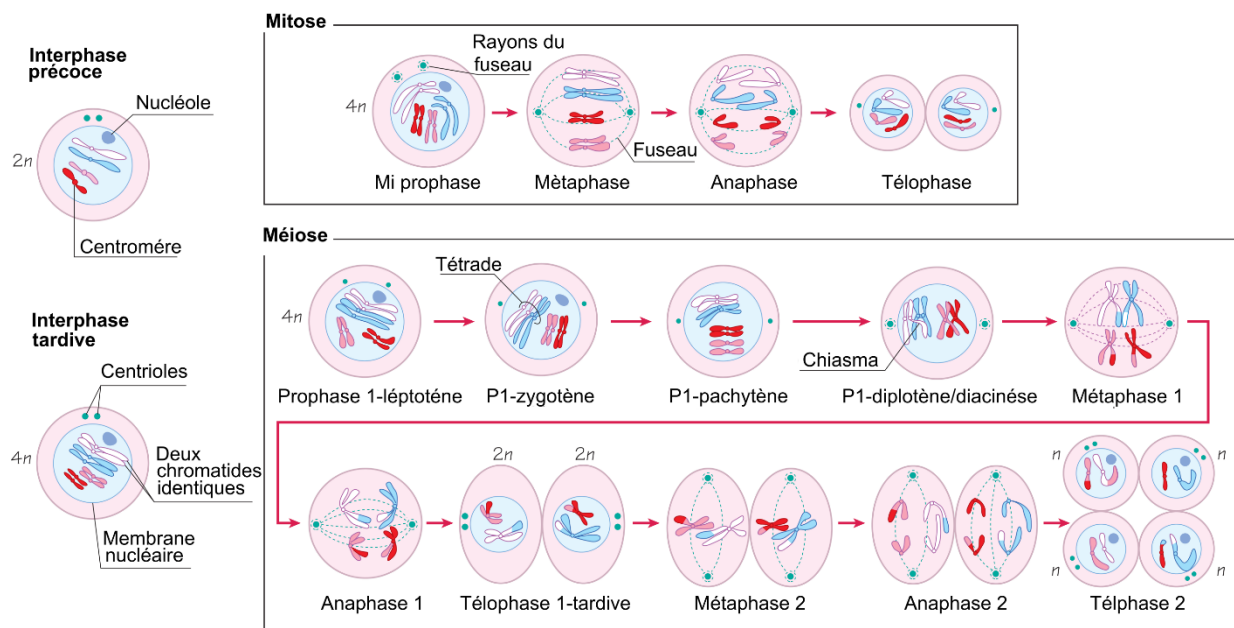


Figure 3: Représentation schématique de la mitose et la méiose des cellules humaines

[Heffner and Schust, 2014]

1.1.1.3. La phase de différenciation

La spermiogenèse est l'ensemble des transformations morphologiques et physiologiques complexe qui aboutit à la transformation de la spermatide ronde, une cellule sans particularité, en une spermatide allongée, une cellule hautement différenciée, qui va elle-même évoluer en spermatozoïde [Fekih, 2018]. Elle s'effectue en 23 jours et est caractérisée par la condensation du noyau, la formation de l'acrosome, la formation du flagelle, la formation du manchon mitochondrial et la réorganisation du cytoplasme (Figure 4) [de Kretser et al., 2016].

À la fin de la spermiogenèse, les spermatozoïdes formés ne contiennent pas de réticulum endoplasmique, d'appareil de Golgi, de lysosome, de peroxysoxe et de ribosome cytoplasmique [Matsumoto and Bremner, 2016]. Ils sont ensuite libérés dans la lumière du tube séminifère par un processus appelé spermiation [de Kretser et al., 2016].

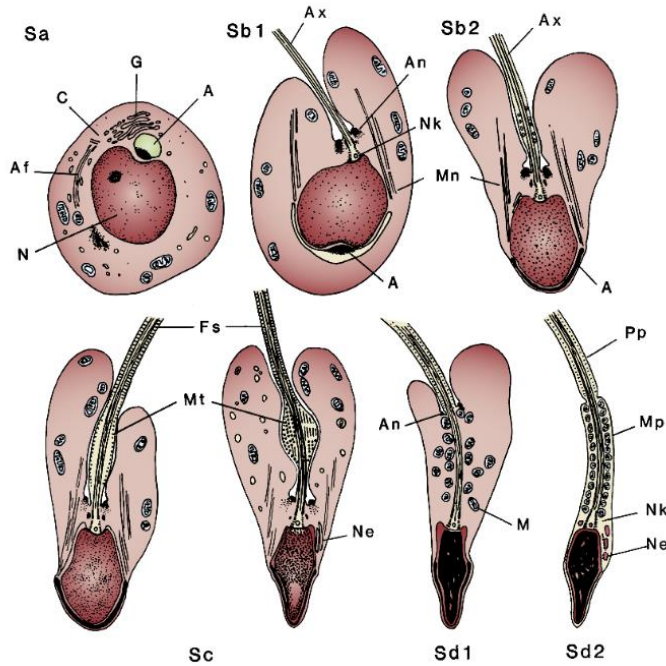


Figure 4: Spermiogenèse dans les testicules humains

Les étapes Sa, Sb1 et Sb2 correspondent au développement de Golgi, Sb2 et Sc à la phase acrosomique et Sd à la phase de maturation.

A, vésicule acrosomique ; Af, filament axial ; An, anneau ; Ax, Axonème ; C, centrioles ; Fs, Gaine fibreuse ; G, Golgi ; M, mitochondries ; Mn, manchette ; Mp, pièce médiane ; Mt, microtubules ; N, noyau ; Ne, enveloppe nucléaire ; Nk, cou ; Pp, pièce principale [de Kretser et al., 2016].

1.1.1.4. La maturation des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes libérés dans l'épididyme ne sont pas fonctionnellement matures. Ils sont immobiles et décapacités. Ceci va être acquis juste après la sortie des spermatozoïdes du testicule par deux étapes : la maturation épидидymaire suivie de la capacitation [Luangpraseuth-Prosper, 2015].

1.1.1.4.1. La maturation épидидymaire

C'est au niveau de l'épididyme que les spermatozoïdes acquièrent leur mobilité. En effet, la compaction du noyau de la spermatide se poursuit avec l'oxydation des groupements thiols libres des protamines. Plus la tête du spermatozoïde est petite, plus sa mobilité est efficace et plus l'information génétique est protégée contre d'éventuels effets mutagènes [de Kretser et al., 2016].

Dans le début du corps de l'épididyme, les spermatozoïdes subissent des modifications importantes, qui dépendent de la composition du liquide épидидymaire, afin d'acquérir un pouvoir fécondant. Au cours du transit des spermatozoïdes dans l'épididyme, les spermatozoïdes subissent une modification de leurs protéines membranaires d'origine testiculaire. Certaines protéines membranaires apparaissent transitoirement puis disparaissent afin de protéger les spermatozoïdes contre l'oxydation ou pour masquer certains sites. Dans la partie caudale de l'épididyme, de nouvelles protéines caractéristiques du pouvoir fécondant se mettent au niveau de la membrane du spermatozoïde [Dacheux et al., 2005].

1.1.1.4.2. *La capacitation*

Après la libération des spermatozoïdes dans le tractus génital femelle, les spermatozoïdes sont progressivement motiles mais incapable de se fixer à l'ovocyte et de le féconder. Ainsi, la capacitation débute dans la cavité utérine. Le cholestérol libre de la membrane plasmique du spermatozoïde, qui joue le rôle d'un facteur membranaire de décapacitation, est éliminé suite à un stress oxydatif combiné à des accepteurs du cholestérol, présents dans les sécrétions génitales, l'albumine et la lipoprotéine HDL [Davis, 1980].

L'élimination du cholestérol redonne de la mobilité aux phospholipides membranaires des spermatozoïdes, ce qui permet aux ions, notamment le Ca^{2+} qui se lie à la phosphatidylsérine, de pénétrer à l'intérieur du spermatozoïde. En plus, l'élimination du cholestérol engendre une diminution du ratio cholestérol/phospholipides de la membrane [Luangpraseuth-Prosper, 2015]. Ceci entraîne un changement au niveau de la fluidité membranaire et au niveau de la réorganisation des protéines à travers la membrane [Langlais et al., 1988]. Au niveau de l'isthme, les spermatozoïdes se lient aux cellules épithéliales où ils seront stockés en attente de l'ovulation [Baillie et al., 1997]. À l'ovulation, un signal endocrinien augmente les espèces réactives de l'oxygène à l'intérieur du spermatozoïde, le niveau intracellulaire d'adénosine cyclique monophosphate et aussi la phosphorylation des tyrosines au niveau de la gaine fibreuse de flagelle [Luangpraseuth-Prosper, 2015]. En réponse à ce signal, le calcium est relargué de façon pulsatile ce qui induit une motilité hyperactive du spermatozoïde [Luangpraseuth-Prosper, 2015]. Cette hyperactivité du spermatozoïde va lui permettre de se relâcher de l'épithélium de l'oviducte et gagner par la suite les trompes de Fallope jusqu'à l'ovocyte où il pénètre dans le cumulus de l'ovocyte. Les spermatozoïdes sont capables de réaliser ainsi la réaction acrosomique [Florman et al., 2008].

1.1.2. *La régulation de la spermatogenèse*

Au niveau du testicule, les différents types cellulaires sont sous la dépendance des hormones hypophysaires (Figure 5) [Holdcraft and Braun, 2004]. En effet, l'action pulsatile de l'hormone GnRH hypothalamique (Gonadotropin Releasing Hormone) induit la sécrétion de deux hormones gonadotrophines : FSH et LH [McLachlan et al., 2002].

À la puberté, la LH joue un rôle indispensable au démarrage de la spermatogenèse [de Kretser et al., 2016]. La LH stimule des récepteurs, appartenant à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G intracellulaire, situées au niveau des cellules de Leydig. Ces derniers, en réponse à ce signal, produisent et sécrètent la testostérone. D'autre part, la prolactine permet une augmentation du nombre de récepteurs LH, et par conséquent, une augmentation de la synthèse de testostérone [de Kretser et al., 2016].

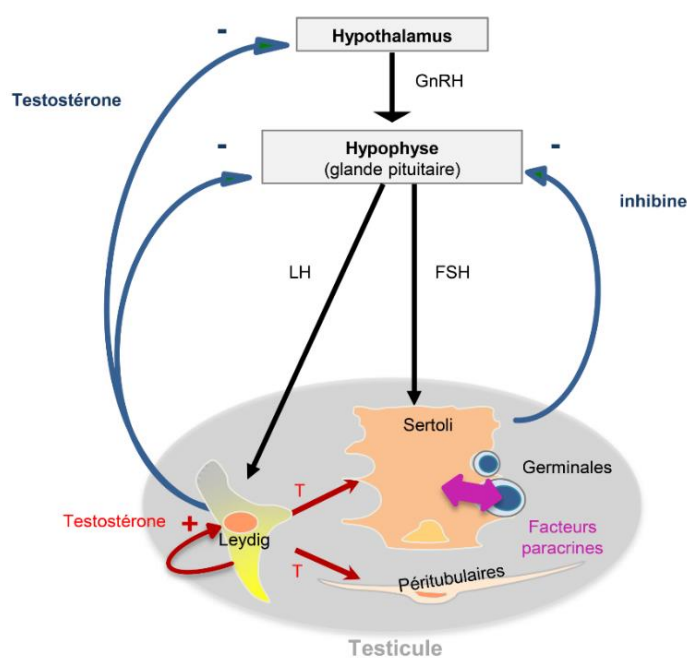


Figure 5: Représentation schématique des principales régulations hormonales de la spermatogenèse

[Chocu, 2014]

La testostérone est indispensable à l'initiation et au déroulement de la spermatogenèse. Elle régule les fonctions des cellules de Leydig, les cellules de Sertoli et les cellules myoïdes péricubulaires, qui expriment son récepteur. La testostérone exerce aussi un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion des gonadotrophines, en particulier la LH et la GnRH [McLachlan et al., 2002].

La FSH sécrétée pendant la vie fœtale agit directement sur les cellules de Sertoli en régulant leurs fonctions et leurs structures [Plant and Marshall, 2001]. Avant la puberté, la FSH stimule la prolifération des cellules de Sertoli. Ceci est indispensable pour la fertilité car c'est le nombre des cellules de Sertoli qui définit le nombre des spermatozoïdes pouvant être produit. À la puberté, la FSH est aussi impliquée dans l'initiation de la spermatogenèse [Plant and Marshall, 2001]. En effet, la FSH et la testostérone semblent agir en synergie pour contrôler la spermatogenèse. Les cellules de Sertoli sécrètent également l'inhibine qui exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de la FSH [Plant and Marshall, 2001].

D'autres hormones interviennent également dans la spermatogenèse, notamment, les hormones thyroïdiennes, pancréatiques et surrénaliennes [Kumar et al., 2014]. Des récepteurs de la plupart de ces hormones ont été décrits dans les testicules.

En plus d'être régulées par les hormones, les fonctions des différentes cellules du testicule sont soumises à une régulation paracrine au cours de la spermatogenèse. Cette régulation est due à des substances sécrétées par une ou un groupe de cellule, qui agissent sur des cellules adjacentes à

l'intérieur du testicule. Ces substances sont responsables d'interactions réciproques entre les cellules de Sertoli, les cellules germinales et les cellules de Leydig [de Kretser et al., 2016].

1.2.L'ovogenèse, la folliculogénèse et l'ovulation

1.2.1. L'ovogenèse

L'ovogenèse est le processus par lequel une cellule germinale femelle se développe et se différencie en un ovocyte fécondable [Desai et al., 2017a]. Ce processus s'étend de la vie fœtale jusqu'à la ménopause et comporte trois phases : la phase de multiplication, la phase de maturation nucléaire et la phase de maturation cytoplasmique [Tortora and Grabowski, 1994].

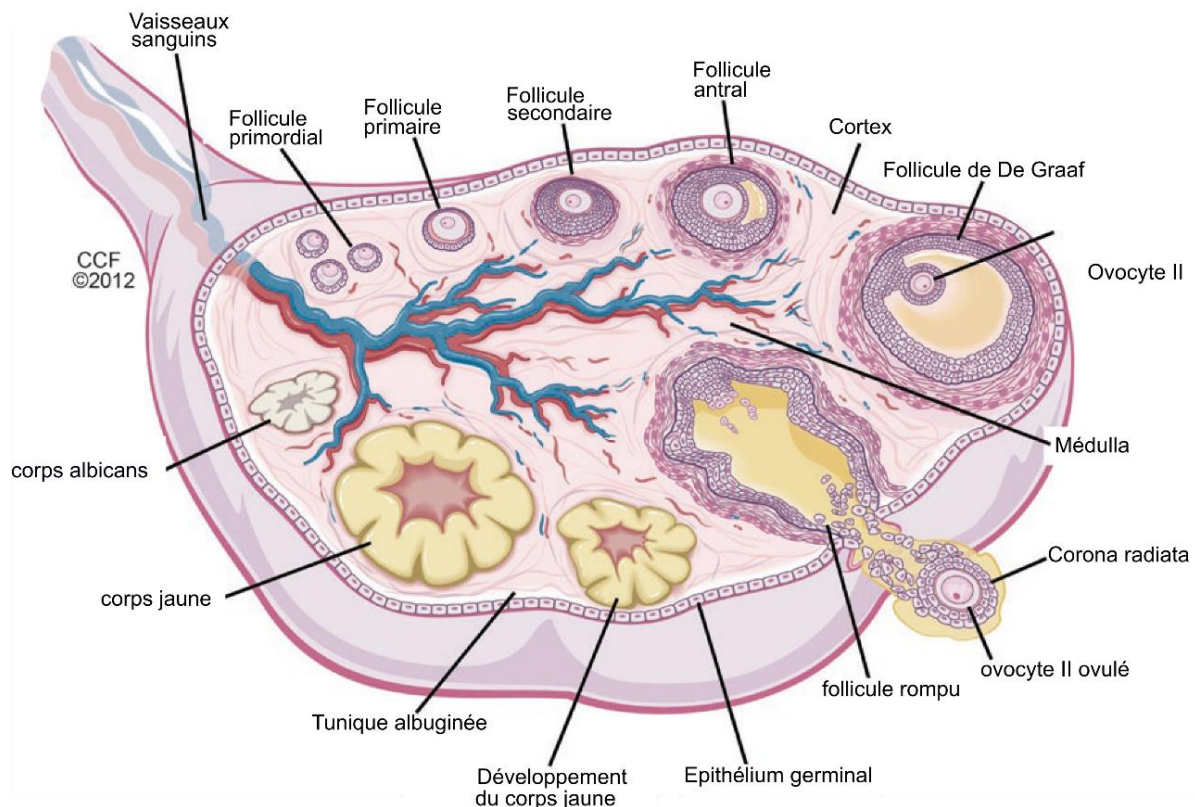


Figure 6: Schéma de l'ovaire représentant le follicule et l'ovocyte en développement dans le cortex ovarien

L'ovaire est le principal organe reproducteur féminin. Il est constitué essentiellement des follicules qui contiennent une seule cellule germinale, l'ovocyte, entouré par des cellules somatiques de soutien, les cellules de la granulosa et les cellules de la thèque. L'ovaire fonctionne, également, comme un organe endocrinien en sécrétant les œstrogènes et la progestérone [Desai et al., 2017a]. Les ovaires se présentent sous la forme d'une paire de glandes, de 2,5 à 5,0 cm de long, 1,5 à 3,0 cm de large et 0,6 à 1,5 cm d'épaisseur, de part et d'autre de l'utérus [Conti and Chang, 2016].

1.2.1.1. La phase de multiplication

Chez la femme, l'ovogenèse commence environ 3 semaines après la fécondation. Les cellules germinales primordiales naissent du sac vitellin et migrent via des mouvements amiboïdes, à travers l'intestin postérieur, vers la crête génitale [Fujimoto et al., 1977; WITCHI, 1948]. Les cellules germinales primordiales subissent une division mitotique rapide au cours de cette migration. La crête génitale, formée entre environ 3,5 et 4,5 semaines de gestation, est composée

de cellules mésenchymateuses, recouvertes par des cellules épithéliales cœlomiques [Desai et al., 2017a]. À leur arrivée, les cellules germinales primordiales donnent naissance à des cellules souches diploïdes appelées ovogonies. Les ovogonies subissent une succession des mitoses, et le nombre d'ovogonies passe de 600 000 à la 8^{ème} semaine de gestation, à plus de dix fois ce nombre à la 20^{ème} semaine de gestation. Les ovogonies sont entourées par des cellules épithéliales somatiques dérivées des cellules mésenchymateuses de crête génitale, formant ainsi les follicules primordiaux. Les follicules commencent à se former aux alentours de la 16^{ème} et la 18^{ème} semaine de la vie fœtale et les ovogonies entrent dans la méiose [Gondos et al., 1986; Byskov, 1986; Goto et al., 1999].

1.2.1.2. La phase de maturation nucléaire

Une fois que la méiose est initiée, l'ovogonie prend le nom d'ovocyte de premier ordre [Desai et al., 2017a]. Au bout de 4 à 5 mois de grossesse, l'ovaire atteint son nombre maximal d'ovocytes, entre 5 et 8 millions d'ovocytes. Ce nombre diminue considérablement à la naissance, entre 1 et 2 millions d'ovocytes, et à la puberté, moins de 500 000 ovocytes [Baker, 1963].

Les ovocytes primaires diploïdes subissent deux divisions méiotiques : une division réductionnelle qui aboutit à la formation des ovocytes secondaires haploïdes, et une division équationnelle qui fournit des ovocytes haploïdes (Figure 7) [Conti and Chang, 2016]. La méiose ovocytaire est discontinue. En effet, l'ovocyte primaire (Figure 8) entame sa première division pendant la vie fœtale, mais il subit un premier blocage au stade diplotène de la prophase I sous l'action de l'inhibiteur de la méiose ovocytaire (OMI), produit par les cellules de la granulosa, avec un noyau typique appelé noyau dictyé [Falcone and Hurd, 2013]. Ce blocage persiste une très longue période, puisque cette première division ne reprendra qu'au moment de l'ovulation, où il subit un deuxième blocage en métaphase II jusqu'à la fécondation [Desai et al., 2017b].

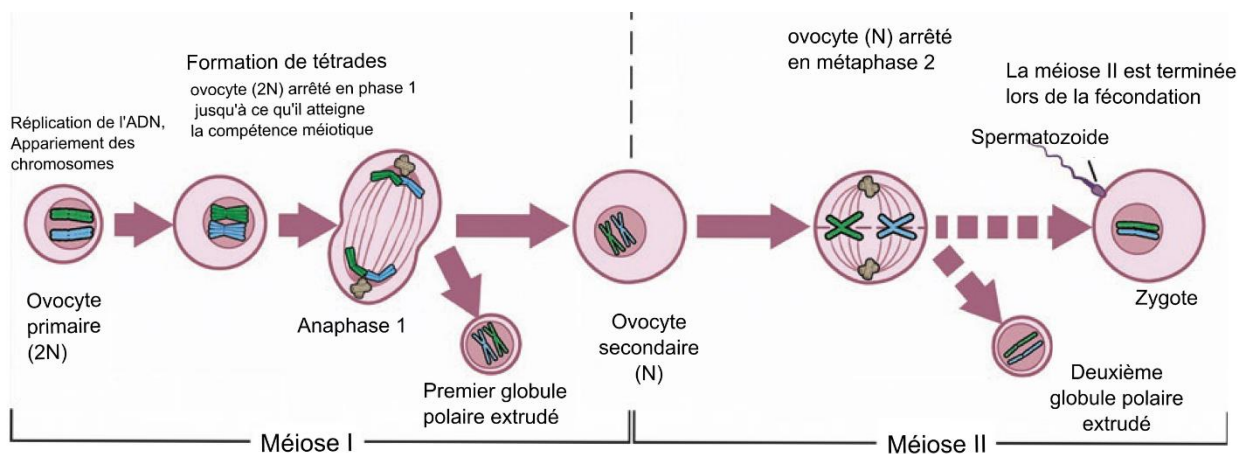


Figure 7: Etapes de l'ovogenèse

[Falcone and Hurd, 2013]

La méiose de l'ovogenèse est caractérisée par une inégalité des divisions. En effet, si la répartition chromosomique lors de la division de l'ovocyte primaire est équitable, celle du cytoplasme ne l'est pas, dans le sens où la quasi-totalité du cytoplasme est conservée par l'une des cellules filles, appelée désormais l'ovocyte secondaire [Desai et al., 2017a].

Alors que l'autre cellule fille est appelée 1^{er} globule polaire [Conti and Chang, 2016]. L'ovocyte secondaire va subir une deuxième division comparable à la première qui va fournir un 2^{ème} globule polaire [Conti and Chang, 2016]. A la fin de cette phase, contrairement à la spermatogenèse, un ovocyte primaire ne fournit qu'un seul gamète, ovocyte secondaire [Falcone and Hurd, 2013; Conti and Chang, 2016; Desai et al., 2017a].

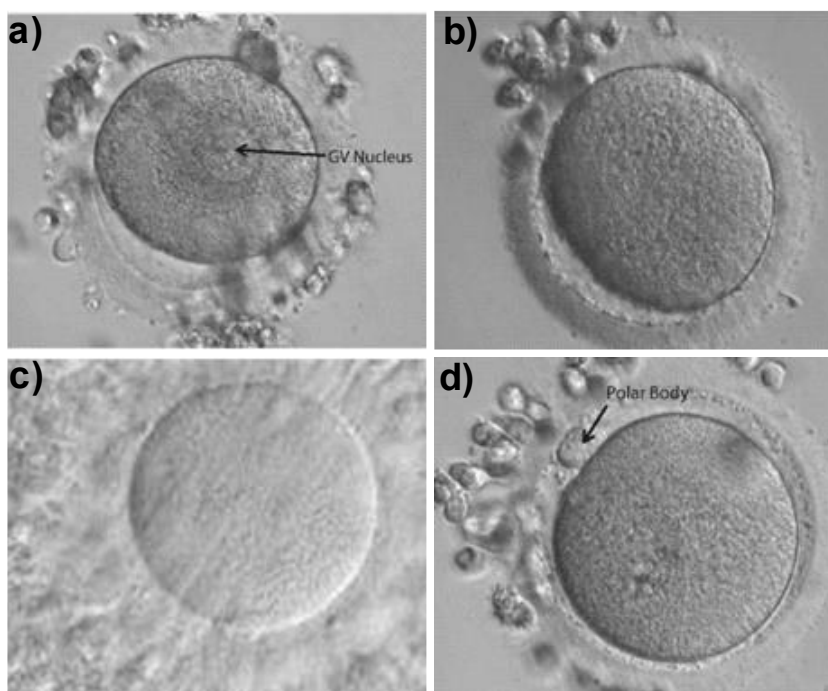


Figure 8: Différents stage de maturation ovocytaire

a) Ovocyte en prophase 1 de la méiose 1 ; b) Ovocyte en métaphase 1 ; c) Complexe cumulus: ovocyte présentant une morphologie généralement associée aux ovocytes matures au moment de l'ovulation ; d) Ovocyte mature en métaphase II [Falcone and Hurd, 2013].

1.2.1.3. La phase de maturation cytoplasmique

Cette phase comporte trois étapes : une étape de transcription d'ARN qui a lieu au cours de la prophase de la première division bloquée au stade diplotène, où le diamètre de l'ovocyte passe de 14 à 100 micromètres. Une étape de traduction de ces ARNs qui a lieu dans l'ovocyte primaire. En effet, la synthèse de certains nombres de protéines rend l'ovocyte compétent pour reprendre la méiose lors de l'ovulation et lors de la fécondation. L'ovocyte ne subit pas de modifications morphologiques spectaculaires, durant cette étape, et reste sphérique. 3) Une étape de mise en réserve des ARNs. En effet, la plupart des ARNs transcrits lors de la première étape sont stockés pour être traduits après la fécondation et durant les stades du développement embryonnaire [Falcone and Hurd, 2013].

1.2.2. La folliculogenèse

La folliculogenèse est l'ensemble des mécanismes qui assurent la croissance et la maturation des follicules [Hugues, 2016]. Chez la femme, la folliculogenèse est un processus long, qui dure plusieurs mois, et qui est cyclique, puisque les follicules sont recrutés d'une manière régulière depuis le stade de follicule primordial à l'ovulation [Hugues, 2016]. Contrairement à l'ovogenèse, la folliculogenèse est un processus continu de la puberté à la ménopause et très sélectif. Il ne concerne que moins de 0,1% des follicules primordiales tandis que les autres follicules subissent un phénomène d'atrésie [Zeleznik, 2004].

Les follicules ovariens sont les unités fonctionnelles du système reproductif féminin. Chaque follicule contient un ovocyte entouré par des cellules somatiques de soutien [Wear et al., 2016]. Ils sont classés selon leurs tailles et leurs morphologies en follicules primordiaux, follicules primaires, follicules secondaires, follicules antraux et follicules de De Graaf (Figure 9) [Hugues, 2016].

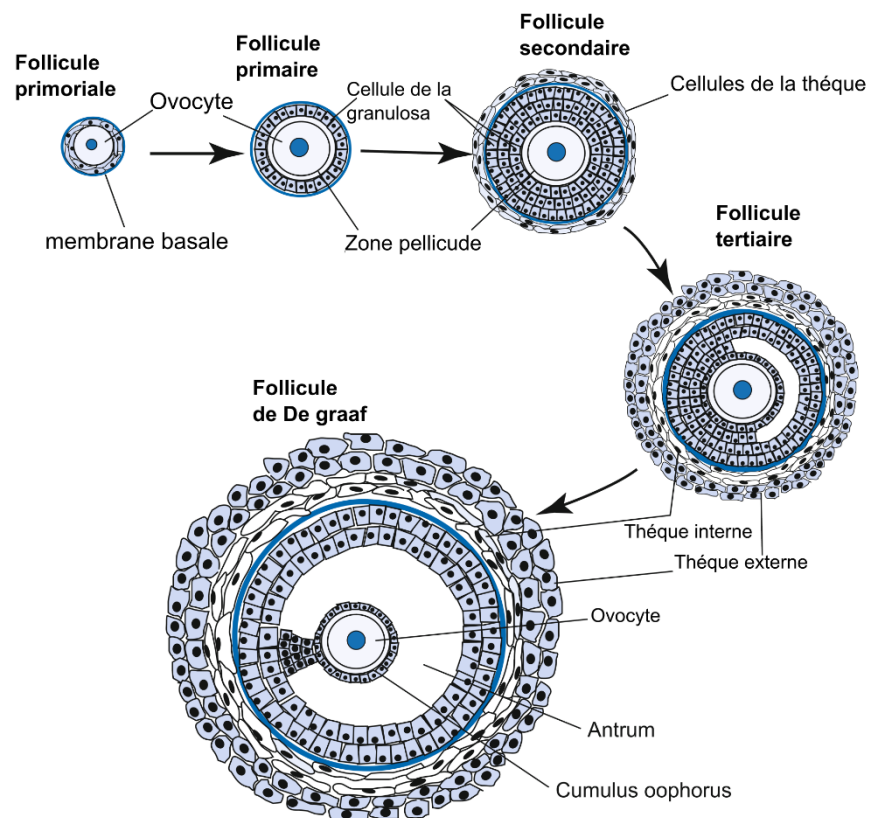


Figure 9: Illustration séquentielle de la folliculogenèse dans l'ovaire humain

[Feher, 2012]

1.2.2.1. Les follicules primordiaux

Les follicules primordiaux ont un diamètre de 50 micromètres [Hugues, 2016]. Ils sont formés par l'association de l'ovocyte primaire, bloqué au stade diplotène de la prophase I, à une seule couche des cellules folliculeuses aplaties, dites endothéliformes ou cellules de la pré-granulosa,

séparée du stroma ovarien par une membrane basale, appelée la membrane de Slavjanski [Hugues, 2016].

Plusieurs facteurs sont impliqués dans la mise en place des follicules primordiaux. D'abord, pour que les follicules primordiaux se forment, les amas des cellules germinales primordiales doivent se dissocier, pour que chaque cellule germinale entre en contact avec les cellules de soutiens environnantes, et forme ainsi avec elles un follicule primordial. Xu et al. et Vanorny et al. ont montré que la voie de signalisation Notch est impliquée dans la fragmentation des amas ovocytaires [Xu and Gridley, 2013; Vanorny et al., 2014]. Certaines protéines impliquées dans la détection des dommages d'ADN sont aussi importantes pour la formation des follicules primordiaux. En effet, chez les souris KO pour les gènes *MSH5* (mutS homolog 5), *DMC1* (Disrupted meiotic cDNA1 homolog) ou *ATM* (ataxia telangectasia-mutated homolog), une diminution importante du nombre de follicules primordiaux a été observée. Cette diminution du nombre est due à la perte de la capacité à réparer l'ADN endommagé des ovocytes au cours de la méiose, ce qui conduit à une augmentation de l'apoptose ovocytaire [Barlow et al., 1998; Di Giacomo et al., 2005]

1.2.2.2. Les follicules primaires

Les follicules primaires ont un diamètre qui passe de 60 à 80 μm . Ils sont caractérisés par une couche des cellules folliculeuses qui, quant à eux, ont une forme cubique. Le diamètre de la vésicule germinative atteint environ 20 μm [Hugues, 2016].

Plusieurs facteurs sont impliqués dans la transition des follicules primordiaux en follicules primaires. En effet, il a été démontré que les facteurs de transcriptions NOBOX, FOXL2 et FOXO3 sont impliqués dans cette transition [Rajkovic et al., 2004; Schmidt et al., 2004; Moniruzzaman and Miyano, 2010].

1.2.2.3. Les follicules secondaires

Les follicules secondaires ont un diamètre qui varie entre 200 et 400 μm . Les cellules folliculeuses s'organisent en deux puis en plusieurs couches de cellules cubiques, formant ainsi la granulosa [Hugues, 2016]. À ce stade, les récepteurs FSH apparaissent à la surface des cellules de la granulosa. L'ovocyte augmente de volume et sécrète une enveloppe glycoprotéique autour d'elle appelée la zone pellucide. Les cellules de la granulosa entrent en contact avec l'ovocyte via des jonctions communicantes qui vont assurer un échange métabolique. Les cellules de la stroma interne se différencient pour former la thèque interne avec des récepteurs de LH [Hugues, 2016].

À ce jour, peu de facteurs ont été identifiés comme impliqués dans la transition de follicule primaire en follicule secondaire. En effet, la folliculogenèse est arrêtée au stade primaire chez les

souris KO pour le *GDF9* et chez les brebis KO pour le gène *GDF9b* [Dong et al., 1996; Galloway et al., 2000].

1.2.2.4. Les follicules antraux

Les follicules antraux ont un diamètre de 1 à 20 mm. Les cellules de la granulosa sécrètent du liquide folliculaire qui forme des microcavités entre elles et qui va progressivement former une cavité unique appelé l'antrum. La thèque se différencie en deux couches, thèque interne et thèque externe. La membrane de Slavjanski sépare toujours la granulosa et la thèque interne [Hugues, 2016].

L'IGF-1, le récepteur d'aryl d'hydrocarbone (AHR) et la superoxyde dismutase (SOD1) semblent être impliqués dans la transition d'un follicule secondaire en un follicule antral [Baker et al., 1996; Matzuk et al., 1998; Benedict et al., 2000].

1.2.2.5. Les follicules de De Graaf

Les follicules de De Graaf sont aussi appelés follicules mûrs ou pré-ovulatoires. Leurs diamètres atteints juste avant l'ovulation environ 23 mm [Hugues, 2016]. Cette croissance est due à l'accroissement du volume de l'antrum qui atteint 3 à 5 ml. À ce stade, l'ovocyte est toujours bloqué en prophase de la première division méiotique et atteint un diamètre d'environ 110 micromètres. Il forme avec les cellules de granulosa, qui l'entoure directement, le cumulus oophorus. La première couche des cellules de la granulosa qui entoure l'ovocyte porte le nom de corona radiata. La membrane de Slavjanski sépare toujours la thèque interne des cellules de la granulosa, et le tout est limité par la thèque externe [Falcone and Hurd, 2013].

La croissance du follicule antral en un follicule mur est strictement dépendante de la présence de FSH et de la LH. Le facteur IGF-1, qui régule positivement l'expression du récepteur de la FSH, peut aussi jouer un rôle essentiel dans le phénomène de sélection folliculaire [Zhou et al., 1997]. En effet, une sélection de follicule antral se produit en fonction de sa taille et de sa sensibilité aux hormones. Les follicules antraux non sélectionnés sont éliminés. Le follicule destiné à ovuler est reconnaissable par sa taille.

1.2.3. L'ovulation

L'ovulation consiste à la rupture de la paroi du follicule et de l'ovaire. Au niveau du follicule, Le cumulus se détache de la granulosa et subit une mucification, ce qui conduit à une augmentation de volume. L'ovocyte se détache de la corona radiata et les prolongements des cellules péri-ovocytaires se rétractent hors de la zone pellucide. L'ovocyte, encore entouré par le cumulus, flotte dans la cavité folliculaire [Guglielmo and Albertini, 2013].

Le follicule déforme la surface de l'ovaire et ses couches tissulaires se perforent en un endroit bien précis, ce qui entraîne le complexe cumulus-ovocyte à la surface de l'ovaire. L'épithélium ovarien et les cellules de la granulosa se disjoignent, alors que la matrice intercellulaire des thèques et la membrane de Slavjanski se désintègrent [Guglielmo and Albertini, 2013].

L'ovocyte, bloqué en prophase I, doit terminer la première division méiotique. Cette reprise de la méiose se fait en réponse au pic pré-ovulatoire du LH [Mehlmann, 2005]. L'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) ont un rôle crucial dans le maintien de l'arrêt méiotique. L'AMPc maintient le facteur MPF (M-phase promoting factor) inactif via la phosphorylation de la kinase CDK1 (Cyclin-dependent kinase 1). En réponse au pic de LH, la phosphodiesterase spécifique de l'ovocyte s'active, induit l'hydrolyse de l'AMPc en une forme inactive et initie la reprise méiotique. Plus récemment, il a été montré que le NPPC (Natriuretic peptide type C), produit par les cellules de la granulosa murale, agit sur les cellules du cumulus et induit l'augmentation du GMPc. Ce dernier rejoint l'ovocyte, via les jonctions gap, et inhibe l'activité de PDE3A (Phosphodiesterase 3A), ce qui maintient l'ovocyte dans un état de quiescence [Zhang et al., 2010]. Le pic de LH induit la diminution de la production de GMPc et l'augmentation de l'EGF, qui a pour effet la fermeture des jonctions gap, et ainsi la réduction de GMPc dans l'ovocyte [Robinson et al., 2012; Norris et al., 2010]. Cette diminution de concentration de l'AMPc et de GMPc permet la reprise de la méiose qui va s'arrêter encore en métaphase de la seconde division et ne s'achèvera qu'à la fécondation.

1.3. La régulation épigénétique des ET dans la lignée germinale

1.3.1. Les éléments transposables (ET)

Les éléments transposables (ET) sont des séquences, répétées et mobiles, capables de transporter du matériel génétique d'un endroit du génome à un autre par un mécanisme de copier-coller ou de couper-coller. En conséquence, leur mouvement peut avoir un effet néfaste sur les organismes, entraînant des réarrangements structuraux génomiques, tels que des délétions, des duplications et des inversions. Les éléments transposables sont des composants majeurs du génome, ils représentent approximativement 37% du génome murin, 45% du génome humain et plus de 80% du génome de certains végétaux [Waterston et al., 2002; Lander et al., 2001]. Bien que la majorité des éléments transposables sont mutés ou tronqués, ce qui les rends inactifs, certains ET restent actifs ce qui provoque l'apparition des nouvelles copies de transposons dans le génome. Les éléments transposables peuvent être classés, selon leur mode de transposition en deux catégories : les ET de classe 1 ou rétrotransposons et les ET de classe 2 ou transposons à ADN (Figure 10) [Etcheverry, 2013].

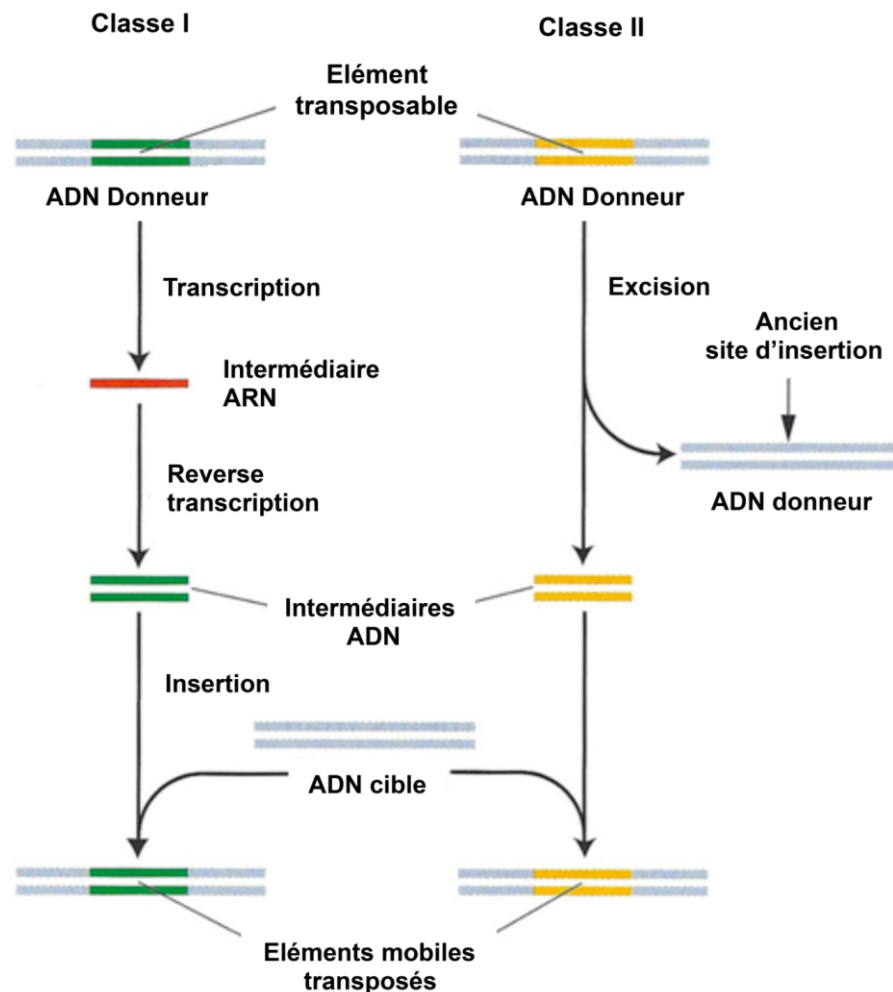


Figure 10: Les mécanismes de transposition des deux classes d'éléments transposables

[Saint leandre, 2016]

Les transposons à ADN se déplacent d'un site d'ADN à un autre en utilisant une transposase et une protéine de réparation pour être couper-coller ailleurs dans le génome [Etcheverry, 2013].

Les rétrotransposons sont caractérisés par un mode de transposition faisant intervenir un intermédiaire ARN et une étape de transposition inverse [Saint leandre, 2016]. En fait, un locus portant des séquences de rétrotransposons est transcrit en ARN intermédiaires qui subissent une transcription inverse pour donner un ADN capable, via une intégrase, de se transposer à une nouvelle position du génome. Ce mécanisme de transposition, copier-coller, engendre un grand nombre de copies ce qui peut expliquer, en partie, la prédominance des rétrotransposons dans le génome. Les rétrotransposons sont classés en trois classes : les rétrotransposons LTR (*long terminal repeat*) qui représentent environ 21% du génome humain, les SINEs (*non-LTR non autonomous short interspersed elements*) qui représentent environ 13% du génome humain et les LINEs (*non-LTR autonomous long interspersed elements*) [Etcheverry, 2013].

Différents systèmes de défense existent dans les cellules germinales pour contrôler l'expansion préjudiciables de ces éléments transposables notamment la méthylation de l'ADN, les

modifications post-traductionnelles des histones, et un système de défense particulier basé sur l'utilisation des petits ARN appelés piARN (PIWI interacting RNA). L'action de ces derniers pourrait être comparée à celle d'un système immunitaire à l'échelle du génome [Iwasaki et al., 2015].

1.3.2. La voie PIWI-piARN

La voie PIWI-piARN est une voie de répression majeure des éléments transposables dans les gonades animales [Senti et al., 2015]. Les piARNs sont des petits ARN produits à partir d'ARN simple brin dérivés de centaines de locus génomiques de piARN. Les piARNs peuvent également être produits à partir d'ARNm dont la production est largement limitée à des régions 3'UTR. Les piARNs guident les protéines PIWIs vers des ARN cibles complémentaires pour initier leur répression [Senti et al., 2015]. Les piARNs s'associent avec les protéines PIWI pour former des complexes ribonucléoprotéiques, piRISC (piRNA-induced silencing complex), impliqués notamment dans la répression des rétrotransposons au sein de la lignée germinale mâle [Iwasaki et al., 2015].

1.3.2.1. Les protéines PIWIs

Les protéines PIWIs (Piwi like RNA-mediated gene silencing) appartiennent à la famille des protéines Argonautes (Figure 11). Elles sont exprimées dans un large éventail d'organismes, des éponges à l'être humain [Malone et al., 2009; Malone and Hannon, 2009; Siomi et al., 2011]. Contrairement aux Argonautes, les PIWI présentent des motifs riches en arginine dans leur extrémité N-terminale. Le niveau d'expression et le nombre des protéines PIWI varient d'une espèce à une autre. Elles sont généralement exprimées dans la lignée germinale [Iwasaki et al., 2015].

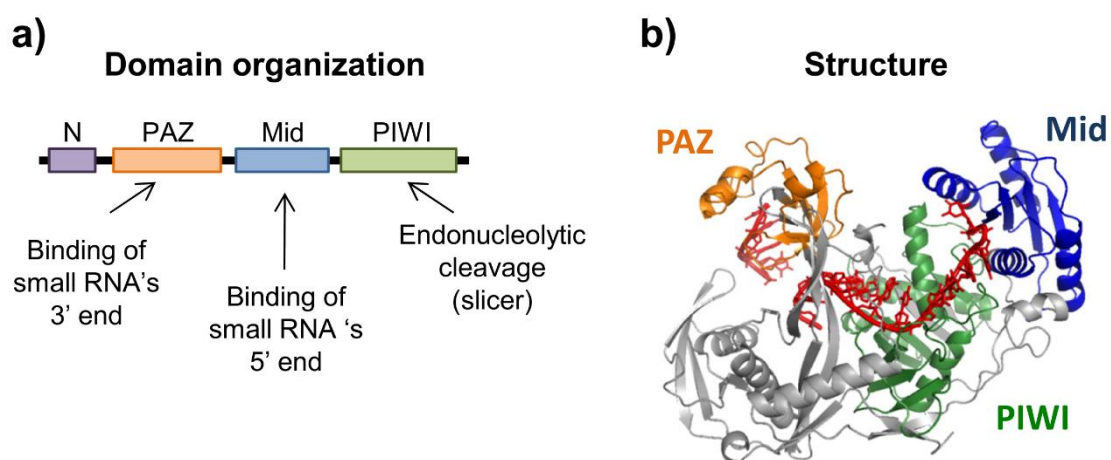


Figure 11: La famille des protéines Argonautes

a) Organisation des domaines caractéristiques des protéines Argonautes, b) Représentation de la structure de la protéine Argonaute de *Thermus thermophilus* (PDB Code: 3DLB) [Xiol, 2011]

Chez la drosophile, trois types de protéines PIWIs sont exprimées dans la lignée germinale mâle et femelle : la protéine nucléaire PIWI et les protéines cytoplasmiques Aubergine (AUB) et Argonaute 3 (AGO3) (Figure 12). Elles sont généralement responsables de la répression de transcription des transposons dans les ovaires. On pense que cette répression se produit par l'interaction des complexes PIWI-piARN avec des transcrits complémentaires situés à proximité des régions chromosomiques qui les ont produits. La perte de fonction d'un seul type de protéine PIWI induit une altération de l'ovogenèse et de la spermatogenèse, ce qui cause une infertilité [Cox et al., 1998; Li et al., 2009; Lin and Spradling, 1997; Schmidt et al., 1999; Schupbach and Wieschaus, 1991].

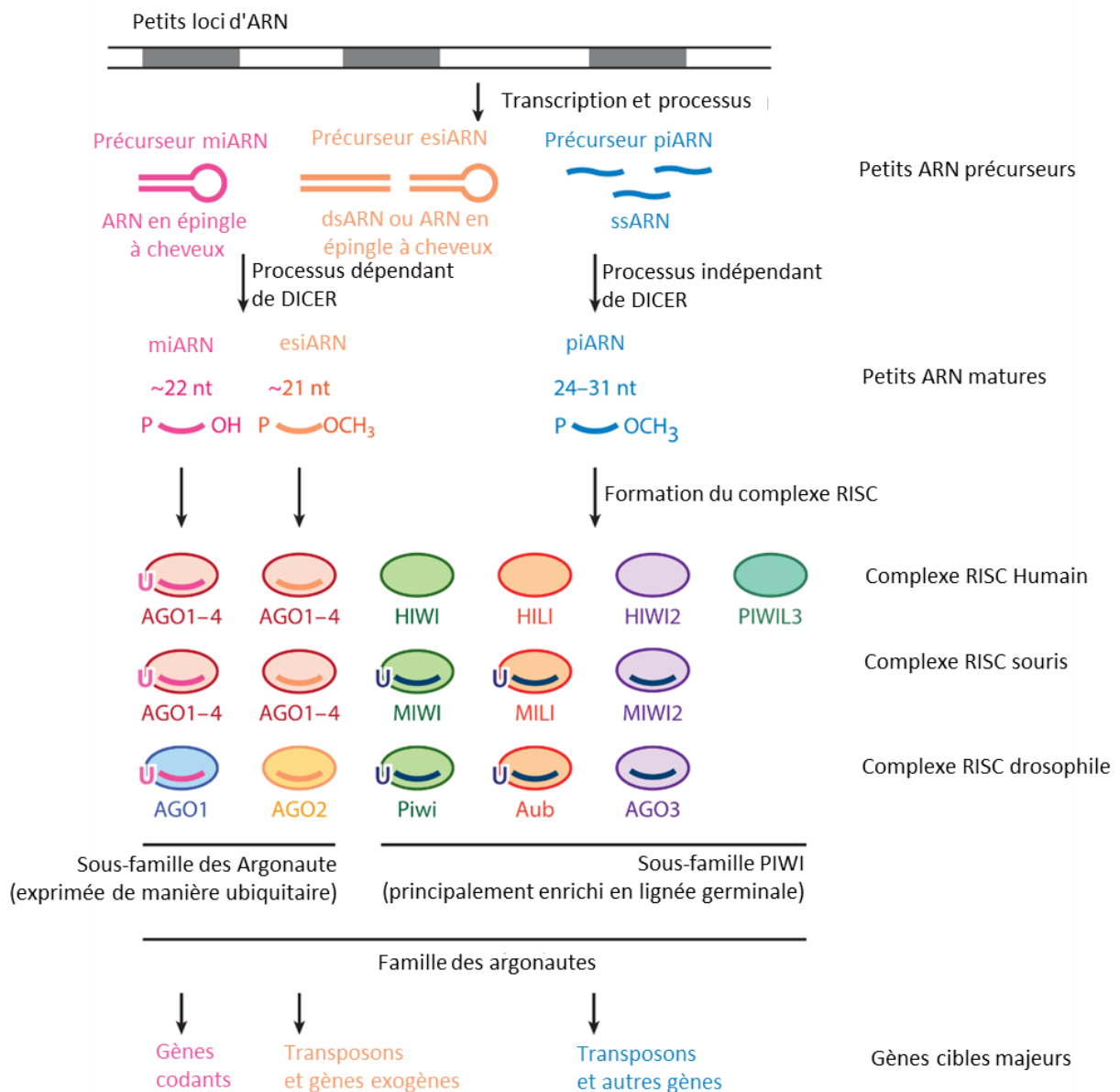


Figure 12: Schéma représentant les petits ARN interférents, leurs protéines partenaires de la famille Argonaute, leurs complexes RISC et leurs gènes cibles

[Iwasaki et al., 2015]

Contrairement à la drosophile, l'expression des protéines PIWIs de souris est largement limitée aux testicules et l'inactivation des gènes *PIWIs* ne conduit qu'à une infertilité masculine [Carmell et al., 2007]. En effet, les souris expriment, eux aussi, trois types des protéines PIWIs : MIWI, MILI et MIWI2. La protéine MILI est détectée dans les souris mâles et femelles, alors que les protéines MIWI et MIWI2 se trouvent exclusivement dans les cellules germinales mâles [Kuramochi-Miyagawa et al., 2001]. Chez l'être humain, on distingue quatre types des protéines PIWIs : PIWIL1, PIWIL2, PIWIL3 et PIWIL4. Ils sont également connus sous les noms HIWI1, HILI, HIWI2 et HIWI3. Ces protéines se caractérisent par quatre domaines : le domaine N-terminal, le domaine PAZ, le domaine MID et le domaine PIWI [Meister, 2013]. Les deux domaines PAZ et MID sont responsables de la fixation des piARNs tandis que le domaine PIWI est semblable à la ribonucléase H (RNase H) (Figure 11) [Cora et al., 2014].

1.3.2.2. Les ARN interagissent avec PIWI (piARN)

Les protéines PIWIs interagissent avec une classe spécifique de petits ARN non codants appelés piARN (ARN interagissant avec PIWI) pour former le complexe ribonucléoprotéique piRISC [Aravin et al., 2006; Grivna et al., 2006; Lau et al., 2006]. Ils sont largement retrouvés dans tout le règne animal, chez l'être humain, la souris, le poisson, le ver, le rat et même chez les animaux plus simples, comme les éponges (*Amphimedon queenslandica*) et l'anémone de mer (*Nematostella vectensis*), mais pas chez les champignons ou les plantes [Grimson et al., 2008].

Les piARN sont légèrement plus longs que le miARN (24–32 nt de long) et différents, en termes de biogenèse et de fonction, des autres petits ARN tels que les siARNs. Les piARNs possèdent, au niveau de l'extrémité 3', un groupement 2'O-méthyl permettant ainsi leur reconnaissance par les protéines PIWI. Bien que les piARNs aient été découverts en 2006 en tant que petits ARN non codants interagissant spécifiquement avec les PIWI, leurs voies moléculaires, ainsi que les facteurs influençant leurs biogenèses et leurs fonctions restent insaisissables. Ils sont beaucoup plus divers que celles de toute autre classe connue d'ARN cellulaires et constituent la plus grande classe d'ARN non codants, environ 1 millions de séquence unique [Iwasaki et al., 2015].

Des études par séquençage ont montré que les piARNs proviennent d'un nombre limité de locus connus sous le nom de piARN clusters par un mécanisme indépendant de DICER [Suzuki et al., 2012]. Ces clusters sont localisés dans des régions riches en répétitions ou dans des régions intergéniques et mesurent entre quelques kilobases à plus de 100 kilobases de long. Les piARNs clusters hébergent un grand nombre et divers types de transposons. Et par conséquent, les piARNs régulent principalement l'activité des transposons, à savoir leur expression et leur mobilité dans le génome. Étant donné que la mobilité des transposons présente un risque élevé d'endommager le

génomique de manière intracellulaire, la régulation des transposons par l'intermédiaire des piARNs est essentielle pour préserver une gamétogenèse [Iwasaki et al., 2015].

1.3.2.3. Le complexe piRISC

L'interaction des protéines PIWI avec les piARNs permet la formation du complexe piRISC qui participe à deux mécanismes distincts : un mécanisme primaire qui va permettre la répression post-transcriptionnelle des éléments transposables et un mécanisme secondaire qui va permettre l'amplification de la réponse contre ces éléments via la génération des nouveaux piARN à partir des transcrits cibles (Figure 13) [Iwasaki et al., 2015].

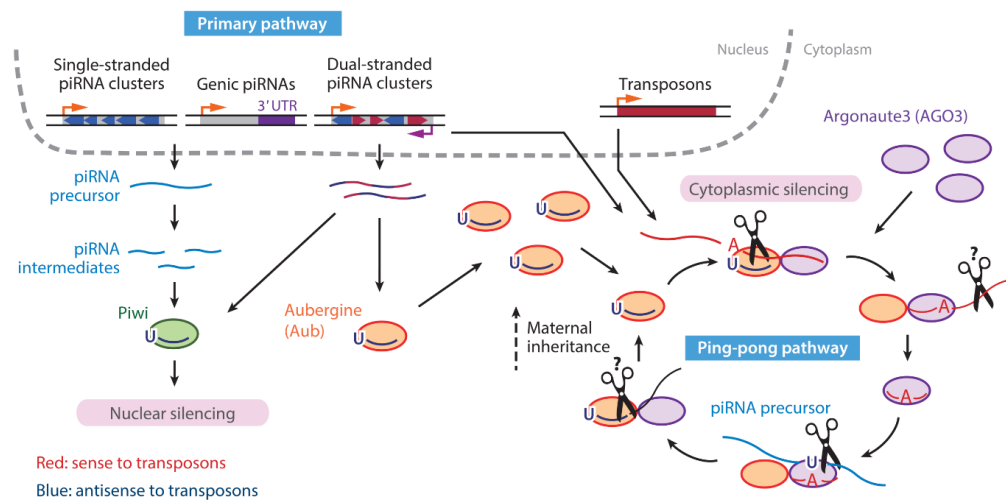


Figure 13: Mécanisme primaire et secondaire de la production des piARN

[Iwasaki et al., 2015]

Le mécanisme primaire est un mécanisme peu connu. Chez la drosophile, il a été démontré que la première étape de maturation des piARNs se fait dans le cytoplasme. Les piARNs précurseurs sont coupés pour donner des « *piRNA like small RNA* » par l'action d'une endonucléase Zucchini ou Zuc située près de la mitochondrie, d'une granule cytoplasmique appelée Flam et du corps Yb. Les Zuc marquent l'extrémité 5' de piARN par un groupement monophosphate [Nishimasu et al., 2012; Ipsaro et al., 2012]. Les protéines PIWIs, assistées par les protéines chaperonnes HSP90, prennent en charge ces fragments d'ARNs. Ensuite une exonucléase 3'-5', coupe l'extrémité 3' de ces ARN, permettant ainsi leur méthylation à la position 2' de l'extrémité 3' par la méthyltransférase Hen1 (ou small RNA 2'-O-methyltransferase), afin de les protéger contre la dégradation et former un complexe piRISC actif [Horwich et al., 2007]. Mohn. et al ont montré que cette exonucléase peut être également la protéine Zuc, et que ses coupures engendrent des nouveaux piARNs primaires appelé Trail-piARNs. Ces derniers vont permettre une amplification de la réponse. D'autres études ont révélé que les facteurs (Armi, une hélicase) et Yb (somatic piRNA biogenesis factor) permettent l'identification des précurseurs piARN lorsqu'ils sont associés à un transcrit (Figure 14) [Pandey et al., 2017].

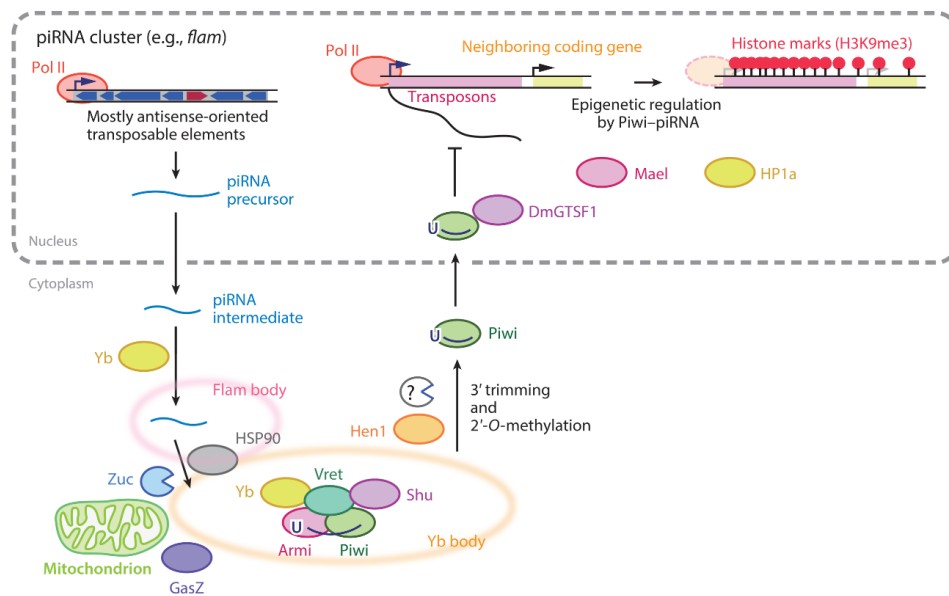


Figure 14: Le mode de régulation épigénétique des éléments transposables par la voie PIWI-piARN

[Iwasaki et al., 2015]

Le complexe piRISC actif gagne le noyau et induit la répression des promoteurs des éléments transposables en modifiant les histones par H3K9me3 et l'insertion de pol2 dans la séquence cible.

Plusieurs facteurs, tels que DmGTSF1, Mael et HP1a, sont impliqués dans ce processus, mais le mécanisme reste peu clair [Olivieri et al., 2010; Iwasaki et al., 2015].

Dans le cas où le complexe piRISC est formé par la protéine Aubergine, il amplifie les séquences de piARNs. Ce mécanisme secondaire se produit au niveau du cytoplasme et vise les ARNs issus des éléments transposables. Ces derniers vont être clivés via une action endonucléolytique au niveau du 10^{ème} nucléotide qui s'apparie avec les piARNs à partir de l'extrémité 5', ce qui engendre des nouveaux précurseurs piARNs. Ces derniers seront alors pris en charge par la protéine AGO3 et subissent une maturation au niveau de leurs extrémités 3'. Le nouveau complexe piRISC associé avec AGO3 agit alors, avec Aubergine, sur l'ARN du transposon cible donnant naissance à un piARN secondaire. Ce dernier sera, à son tour, capable de cliver le brin antisens de sa séquence cible par complémentarité de base. Ce cycle, appelé ping-pong, se poursuit tant que les piARNs secondaires reconnaissent et clivent des transposons afin de générer de grande quantité de piARN pour permettre une répression efficace. La reconnaissance spécifique des brins sens et antisens par les protéines AUB et AGO3 est un mécanisme qui reste encore inconnu [Iwasaki et al., 2015].

2. Le développement des appareils génitaux

Chez l'être humain, la mise en place de l'appareil génital commence, à la 3^{ème} semaine de développement embryonnaire, par le développement d'une gonade indifférenciée et identique chez les embryons XX et XY, appelée crête génitale. Si l'embryon est XX, la gonade se différenciera en ovaires, les canaux de Müller persisteront et se différencieront en utérus, en trompes de Fallope, en col de l'utérus et en vagin. Néanmoins, si l'embryon est XY, la gonade se différenciera en testicules. Les canaux de Müller régresseront et les canaux de Wolff se développeront en un appareil reproducteur masculin (Figure 15) [Achermann and Hughes, 2016; Donohoue, 2018].

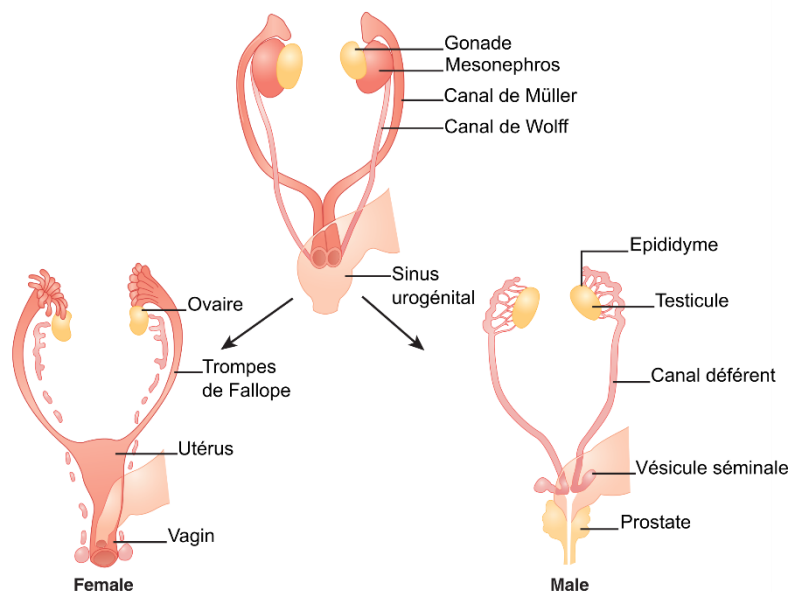


Figure 15: Schéma illustrant la différenciation des organes génitaux masculins et féminins

[Délot and Vilain, 2019]

2.1. Le développement d'un appareil génital indifférencié

La mise en place de la gonade bipotentielle est assurée par deux populations cellulaires : les cellules somatiques de soutien et les cellules germinales primordiales, qui seront à l'origine des gamètes. Les cellules germinales primordiales apparaissent au niveau de l'épiblaste et migrent en région extra embryonnaire, près de l'allantoïde, dès le 10^{ème} - 11^{ème} jour de développement embryonnaire (Figure 16) [De Felici, 2013]. Elles se prolifèrent et passent de quelques dizaines à des centaines entre la 3^{ème} et la 4^{ème} semaine de développement [Hyon, 2016]. Les crêtes génitales se forment, à partir de la 4^{ème} semaine de développement, entre le mésonephros et la racine du mésentère dorsal [Encha-Razavi and Escudier, 2008]. Au cours de la 5^{ème} et la 6^{ème} semaine de développement, les cellules primordiales migrent à nouveau vers les crêtes génitales, ce qui entraîne la prolifération des cellules épithéliales cœlomiques [Zaiat, 2015]. Ces derniers vont entourer, par la suite, les cellules germinales et former les cordons sexuels primitifs. À ce stade, la

gonade présente une morphologie strictement identique chez les deux embryons XX et XY, avec présence de cordons sexuels primitifs [Mouka, 2017]. Un cordon cellulaire plein apparaît à la 4^{ème} semaine de développement au niveau de la partie antérieure du mésoderme intermédiaire. Le cordon se tubulise au cours de sa progression vers la partie caudale de l'embryon pour fusionner avec la paroi postérieure du cloaque et former les canaux de Wolff [Mullen and Behringer, 2014]. Une deuxième paire de canaux apparaît à partir de la 6^{ème} semaine de développement appelés canaux de Müller. Cette paire de canaux se forme latéralement par rapport aux canaux de Wolff [Schoenwolf et al., 2009a].

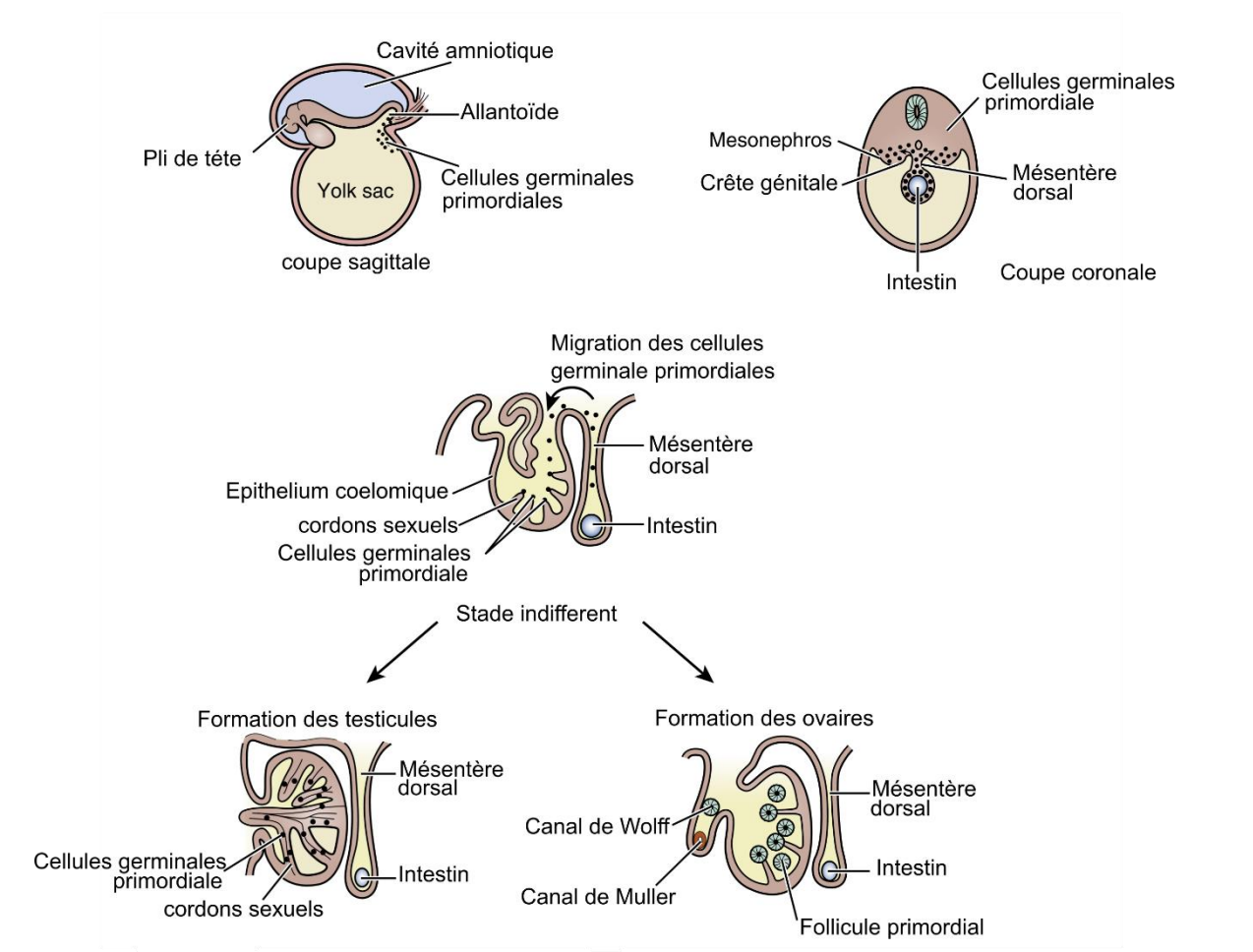


Figure 16: Embryologie des gonades

[Arboleda et al., 2016]

À partir de la 3^{ème} – 4^{ème} semaine de développement, les organes génitaux externes se forment autour de la membrane cloacale à la confluence des voies génitales et urinaires.

À la 5^{ème} semaine de développement, les bourrelets cloacaux se forment de chaque côté de la membrane cloacale par épaissement du mésenchyme caudal qui soulève l'ectoderme de la membrane cloacale [Hyon, 2016]. Les bourrelets cloacaux fusionnent pour former le tubercule génital [Mouka, 2017]. À la 8^{ème} semaine de développement, le sinus urogénital est séparé du canal

ano-rectal par le septum uro-rectal. Une fois séparés, les bourrelets cloacaux sont nommés bourrelets génitaux et la plaque urétrale est apparue. Les replis génitaux, situés en dedans des bourrelets génitaux, se forment autour de la plaque urétrale [Encha-Razavi and Escudier, 2008; Schoenwolf et al., 2009b].

Plusieurs facteurs génétiques sont indispensables à la croissance et la survie précoces des gonades, dont certains sont *NR5A1*, *LHX9*, *WT1*, *CBX2* et *IGF1R* (Figure 17).

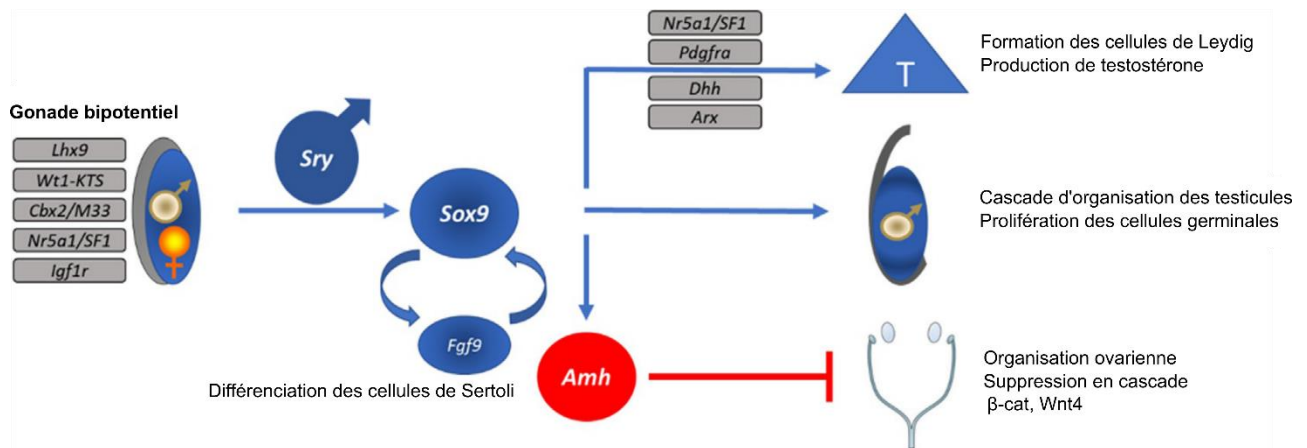


Figure 17: Schéma illustrant les gènes impliqués dans la différenciation de la gonade bipotentielle
[O'Neill et al., 2019]

Le récepteur nucléaire NR5A1 est un facteur de transcription exprimé dans les gonades et dans tous les tissus synthétisant des stéroïdes [Mullen and Behringer, 2014]. La suppression du gène *NR5A1* chez la souris entraîne une agénésie complète des gonades et des glandes surrénales. Il est régulé par le gène *LHX9* (LIM Homebox 9), qui est nécessaire à la formation de la gonade [Orvis and Behringer, 2007]. Le facteur de transcription à doigts de zinc, Wilm's tumor 1 (WT1), en particulier son isoforme WT1-KTS, est également essentiel au développement de la gonade bipotentiels et des reins [Jacob et al., 1999]. WT1-KTS se lie en coopération avec LHX9 au promoteur NR5A1. Le gène *CBX2* (Chromobox homolog 2) joue également un rôle clé [Kobayashi and Behringer, 2003]. Les embryons dépourvus de ce gène ont une expression réduite de NR5A1 et LHX9, ce qui entraîne des défauts de croissance des gonades. Des déficits de développement gonadique sont également observés chez des souris dépourvues des facteurs de la voie de signalisation insuline/IGF, plus spécifiquement du récepteur de l'insuline (INSR) et du récepteur de l'IGF (IGF1R) [Kobayashi et al., 2004].

2.2. Le développement de l'appareil génital masculin

2.2.1. Le développement testiculaire

À la 7^{ème} semaine de développement embryonnaire, les cellules somatiques de la gonade bipotentielle commence à se différencier en cellules de Sertoli. Ces derniers vont se polariser et établir des jonctions intercellulaires, ce qui conduit à l'englobement des cellules germinales primordiales et à la formation des cordons séminifères [Wilhelm et al., 2007]. En effet, le chromosome Y a une région spécifique, la région déterminante du sexe ou (*SRY*), qui pousse la gonade bipotentielle à se différencier en testicules, en induisant la différenciation des cellules de sertoli. *SRY* régule positivement *SOX9* qui stimule l'expression du facteur de croissance des fibroblastes 9 (*FGF9*). Le *SOX9* et le *FGF9* agissent ensemble dans une boucle de régulation positive pour promouvoir la survie des cellules germinales primordiales, empêcher l'entrée des cellules germinales primordiales dans la méiose et supprimer le développement des ovaires [Achermann and Hughes, 2016].

DAX1 et *NR5A1* sont des facteurs supplémentaires qui régulent positivement l'expression de *SOX9*. *SOX9* et *NR5A1* activent l'expression de l'*AMH*. *WT1-KTS* et *GATA4* régulent également l'expression de l'*AMH*. Les cellules de Sertoli sécrètent l'*AMH* dans la crête génitale embryonnaire, provoquant ainsi une régression des canaux de Müller chez le mâle [Achermann and Hughes, 2016].

En général, *SOX9* est nécessaire à la prolifération des cellules de Sertoli, à l'expansion des cellules somatiques, à la migration et à la différenciation du testicule en développement, à la régression du canal de Müller et à la différenciation somatique [Narang et al., 2019].

Les autres types cellulaires présents au niveau de testicule fœtal proviennent à la fois de l'épithélium cœlomique et du mésonephros. Les cellules issus de l'épithélium cœlomique vont contribuer à l'augmentation du volume de la gonade, alors que les cellules dérivant du mésonephros vont contribuer à la mise en place de l'architecture gonadique [Karl and Capel, 1998; DeFalco et al., 2011]. En effet, la migration de cellules endothéliales mésonephrotique va induire la compartimentation de la gonade et donner naissance aux cordons testiculaires tout en assurant la vascularisation du testicule [Martineau et al., 1997]. Les cellules myoïdes périvitubulaires, différencier à partir des cellules mésonephrotiques, contribuent, avec les cellules de Sertoli, à la mise en place de la membrane basale qui entoure les cordons testiculaires [Achermann and Hughes, 2016].

L'origine exacte des cellules de Leydig, qui sont responsable de la synthèse des stéroïdes gonadiques, n'est pas complètement établie. En effet, les cellules de Leydig se différencient à

partir des cellules du mésenchyme. Ces derniers ont probablement une double origine, certaines cellules proviennent de l'épithélium coelomique et d'autres du mésonéphros [Karl and Capel, 1998; DeFalco et al., 2011]. Plusieurs facteurs sont impliqués dans la différenciation des cellules de Leydig, Notamment, le DHH et le PDGF responsables à la régulation positive de cette différenciation, NOTCH2 et WNT4 responsables à la régulation négative de la même différenciation [Vainio et al., 1999; Gnessi et al., 2000; Clark et al., 2000; Canto et al., 2004; Brennan et al., 2003, 2003; Tang et al., 2008; Narang et al., 2019].

2.2.2. La migration testiculaire

Au cours du développement embryonnaire, les gonades sont initialement ancrées en haut dans l'abdomen, près des reins, puis fixées au canal inguinal par le biais d'un ligament cylindrique appelé gubernaculum (Figure 18). Bien que les gonades soient encore indifférenciées, il existe une migration passive, indépendante des hormones, qui se produit chez les deux sexes. Cette migration initiale est étroitement liée à la descente du diaphragme et marque la seule descente qui se produit dans le développement gonadique femelle [Nakaya et al., 2008]. Chez les hommes, la maturation des gonades nécessite une descente supplémentaire dans le scrotum. Cette descente est régulée de manière hormonale et elle est biphasique [Narang et al., 2019].

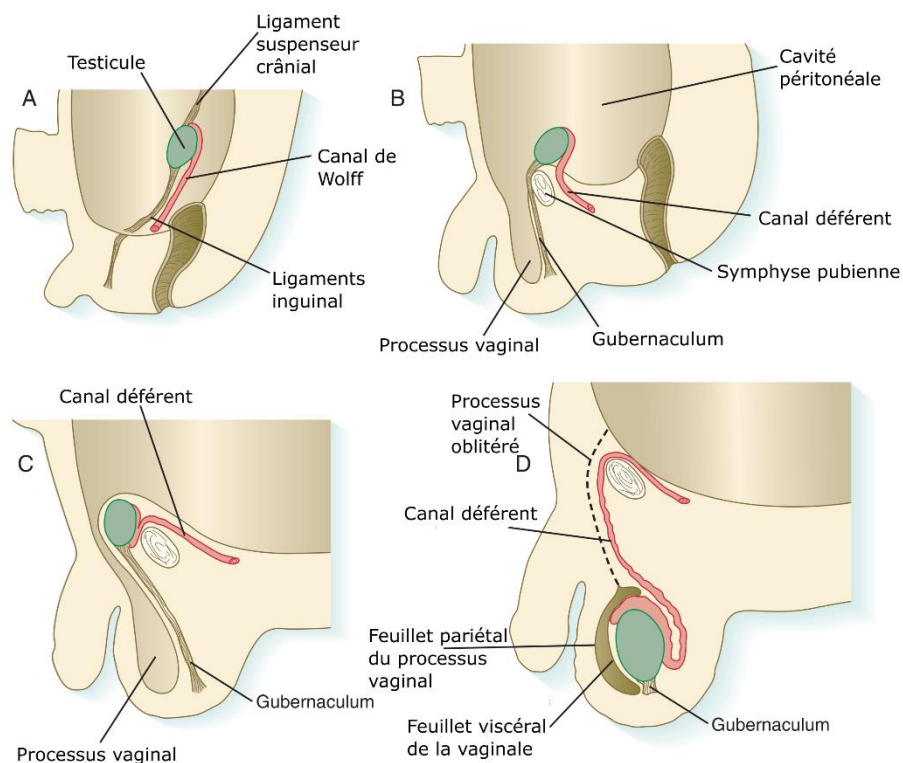


Figure 18: Migration testiculaire chez le fœtus mâle

A) au cours du deuxième mois. B) au troisième mois C) au septième mois. D) à la naissance [Carlson, 2014].

2.2.2.1. La phase transabdominale

Le phase transabdominale de la migration testiculaire (ou descente testiculaire) se produit entre la 10^{ème} et la 15^{ème} semaine de gestation chez l'homme. Elle s'appuie sur le développement gubernaculaire hormono-dépendant. Le développement testiculaire se produit sur la surface antéromédiane du mésonéphros dans la crête urogénitale [Narang et al., 2019].

Au début de la différenciation sexuelle, le gubernaculum se développe, alors que le mésonéphros régresse. Le gubernaculum se fixe ensuite au testicule et au canal de Wolff (Figure 19). Le canal de Wolff devient l'épididyme, le canal déférent, l'uretère, le trigone et l'urètre proximal. La descente du testicule est initiée par un gonflement gubernaculaire, qui survient en réponse à l'acide hyaluronique et aux glycosaminoglycanes [Ayers et al., 2015, 1]. Le gubernaculum s'allonge et pousse le testicule et l'épididyme vers l'anneau inguinale. Pendant ce temps, la partie caudale du gubernaculum se gonfle également en élargissant le canal inguinal pour préparer le passage transinguinale du testicule [Warot et al., 1997].

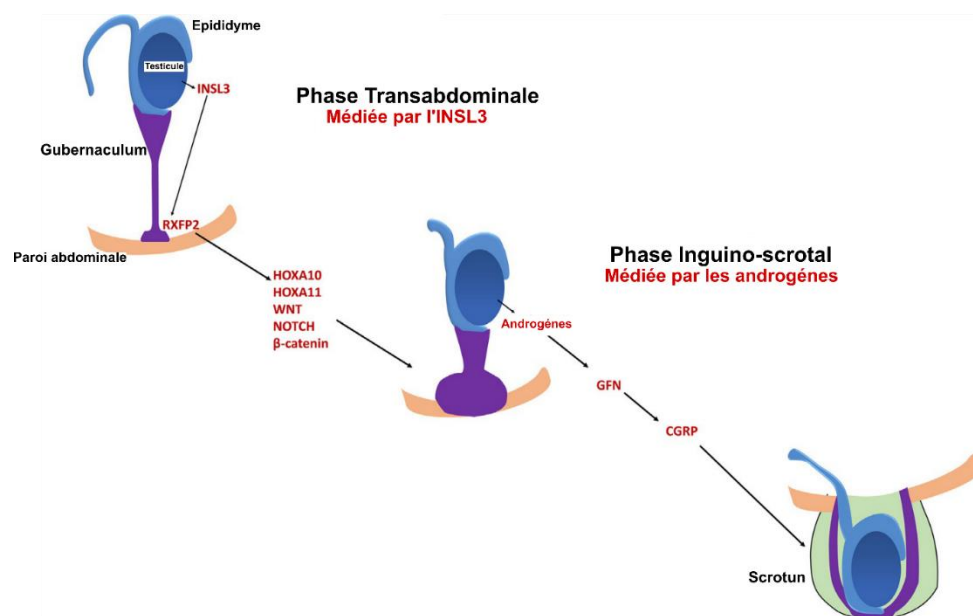


Figure 19: Schéma illustrant les gènes impliqués dans la migration testiculaire

[O'Neill et al., 2019]

L'Insulin-like 3 (INSL3), produite par les cellules de Leydig, est l'hormone clé de la migration transabdominale. Les expériences menées sur des souris ont permis de comprendre son importance dans la descente testiculaire [Behringer et al., 1994]. L'INSL3 est produite dans les testicules par les cellules de Leydig et transmet des signaux via le RXFP2 (Relaxin Family Peptide Receptor 2). En effet, le RXFP2, un récepteur couplé à la protéine G, est exprimé dans le gubernaculum. Il augmente le taux de l'AMPc intracellulaire, initie la signalisation des voies de la β-caténine, du WNT et de la NOTCH (Figure 19) [Behringer et al., 1994; Catlin et al., 1997].

La croissance du gubernaculum de la paroi inguinale est analogue à la croissance du bourgeon de membre embryonnaire. Le gubernaculum est une structure conique allongée composée d'une matrice extracellulaire et des cellules mésenchymateuses comprenant principalement des fibroblastes et des cellules musculaires. La prolifération gubernaculaire est contrôlée par le peptide apparenté au gène de la calcitonine (*CGRP*) [O'Neill et al., 2019].

L'inactivation du gène *HOX11* chez les souris conduit à une cryptorchidie, ce qui suggère un rôle important de *HOX11* dans la descente testiculaire [O'Neill et al., 2019]. La β -caténine, le *TNT* et le *NOTCH* sont également des facteurs importants de prolifération mésenchymateuse gubernaculaire en aval de l'*INSL3* [Catlin et al., 1997]. La voie de signalisation *NOTCH* est également nécessaire pour la croissance du processus vaginal, une petite évagination du péritoine, qui constitue une voie de passage pour le testicule descendant.

2.2.2.2. La phase d'Inguino-scrotal

Au cours des semaines 22-25 de gestation, les testicules et les épидидymes sont positionnés au niveau des anneaux internes du canal inguinal. La deuxième phase de la descente, la phase inguino-scrotale, survient, après une brève pause, entre les semaines 25 et 35. Les testicules, l'épididyme et le gubernaculum vont se déplacer, tous ensemble, dans le canal inguinal. Le gubernaculum va alors se contracter, ce qui permet un changement de pression permettant le passage transinguinale. Après le passage, le gubernaculum deviendra fibreux [O'Neill et al., 2019]. Les gonadotrophines du placenta et de l'hypophyse fœtale jouent un rôle important dans la régulation de la production testiculaire d'androgènes, ainsi que de l'*INSL3* et l'*AMH* [Connell et al., 2013; Moore et al., 2015].

2.2.3. Le développement des organes génitaux externes

Au cours du 3^{ème} mois du développement embryonnaire, le tubercule génital s'allonge pour former le pénis. Lors de cet allongement, la fente uro-génitale s'étire et les replis génitaux se rapprochent pour former une gouttière ouverte à la face inférieure du pénis. À la fin de la 14^{ème} semaine, la gouttière se ferme et devient l'urètre pénien. Ce dernier s'entoure du corps spongieux, une masse de tissu mésenchymateux érectile, qui se prolonge dans l'extrémité du pénis pour former le gland, qui sera recouvert par un repli appelé le prépuce. Ce repli s'invagine en direction de l'urètre pénien et se creuse pour former l'urètre balanique [Yamada et al., 2003]. Les bourrelets labio-scrotaux fusionnent sur la ligne médiane, avec formation d'un raphé qui se prolonge à la base du pénis, et forment le scrotum (Figure 20) [Encha-Razavi and Escudier, 2008; Schoenwolf et al., 2009b].

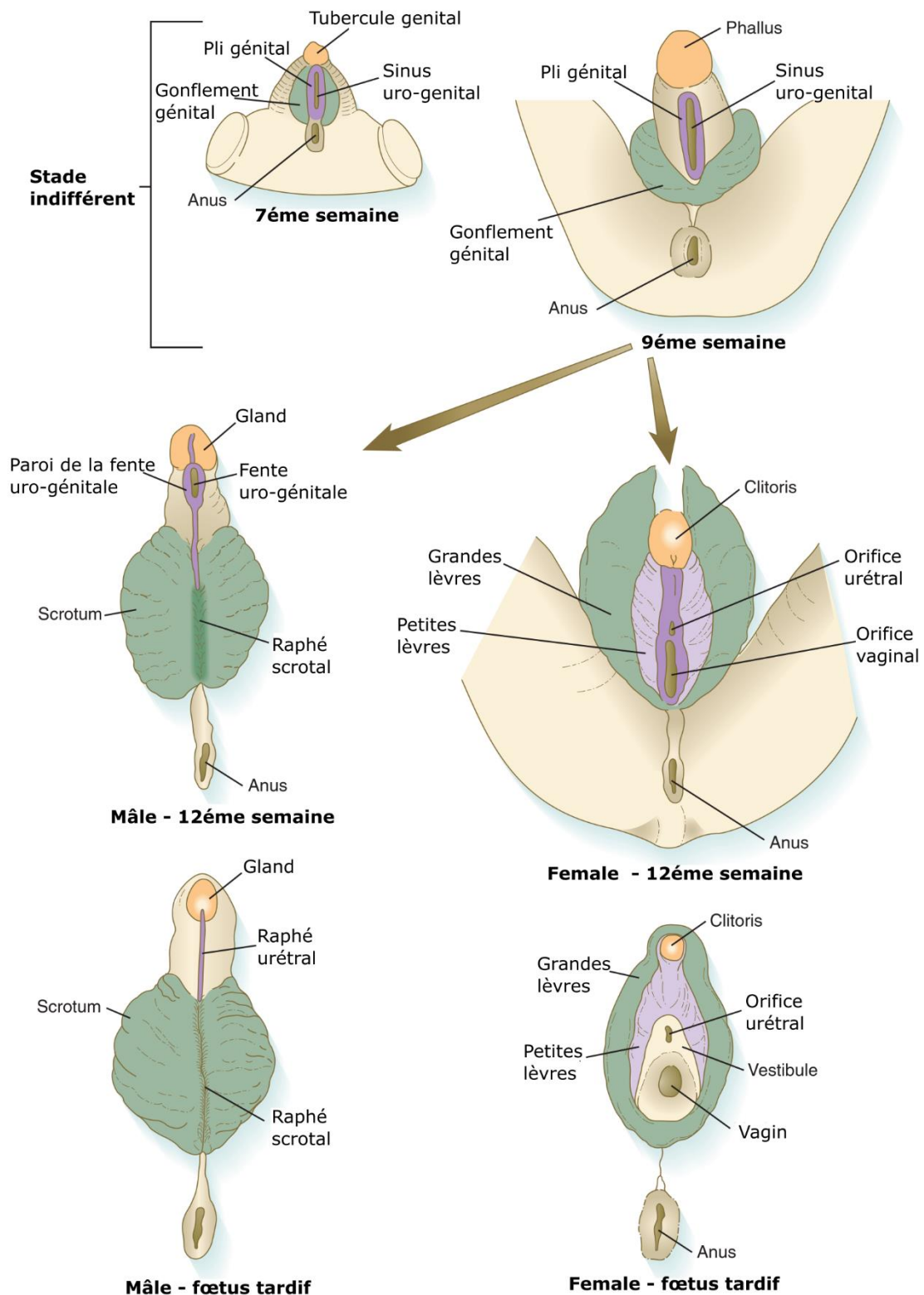


Figure 20: Différenciation des organes génitaux externes chez l'homme

[Carlson, 2014]

Plusieurs facteurs génétiques sont impliqués dans le développement du tubercule génitale dont *HOXa13*, *HOXd13*, *SHH*, *SMO*, *GFJ10*, *FJFR2* et *SRD5A2*. En effet, les isoformes de la protéine HOX13 (*HOXa13* et *HOXd13*) jouent un double rôle dans le développement du tubercule génital : un rôle dans le mésenchyme génital et un rôle dans la fermeture de la gouttière et la formation de

l'urètre pénien. Les deux isoformes sont exprimés, durant le développement du tubercule génital, dans la plate urétrale et dans le mésenchyme qui l'entoure [Spitz et al., 2003]. La suppression de l'un de ces isoformes entraîne une malformation du tubercule génitale, mais la suppression des deux isoformes conduit à une agénésie pénienne appelée aphallia [Hughes et al., 2006].

La protéine SHH est exprimée au niveau de l'épithélium urétral [Seifert et al., 2009]. Les souris KO pour *SHH* sont dépourvues d'organes génitaux externes et ont un cloaque persistant [Perriton et al., 2002]. La protéine SHH joue aussi un double rôle : le premier, au cours de la phase anogénital, où la protéine SHH régule la croissance, la formation du tubercule génital et la septation du cloaque, et le second, dans une phase génitale ultérieure, où elle régule la fermeture du tube urétral [O'Neill et al., 2019]. De plus, l'inactivation conditionnelle de SMO, un récepteur indispensable pour les voies de transduction intracellulaire de SHH, dans l'ectoderme génital et l'endoderme cloacal/urétral montre que l'ectoderme est une cible directe de SHH, et qu'il est nécessaire pour la fermeture du tube urétral [O'Neill et al., 2019].

Aussi bien, la protéine FGF10 et son récepteur FGFR2, exprimés au niveau du mésenchyme, ont été décrits comme étant nécessaires pour la fermeture du tube urétral [Petiot et al., 2005]. En effet, il a été démontré que l'interaction de FGF10 avec FGFR2 est nécessaire pour la formation du prépuce [O'Neill et al., 2019].

L'AR est exprimé dans le mésenchyme génital, dans la surface ventrale du tubercule génital en croissance et dans la surface ventrale des plis urétraux [Kim et al., 2002; Sajjad et al., 2004]. Les souris KO pour le gène *AR* présentent des organes génitaux externes féminisés, une réduction du poids des testicules et une absence de tractus génital causée par une dégénérescence des canaux de Wolff [Yeh et al., 2002].

2.3. Le développement de l'appareil génital féminin

2.3.1. Le développement ovarien

Le développement ovarien intervient, chez un embryon XX, plus tardivement que le développement testiculaire, chez un embryon XY. En absence du chromosome Y, et par conséquent de la production de SRY, les gonades bipotentielles se différencient en ovaires. Cela crée un environnement dépourvu d'AMH et de testostérone [Narang et al., 2019].

Le développement ovarien commence par la fragmentation très rapide des cordons sexuels primitifs en amas cellulaire, dans lesquelles on trouve des cellules germinales primordiales. À la 9^{ème} semaine de développement, il y a apparition d'une seconde génération de cordons sexuels dits cordons sexuels corticaux qui, eux aussi, subissent une fragmentation et enferment les autres cellules germinales primordiales. Les cordons sexuels situés en profondeur dans la zone médullaire

régressent. Les cellules germinales primordiales se transforment en 5 mois en ovocytes primaires qui forment, avec les cellules dérivées des cordons sexuels qui les entourent, les follicules primordiaux. Les connexions avec le mésonéphros (le rete ovarii) régresse rapidement, en même temps que les derniers tubules mésonéphrotiques, de telle sorte qu'il n'y a plus de lien entre l'ovaire et le sinus urogénital [Narang et al., 2019].

Les facteurs génétiques impliqués dans le développement ovarien restent à ce jour peu connus. En effet la voie de signalisation WNT/ β -caténine joue un rôle dans le développement de l'ovaire. En plus d'être impliqués dans le développement des gonades indifférenciées, le gène *WNT4* est un antagoniste du développement testiculaire. Il diminue l'expression de *SOX9* et de l'AMH en empêchant la fixation de NR5A1 sur une séquence d'ADN appelé TESCO (Testis-specific Enhancer of Sox9 Core). Les souris KO pour *WNT4* présentent une réversion sexuelle partielle avec virilisation de la gonade, diminution de nombre des ovocytes et modification des cellules de soutien de la gonade. Les cellules de soutien adoptent des caractéristiques des cellules de Sertoli. Les souris présentent aussi une absence totale d'expression de la FST (follistatine), qui module l'action des activines et des inhibines (Figure 21) [Narang et al., 2019].

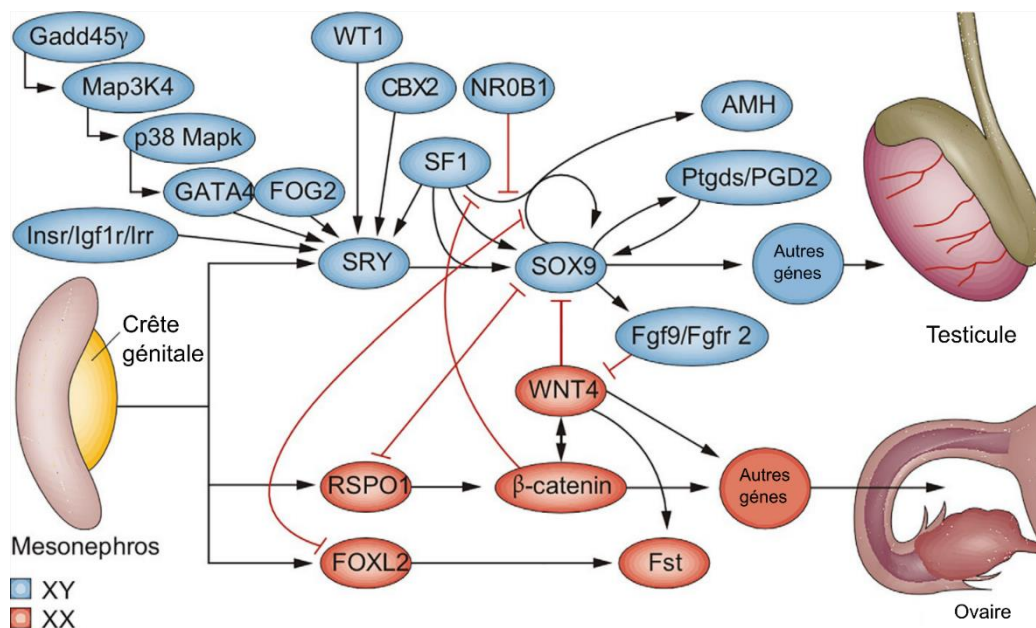


Figure 21: Schéma illustrant les gènes impliqués dans la différenciation des organes génitaux masculins et féminins

[Narang et al., 2019]

La voie de signalisation WNT/ β -caténine est activée par la famille des protéines contenant un domaine furin-like, notamment la *RSP01*. Les souris KO pour *RSP01* présentent un phénotype proche des souris KO pour *WNT4*. Les souris KO pour *RSP01* présentent des vaisseaux cœlomiques caractéristiques de la gonade masculine, des cellules stéroïdogénique fonctionnelles responsable de la persistance des canaux de Wolff, des tubes séminifères dépourvus des cellules

germinales et ont aussi des cellules de Sertoli et de Leydig [Biaison-Lauber, 2012; Chassot et al., 2008b, 2008a]. D'autre part, la surexpression de CTNB1 et la stabilisation de la β -caténine, chez des souris XY, induisent un blocage des voies de signalisation du développement testiculaire, SOX9/FGF9, et par conséquent une réversion sexuelle [Maatouk et al., 2008].

Le facteur de transcription FOXL2 joue aussi un rôle dans le développement ovarien. Ce rôle a été confirmé après l'inactivation du gène FOXL2 chez une chèvre XX. Cette dernière présentait une réversion sexuelle dans le sens femelle-male, faisant de ce gène un gène essentiel pour le développement ovarien [Zaiat, 2015]. En 2011, Kashimada et al. ont montré le rôle de FOXL2 dans la régulation de l'expression de FST en proposant ainsi un schéma de co-régulation de l'expression de FST par WNT4 puis par FOXL2 [Kashimada et al., 2011].

2.3.2. *Le développement des organes génitaux internes*

En absence de chromosome Y, et par conséquent de l'expression de SRY et SOX9, la production d'AMH et de testostérone n'est pas déclenchée, ce qui entraîne la persistance des canaux de Müller et la régression des canaux de Wolff. En effet, l'expression de MSH homeobox 2 (MSX2) déclenche la régression du canal de Wolff [Yin et al., 2006]. C'est un processus qui nécessite l'activité du récepteur nucléaire orphelin COUP-TFII (NR2F2) [Zhao et al., 2017]. Les canaux de Müller se développent en 3 phases : la fusion, la canalisation et la résorption du septum pour former l'utérus, les trompes de Fallope bilatérales et la partie interne du vagin [Narang et al., 2019].

La première étape est caractérisée par la fusion des deux canaux de Müller. En effet, le canal allongé peut être divisé en régions céphalique, horizontale et caudale. La région céphalique s'élargit et reste ouverte dans la cavité coelomique et devient les fimbriae des trompes de Fallope. La région horizontale forme le reste du trajet de la trompe et entraîne un repli du péritoine qui deviendra le ligament large au moment de la bascule de l'ovaire. Les régions caudales fusionnent pour former le canal utérovaginal qui sera l'origine de l'utérus et de la partie interne du vagin. Une fois fusionnées et canalisées, le septum séparant les deux canaux commence à se résorber de manière céphalo-caudale, donnant naissance à une seule structure tubulaire en forme de Y, l'utérus et les trompes de Fallope (Figure 22) [Narang et al., 2019].

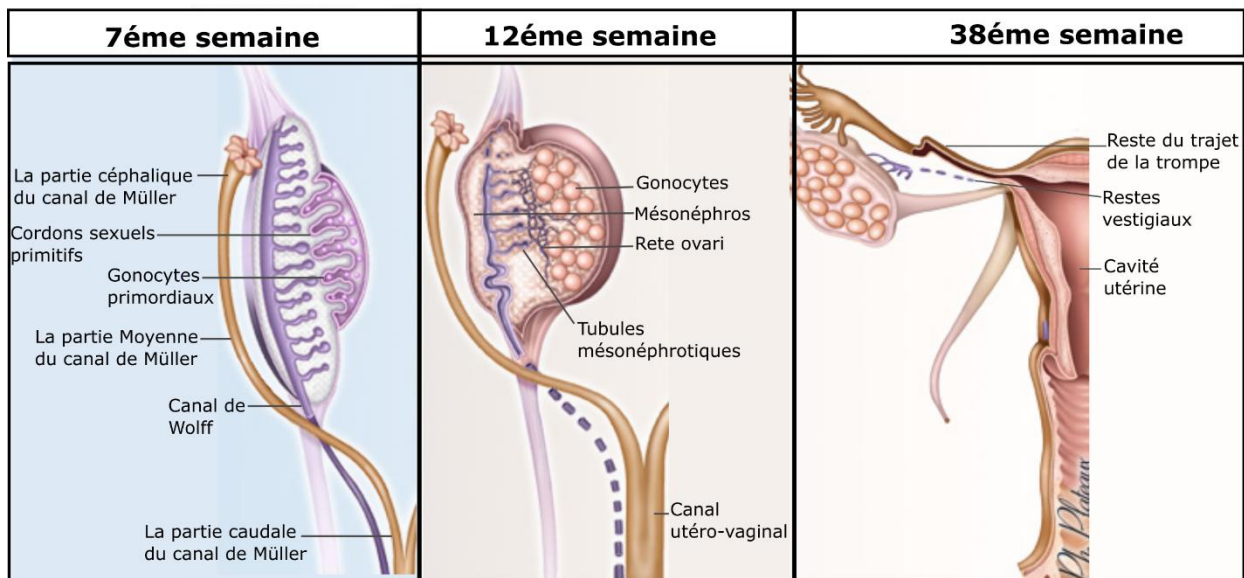


Figure 22: Développement des organes génitaux internes chez la femme

[OrganCh13C1120, 2020]

2.3.3. Le développement des organes génitaux externes

Chez la femme, il y a peu de transformation des organes indifférenciés. Le tubercule génital s'allonge très peu et se repli vers le bas pour former le clitoris. Les replis génitaux restent séparés et forment les petites lèvres, tout comme les bourrelets génitaux qui restent également séparés et forment les grandes lèvres. Le sinus urogénital reste ouvert avec l'abouchement de l'urètre à la partie antérieure et l'orifice vaginal à la partie postérieure [Narang et al., 2019].

3. Les fausses couches spontanées à répétition

Une fausse couche spontanée est la perte spontanée du produit de conception avant sa viabilité entre la conception et la 20^{ème} semaine d'aménorrhée [Tur-Torres et al., 2017]. Environ 15 à 20% des grossesses se terminent par une fausse couche spontanée [Kline et al., 1990; Chard, 1991], et environ 25% à 50% des femmes expérimentent une ou plusieurs fausses couches spontanées, souvent dus à des anomalies chromosomiques du conceptus [Greenwold and Jauniaux, 2002]. Ainsi, la société américaine de médecine de la reproduction (ASRM), le comité international de surveillance des techniques de procréation assistée (ICMART) et l'organisation mondiale de la santé (OMS) définissent les FCSR comme la survenu d'au moins 3 fausses couches spontanées consécutifs. Alors que la société européenne pour la reproduction humaine et l'embryologie (ESHRE) et le collège royal des obstétriciens et gynécologues (RCOG) définissent les FCSR comme la perte de 2 fausses couches spontanées consécutifs [Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, 2013; Zegers-Hochschild et al., 2009].

Il est largement reconnu que les anomalies chromosomiques dans les produits de conception (PC) sont la cause la plus fréquente de toutes les pertes de grossesse, représentant ainsi 70% des

perles sporadiques et environ 40% des perles récurrentes [Boué et al., 1975; Ogasawara et al., 2000]. Parmi les cas de FCSR, la fréquence des fœtus avortés avec un caryotype normale semble importante, ce qui indique la présence d'autres causes majeures qui peuvent entraîner une FCSR d'un fœtus avec un caryotype normale. Parmi les facteurs de risques, on peut citer : les facteurs anatomiques, immunologiques, endocriniens, infectieux et environnementaux [Kasak et al., 2019].

3.1. Les facteurs cytogénétiques

Les anomalies chromosomiques fœtales sont la cause la plus connue de la survenue d'une fausse couche, qui survient principalement avant 10 semaines de grossesse. Elle concerne environ 50 à 70% des couples [Berry et al., 1995]. Les études cytogénétiques sur des produits de conception ont montré que la plupart de ces anomalies se produisent de novo au cours du premier trimestre de la grossesse. En effet, la plupart des anomalies chromosomiques résultent soit d'une erreur méiotique, mitotique ; soit d'une erreur qui survient lors de la fécondation ou bien des réarrangements structurels [Kasak et al., 2019].

Au cours de la méiose, le jeu diploïde parental normal de 46 chromosomes est normalement réduit en 23 chromosomes (haploïde). La survenue d'un événement non disjonctionnels durant la gamétogenèse mâle ou femelle peut conduire à la formation d'un spermatozoïde ou d'un ovocyte avec un chromosome en plus, ou en moins, entraînant par la suite l'apparition d'un produit de conception monosomique ou trisomique (Figure 23). Ainsi, il est connu que, à l'exception de la monosomie X complète, les monosomies autosomiques sont létales au début de la gestation. Le mosaïcisme apparaît souvent suite à une non-disjonction mitotique. Ainsi, en général, l'aneuploïdie en mosaïque est mieux tolérée au cours du développement embryonnaire que l'aneuploïdie complète. La survenue d'une non-disjonction au début de la grossesse peut entraîner un mosaïcisme de fœtus et de placenta alors que sa survenue plus tard peut limiter le mosaïcisme soit au fœtus soit au placenta. Cela dit, un caryotype fœtale normale n'exclut pas la cause cytogénétique si le caryotype du placenta n'est pas établi [Haoud, 2014; Kasak et al., 2019].

Aussi bien, les erreurs survenant au moment de la fécondation peuvent entraîner des grossesses triploïdes, avec un lot chromosomique supplémentaire d'origine maternelle (digynie) ou paternel (diandrie), ou diploïdes anormales dans lesquelles les deux lots chromosomiques proviennent d'un seul parent. Ainsi, différents évènements peuvent conduire à une triploïdie [Haoud, 2014].

Dans le cas de triploïdies d'origine paternelle, l'ovocyte peut être fécondé soit par deux spermatozoïdes haploïdes, dispermie, soit par un spermatozoïde diploïde. D'autre part, les triploïdies d'origine maternelles peuvent résulter d'une fécondation d'un ovocyte diploïde par un spermatozoïde haploïde [Haoud, 2014].

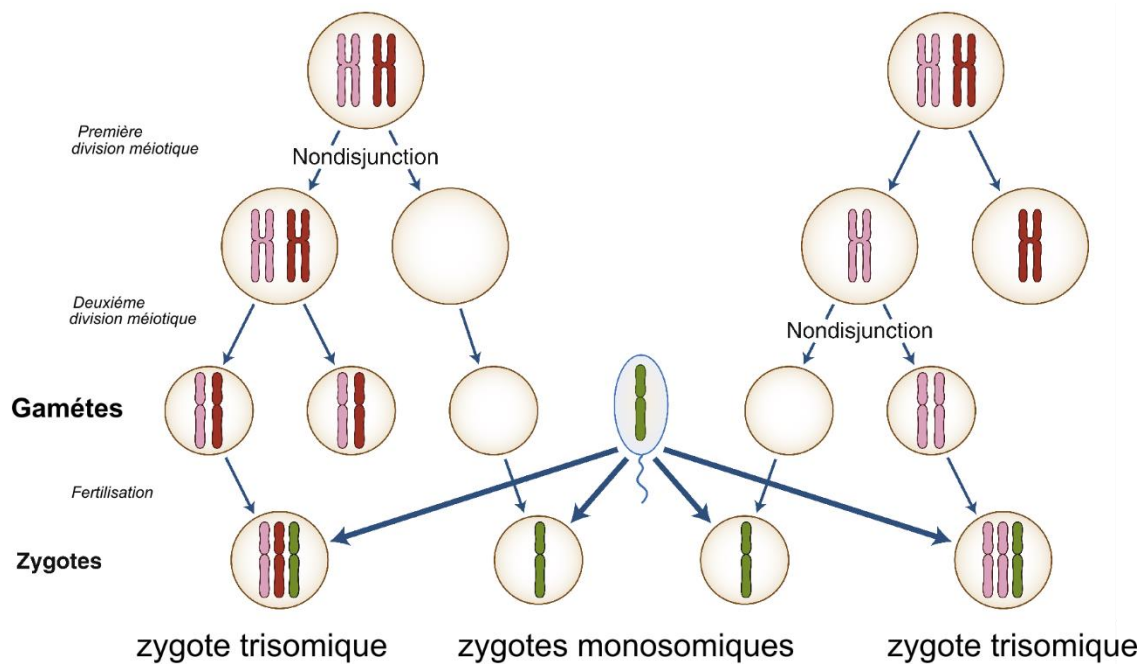


Figure 23: Anomalies chromosomiques au cours de la méiose 1 et 2

[Rosenberg and Rosenberg, 2012]

Les anomalies chromosomiques structurales (Figure 24) sont moins fréquentes que les anomalies chromosomiques de nombre dans les produits de conception. En effet, Jacobs et al ont analysé les résultats de caryotype de 5726 produits de conception et ils ont observé que les réarrangements équilibrés sont présents dans 0,28% des PC et les réarrangements déséquilibrés sont présents dans 1,54% des PC [Jacobs, 1981]. Ainsi, les réarrangements équilibrés dans les PC ne sont pas très fréquents par rapport à ceux des nouveau-nés, car les réarrangements équilibrés ne sont pas associés à des phénotypes anormaux et sont compatibles avec le développement embryonnaire et fœtale. Cela dit, les porteurs des réarrangements équilibrés peuvent produire des gamètes équilibrés et déséquilibrés et peuvent subir des fausses couches spontanées à répétition [Haoud, 2014; Kasak et al., 2019].

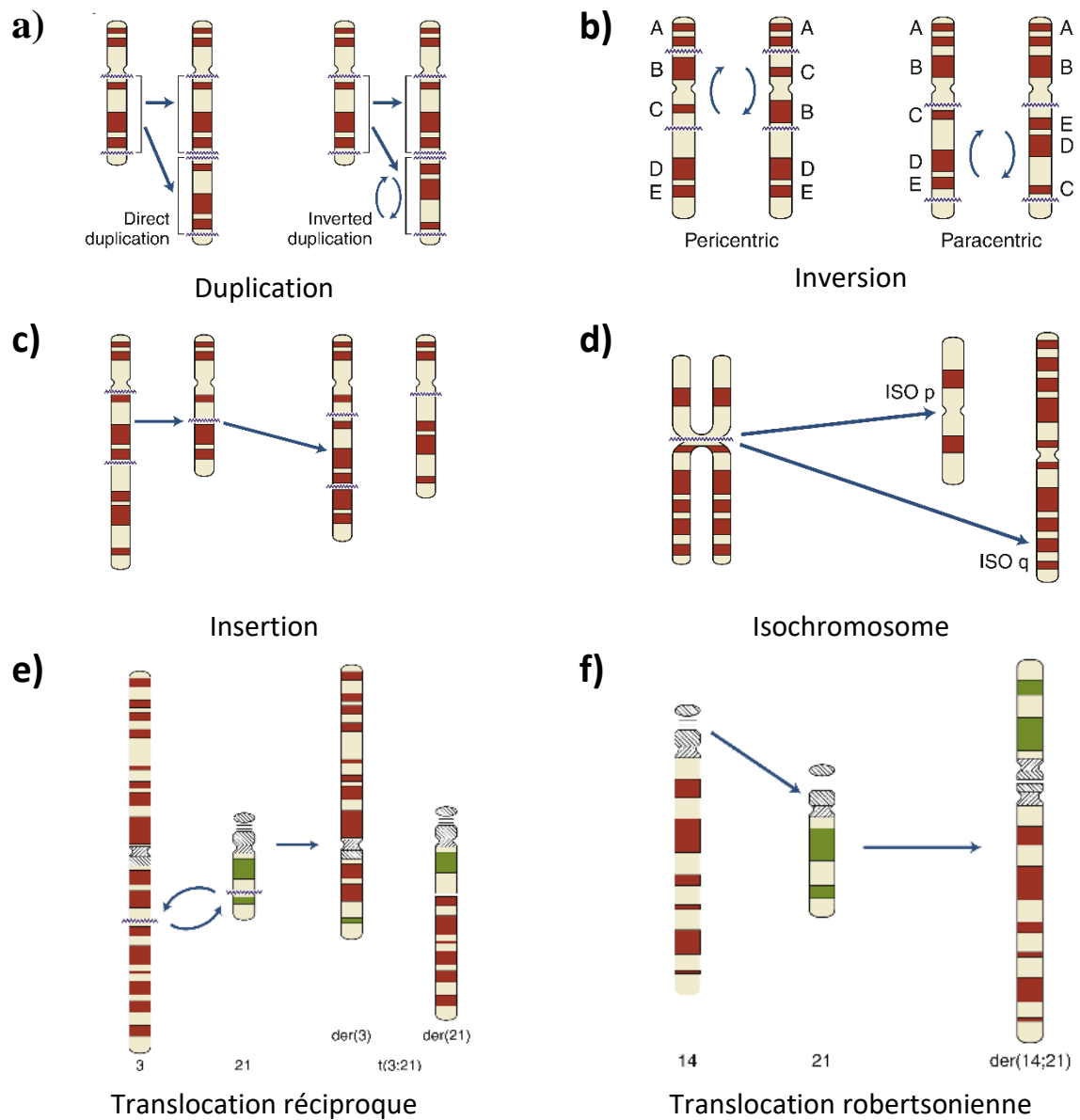


Figure 24: Anomalies chromosomiques de structure

a) Duplication ; b) Inversion ; c) Insertion ; d) Isochromosome ; e) Translocation réciproque entre les chromosomes 3 et 21. Le chromosome 3 est représenté en rouge, le chromosome 21 en vert. Le diagramme illustre que la translocation n'a entraîné aucune perte de substance chromosomique ; f) Translocation robertsonienne impliquant les bras longs des chromosomes 14 et 21. Le chromosome 14 est représenté en rouge, le chromosome 21 en vert. Le (der) chromosome dérivé a perdu les bras courts des deux chromosomes acrocentriques [Rosenberg and Rosenberg, 2012].

3.2. Les facteurs anatomiques, immunologiques, endocriniens, infectieux et environnementaux

Les facteurs anatomiques sont peu fréquents. En effet, la cavité utérine peut être malformée et incapable d'assurer le développement de l'œuf. La prévalence des malformations utérines est estimée entre 0,1 et 10% dans la population générale [Maneschi et al., 1995]. La malformation utérine la plus souvent associée aux fausses couches spontanées est l'utérus cloisonné. Toutefois, d'autres pathologies, telles que les synéchies intra-utérines et les fibromes sous-muqueux, peuvent aussi conduire à une fausse couche [Haoud, 2014; Kasak et al., 2019].

Les facteurs immunologiques peuvent être considérés comme des causes probables de la survenue des fausses couches spontanées. En effet, le syndrome des antiphospholipides a été démontré comme associé aux FCSR et, parmi tous les auto-anticorps, il semble que seuls les anticardiolipines, la présence d'un anticoagulant circulant et les anti-thyroïde, tiennent une place dans la survenue des FCSR. Les mécanismes par lesquels le syndrome des antiphospholipides favorise les FCSR restent à ce jour peu connus [Haoud, 2014].

Les facteurs endocriniens qui favorisent la survenue des FCSR sont les étiologies les plus controversées, et la relation cause à effet n'est pas bien établie. Les causes hormonales retenues sont, en général : les insuffisances lutéales, les maladies thyroïdiennes, l'hypersécrétion de LH, les ovaires polykystiques, l'hyperprolactinémie et le diabète [Haoud, 2014].

La vaginose bactérienne, modification complexe de la flore vaginale, est considérée comme une cause de la survenue des FCSR. En effet, les lactobacilles créent un environnement favorable pour l'implantation et leurs absences ou leurs remplacements par des germes pathogènes, comme *Prevotella sp*, *Peptostreptococcus sp*, *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus sp* et *Mycoplasma hominis* ; pourraient entraîner un état pro-inflammatoire favorisant la survenue d'une fausse couche [Haoud, 2014].

La consommation du tabagisme et de l'alcool d'une manière régulière peut être un facteur de risque de la survenue des fausses couches [Shiverick and Salafia, 1999; Ness et al., 1999]. Aussi bien, l'utilisation des drogues comme la cocaïne peut provoquer la survenue d'une fausse couche [Ness et al., 1999]. De même, la consommation régulière de café est aussi, dans certaines études, un facteur de risque de la survenue d'une fausse couche durant le premier trimestre [Rasch, 2003; George et al., 2006; Cnattingius et al., 2000].

4. Les anomalies de développement sexuel (DSD)

Les anomalies de développement sexuel sont définies comme les affections congénitales dans lesquelles le développement du sexe chromosomique, gonadique ou anatomique est atypique. Cette définition est suffisamment large pour couvrir des conditions telles que l'exstrophie cloacale, mais suffisamment spécifique pour ne pas englober, par exemple, les troubles de la puberté [Hughes et al., 2006].

A ce jour, plusieurs études sur des modèles murins ont révélé de nombreuses causes des anomalies de développement sexuel. Le pourcentage des patients dont le diagnostic moléculaire est confirmé reste décevant (environ 25%). En revanche, le diagnostic moléculaire des patients présentant des troubles classiques de la stéroïdogenèse peut être réussi dans la plupart des situations [Achermann and Hughes, 2016].

Une bonne classification des anomalies de développement sexuel peut améliorer le pronostic du patient, prévoir la réponse au traitement (par exemple, supplémentation androgènes), évaluer les caractéristiques associées (par exemple, dysfonctionnement surrénalien) ou le risque de développement d'une tumeur, déterminer les options de fertilité possibles et donner un conseil à long terme pour l'individu et la famille. Le Tableau 1 présente une liste, non exhaustive, des causes des DSD les plus courantes en les classant comme : 1) variations des chromosomes sexuelles (chromosome DSD), 2) troubles du développement testiculaire et de virilisation (46, XY DSD), et 3) troubles du développement ovarien et d'excès d'androgènes (46, XX DSD). Toutefois, l'évaluation rapide du caryotype peut être un moyen très utile pour centrer les recherches et donner un conseil à la famille. Le but est d'atteindre un diagnostic spécifique pour chaque enfant, même si celui-ci reste large, comme le cas d'une dysgénésie testiculaire [Achermann and Hughes, 2016].

4.1. Chromosome DSD

Les anomalies de nombres de chromosomes sexuels peuvent être considérées comme chromosome DSD. Ceci inclut le syndrome de Klinefelter (47,XXY et ses variations), le syndrome de Turner (45,X et ses variations), le mosaïcisme (45,X/46,XY et ses variations) parfois appelée dysgénésie gonadique mixte et le chimère des chromosomes sexuels (46,XY/46,XX) (Tableau 1) [Hughes et al., 2006; Donohoue, 2018; Délot and Vilain, 2019; Achermann and Hughes, 2016].

Tableau 1: Exemple d'un système de classification des anomalies de développement sexuel [Achermann and Hughes, 2016]

Chromosome DSD	DSD 46,XY	DSD 46,XX
A)47, XXY et ses variations	A) Troubles du développement des gonades (testiculaires)	A) Troubles du développement gonadique (ovaire)
B)45, X et ses variations	1)Dysgénésie gonadique complète ou partielle	1)Dysgénésie gonadique
C)45, X / 46, XY et ses variations	2)DSD ovotesticulaire	2)DSD ovotesticulaire
D)46, XX / 46, XY et ses variations	3)Régression des testicules	3)DSD testiculaire
	B) Troubles de la synthèse ou de l'action des androgènes	B) Excès d'androgène
	1)Troubles de la synthèse des androgènes	1)Fœtal
	2)Troubles de l'action des androgènes	2)Fœtoplacentaire
	C)Autre	C)Autre
		3)Maternelle

4.1.1. Le syndrome de Klinefelter et ses variations

Le syndrome de Klinefelter et ses variations sont les formes les plus courantes d'aneuploïdie des chromosomes sexuels, avec une incidence qui varie de 1 sur 500 à 1 sur 1000 nouveau-nés par an [Groth et al., 2013]. La forme classique du syndrome de Klinefelter est associée à un caryotype 47,XXY et est causée par la non-disjonction méiotique des chromosomes sexuels pendant la gamétogénèse (Figure 25) [Thomas and Hassold, 2003].

Syndrôme de Klinefelter

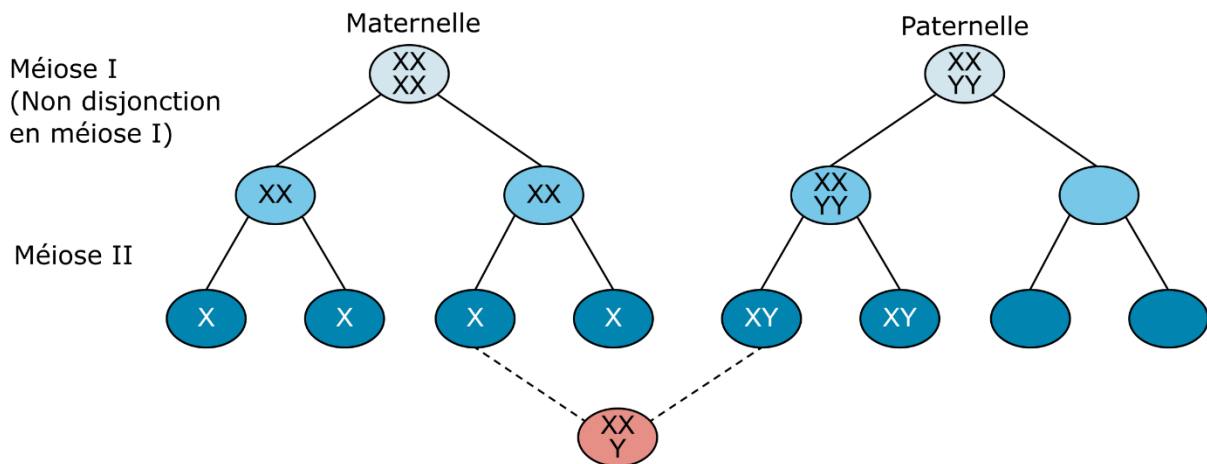


Figure 25: Non-disjonction paternelle en méiose I conduit au syndrome de Klinefelter 47,XXY

[Skuse et al., 2018]

Cette anomalie se produit pendant la spermatogénèse, chez environ 40% des patients, et pendant l'ovogénèse, chez environ 60% des patientes [Achermann and Hughes, 2016]. La forme mosaïque du syndrome de Klinefelter (46, XY/47,XXY) résulte d'une non-disjonction mitotique des chromosomes sexuels au cours du développement de zygote, et on pense que cela survient chez

environ 10% des individus. D'autres variations chromosomiques associées au syndrome de Klinefelter (par exemple, 48, XXXY) ont été aussi rapportées [Achermann and Hughes, 2016].

Dans la plupart des situations, un jeune homme peut être diagnostiqué pour ses petits testicules, sa gynécomastie, sa faible virilité à la puberté, ses proportions eunuchoïdes du corps ou sa stérilité [Achermann and Hughes, 2016]. D'autres caractéristiques, telles qu'une difficulté d'apprentissage, un retard de langage, un problème de comportement et une altération du développement moteur peuvent se manifester, ce qui rend un soutien éducatif précoce très important [Ross et al., 2008, 2012]. Ainsi, le développement testiculaire chez des individus atteints du syndrome de Klinefelter fournit une preuve importante du rôle clé du chromosome Y dans la détermination sexuelle et dans la production prénatale d'androgènes [Achermann and Hughes, 2016].

4.1.2. Le syndrome de Turner et ses variations

Le syndrome de Turner est la deuxième forme la plus fréquente d'aneuploïdie des chromosomes sexuels, avec une incidence d'environ 1/2500 naissance chez la fille [Elsheikh et al., 2002]. La forme classique du syndrome de Turner est associée à un caryotype 45,X, qui survient chez environ la moitié des personnes atteintes de cette maladie. Les formes mosaïques du syndrome de Turner (45, X/46,XX) représentent environ un quart des patients, alors que les autres patients présentent des anomalies structurelles du chromosome X, telles que des délétions du bras long ou court, des isochromosomes ou des chromosomes en anneau [Elsheikh et al., 2002; Bondy, 2007].

L'apparition de la forme classique 45,X, peut résulter d'une non-disjonction ou d'une perte de chromosome au cours de la gamétogenèse chez l'un des parents, ce qui se traduit par un spermatozoïde ou un ovocyte dépourvu des chromosome sexuels (Figure 26) [Achermann and Hughes, 2016].

Syndrôme de Turner

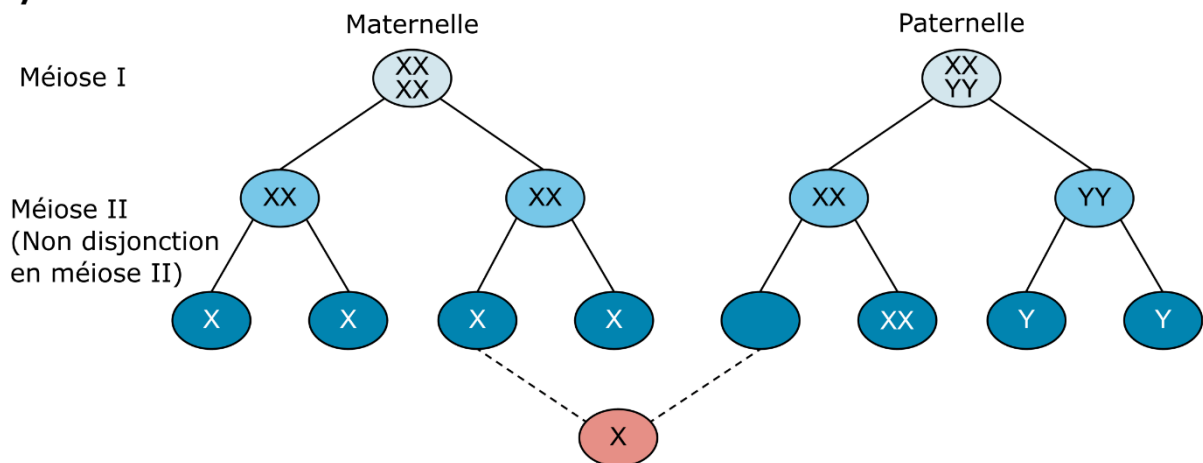


Figure 26: Non-disjonction paternelle en méiose II conduit au syndrome de Turner 45,X

[Skuse et al., 2018]

Les caractéristiques cliniques du syndrome de Turner sont très variables et différentes selon l'âge du diagnostic. Avant la naissance, le syndrome de Turner peut être détecté accidentellement après une amniocentèse ou une choriocentèse effectuée pour une autre raison (âge de la mère élevé), ou après suspicion d'une augmentation de l'épaisseur de la clarté par un échographiste [Bondy, 2007]. À la naissance, le nouveau-né peut se présenter avec une taille légèrement plus petite que la moyenne, un cou d'aspect palmé, des ongles courbés vers le haut, une malformation cardiaque et un œdème (gonflement) au niveau du dos, des mains et des pieds. Durant la petite enfance, une petite taille est observée dans environ 98% des cas [Achermann and Hughes, 2016].

Le retard pubertaire est dû à une dysgénésie ovarienne qui est une anomalie de fonctionnement des ovaires. En effet, après le 3^{ème} mois de gestation, une accélération de l'apoptose des cellules germinales et une atrésie de l'ovocyte (entraînant ainsi une dégénérescence progressive de l'ovaire pendant la période prénatale ou postnatale) ont été observées. Ceci se manifeste en général par une aménorrhée primaire et par l'absence de développement des seins. Les organes génitaux internes (utérus) sont souvent normaux mais restent infantiles [Achermann and Hughes, 2016].

Dans environ 15% des cas, les règles spontanées peuvent apparaître mais ces cycles menstruels s'arrêtent en général rapidement. Une grossesse peut être réussie chez environ 1 à 2 % des patientes, mais dans la plupart des cas, le syndrome de Turner est associé à une infertilité. Néanmoins, environ 25% des patientes présentent une synthèse suffisante d'œstrogènes, ce qui permet un déclenchement normal de la puberté à l'adolescence [Elsheikh et al., 2002; Pasquino et al., 1997].

4.1.3. Le mosaïcisme 45,X/46,XY et ses variations

La dysgénésie gonadique mixte (Figure 27) présente un tableau clinique très variable. Elle est probablement due à une non-disjonction mitotique des chromosomes au cours de la mitose du zygote, donnant ainsi un caryotype 45,X/46,XY. D'autres anomalies chromosomiques sont parfois observées chez ces patients comme une anomalie de nombre du chromosome Y (45,X/46,XY/47,XYY) ou (45X/47,XYY) [Achermann and Hughes, 2016].

La prévalence réelle de cette affection reste à ce jour inconnue. Les patients présentant ce genre d'anomalie chromosomique ont, en général, différents phénotypes, allant d'une ambiguïté génitale, à la naissance, à une morphologie complètement féminine ou masculine [Farrugia et al., 2013]. Chez certains patients, un stroma de type ovarien et des follicules primordiaux peuvent être présents. Les gonades peuvent être placées n'importe où le long de la voie de migration testiculaire. Les gonades striées sont, en général, intra-abdominales et les testicules bien formés sont, en général, situés dans la région inguino-scrotale [Achermann and Hughes, 2016].

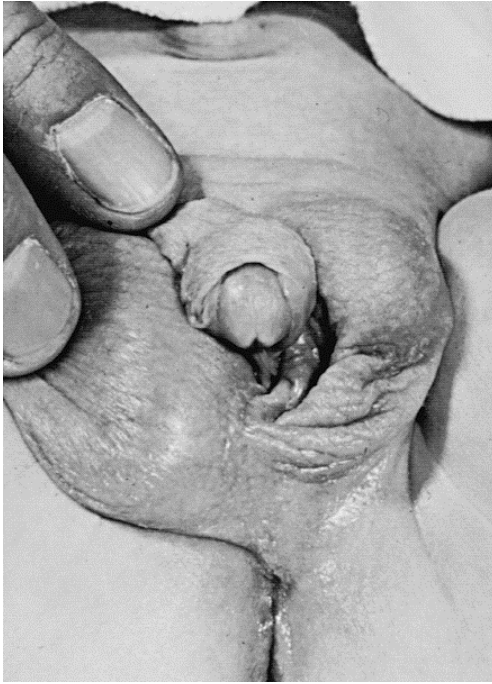


Figure 27: Organes génitaux externes d'un patient 45,X/46,XY

[Délot and Vilain, 2019]

Les canaux de Müller peuvent persister dans les cas les plus sévères en raison d'une faible production d'AMH par les cellules de Sertoli. La gonade peut présenter deux cotés histologiquement différents, d'où le terme de dysgénésie gonadique mixte [Farrugia et al., 2013]. Ainsi, le patient avec un caryotype 45X/46,XY peut aussi présenter quelques caractéristiques cliniques du syndrome de Turner, comme une petite taille ou une malformation cardiaque ou rénale, avec présence d'un héli-utérus et une trompe de Fallope sur le côté le plus touché de la gonade [Acher mann and Hughes, 2016].

L'affectation du sexe peut être difficile pour les individus 45,X/46,XY. Plusieurs facteurs doivent être pris en compte, notamment : l'aspect génital, l'anatomie urogénitale, l'identité probable du genre, besoin des hormones et le comportement sexuel et la fertilité [Acher mann and Hughes, 2016].

La plupart des nouveau-nés avec des organes génitaux féminins ou peu virilisés sont élevés comme des filles, et la présence d'un utérus ou d'un héli-utérus permet une éventuelle grossesse après un don d'ovocyte [Martinerie et al., 2012]. Chez ces patients, il est très conseillé de prescrire des œstrogènes, à l'adolescence, pour induire un développement normal de l'utérus ainsi que des progestatifs pour provoquer des menstruations lorsque l'utérus est présent [Acher mann and Hughes, 2016].

Les nouveau-nés atteints d'hypospadias et d'un développement phallique raisonnable sont généralement élevés comme des hommes. La testostérone peut parfois être administrée pour favoriser la croissance phallique pendant la petite enfance, et la réparation de l'hypospadias est généralement proposée en deux étapes [Martinerie et al., 2012].

L'attribution du sexe d'un enfant 45,X/46,XY avec des organes génitaux très ambigus peut être une décision difficile pour les parents et les médecins. Les résultats à long terme pour ce type d'anomalie de développement sexuel ne sont pas disponibles. Des données limitées suggèrent qu'environ 60% des nouveau-nés avec ce phénotype sont élevés comme des filles, mais elles sont stériles, elles n'ont pas d'utérus, elles nécessitent une gonadectomie et sont susceptibles de subir une chirurgie urogénitale [Achermand and Hughes, 2016]. En revanche, les patients élevés comme des garçons subissent souvent de multiples opérations d'hypospadias. Ils peuvent avoir un tissu corporel pauvre et une taille considérablement petite. Ils sont stériles en présence de gonades dysgénétiques qui doivent être retirées. Ainsi, Une évaluation détaillée et une approche personnalisée par une équipe pluridisciplinaire sont nécessaires pour la prise en charge, le suivi et le soutien à long terme de chaque enfant [Achermand and Hughes, 2016].

Un caryotype 4,X/46,XY peut aussi être associé à un phénotype masculin et à un développement testiculaire normal. Les premiers cas des hommes normaux avec un caryotype 45,X/46,XY ont été décrits pour la première fois chez des donneurs potentiels de greffe de la moelle osseuse. Néanmoins, des études ultérieures sur l'amniocentèse ont montré que 90% des fœtus diagnostiqués comme ayant 45,X/46,XY avaient, après la naissance, des organes génitaux masculins normaux. De plus, il semble y avoir une corrélation limitée entre le degré de mosaïcisme et le phénotype gonadique [Délot and Vilain, 2019].

4.1.4. Le chimérisme 46, XX /46,XY et ses variations

La DSD ovotesticulaire est une affection rare qui a été signalée chez environ 500 personnes dans le monde. Elle survient chez environ 1% des nouveau-nés qui ont consultés en raison de leurs organes génitaux atypiques. Elle se produit chez des patients présentant un caryotype 46,XX/46,XY, des patients avec un caryotype 46,XX et des patients avec un caryotype 46,XY. Le diagnostic de DSD ovotesticulaire (hermaphrodisme vrai) nécessite la présence de tissu ovarien (contenant des follicules) et de tissu testiculaire dans la même gonade ou dans la gonade opposée [Achermand and Hughes, 2016].

Les patients atteints de DSD ovotesticulaire peuvent être sous-classés en fonction de l'emplacement des gonades. Les cas latéraux (20%) ont un testicule d'un côté et un ovaire de l'autre. Les cas bilatéraux (30%) ont des tissus testiculaires et ovariens présents d'une manière bilatérale sous forme d'ovotestis [Achermand and Hughes, 2016]. Les cas unilatéraux (50%) ont un ovotestis présent d'un côté et un ovaire ou un testicule de l'autre côté [Achermand and Hughes, 2016]. L'ovaire (ou ovotestis) se trouve plus fréquemment sur le côté gauche du corps, tandis que le testicule (ou ovotestis) se trouve plus souvent sur la droite. Un ovaire est susceptible d'être dans sa position anatomiquement normale, tandis qu'un testicule ou un ovotestis peut se faufiler le long

de la voie de descente testiculaire et se trouve souvent dans la région inguinale droite [Achermann and Hughes, 2016].

La différenciation sexuelle varie dans les cas de DSD ovotesticulaire. La plupart des patients présentent des ambiguïtés génitales ou de l'hypospadias. La cryptorchidie est très fréquente et, dans la plupart des cas, une gonade est palpable et située dans la région inguinale. Un héli-utérus est souvent présent du côté de l'ovaire ou de l'ovotestis [Achermann and Hughes, 2016].

Le diagnostic de DSD ovotesticulaire est envisagé chez tous les patients ayant des organes génitaux ambigus. Le caryotype 46,XX/46,XY soutient fortement le diagnostic, mais la présence d'un caryotype normale (46,XX ou 46,XY) n'exclut pas le diagnostic, surtout chez un nouveau-né 46,XX qui présente une asymétrie génitale. L'imagerie pelvienne ou l'imagerie par résonance magnétique (IRM) sont utiles pour visualiser les organes génitaux internes. La présence de tissu testiculaire peut être détectée par la mesure de la testostérone basale, de l'AMH et de l'inhibine B dans les premiers mois de la vie, et par la mesure de l'AMH basale par la suite. La présence de tissu ovarien est très difficile à détecter durant la petite enfance. Néanmoins, la laparoscopie peut fournir des informations plus détaillées sur la structure des organes génitaux internes et peut confirmer le diagnostic de DSD ovotesticulaire lorsque les autres formes de DSD ont été exclues [Moriya et al., 2014].

Le management des DSD ovotesticulaire dépend de l'âge du diagnostic, du développement génital, des structures internes et de la capacité d'assurer la reproduction. Les individus possédant un utérus et un caryotype 46,XX sont susceptibles d'avoir un tissu ovarien fonctionnel, et l'attribution de sexe féminin peut être appropriée. Le tissu testiculaire potentiellement fonctionnel sont retiré avant la puberté et surveillé en postopératoire en mesurant les taux sériques d'AMH et de testostérone. Un sexe masculin peut être plus approprié s'il y a un développement phallique normale, un tissu testiculaire, une absence ou malformation des canaux de Müller. Le tissu ovarien et les structures müllériennes sont généralement retirées [Achermann and Hughes, 2016].

4.2.DSD 46,XY

Les DSD 46,XY peuvent être classées comme des troubles du développement des testicules, des troubles de la synthèse des androgènes, des troubles de l'action des androgènes et d'autres affections impliquant le développement sexuel [Donohoue, 2018; Délot and Vilain, 2019; Achermann and Hughes, 2016].

4.2.1. Les troubles du développement testiculaire

Les troubles du développement testiculaire présentent un spectre phénotypique variable. La dysgénésie testiculaire complète est associée à un manque total de virilisation des organes génitaux externes, et des structures müllériennes persistantes en raison d'une production insuffisante d'AMH qui est une condition parfois appelée syndrome de Swyer. En revanche, une dysgénésie gonadique partielle peut être associée à une clitoromégalie ou à des organes génitaux ambigus ou atypiques. Un utérus ou un tissu utérin et un vagin ou un sinus urogénital peuvent être présents. Certains patients susceptibles d'avoir une dysgénésie testiculaire peuvent se présenter avec hypospadias, un micropénis ou même une infertilité masculine [Achermann and Hughes, 2016].

Plusieurs troubles monogéniques ont été décrits chez des patients présentant divers degrés de dysgénésie testiculaire (Tableau 2). À ce jour, le diagnostic génétique n'est réussi que chez 20% à 30% des personnes atteintes de 46, XY dysgénésie testiculaire [Achermann and Hughes, 2016].

Les anomalies du développement génital sont aussi associées à un certain nombre de délétions, de duplications et de réarrangements chromosomiques. Les changements les plus fréquemment observés sont les délétions de 9p24-pter, 10q25-qter et Xq13 et les duplications de Xp21 [Achermann and Hughes, 2016]. Les délétions de 9p24-pter perturbent probablement la séquence du gène *DMRT1* qui est exprimé durant le développement précoce des gonades [Moniot et al., 2000; Raymond et al., 2000].

Tableau 2: Liste des gènes (non exhaustive) impliqués dans la survenue des troubles du développement testiculaire chez des patients 46,XY

Gene	Protéine	OMIM	Locus	Transmission	Gonades	Structures Müllérienne	OGE	Caractéristiques associées
<i>Troubles du développement gonadique (testiculaire): troubles monogéniques</i>								
<i>WT1</i>	FT	607102	11p13	AD	Dysgénésie testiculaire	±	Féminins, ambigus ou hypospadias	Tumeurs de Wilms, Anomalies rénales, tumeurs gonadiques (le syndrome de WAGR, de Denys-Drash, et de Fraser)
<i>NR5A1 (SF1)</i>	Récepteur nucléaire FT	184757	9q33.3	AD/AR (SLD)	Dysgénésie testiculaire (variable)	±	Féminins, ambigus ou hypospadias	Les phénotypes les plus graves incluent l'insuffisance surrénalienne primaire ; les phénotypes les moins graves incluent une dysgénésie gonadique légère, une virilisation significativement altérée avec une fonction surrénalienne normale
<i>GATA4</i>	FT	600576	8p23.1	AD (SLD)	Dysgénésie testiculaire (variable)	-	Féminins, ambigus ou hypospadias / micropénis	Anomalies cardiaques
<i>ZFPM2 (FOG2)</i>	Co-régulateur	603693	8q23.1	AD	Dysgénésie testiculaire (variable)	-		
<i>CBX2</i>	Protéine polycomb	602770	17q25.3	AR	Ovaire (one case)	+	Féminins	
<i>SRY</i>	FT	480000	Yp11.3	Y	Dysgénésie testiculaire or ovotestis	±	Féminins ou ambigus	
<i>SOX9</i>	FT	608160	17q24-q25	AD	Dysgénésie testiculaire or ovotestis	±	Féminins ou ambigus	Dysplasie camptomélique
<i>MAP3K1</i>	Molécule de signalisation	600982	5q11.2	AD	Dysgénésie testiculaire (variable)	±	Féminins, ambigus ou hypospadias / micropénis	
<i>DMRT1</i>	FT	602424	9p24.3	AD	Dysgénésie testiculaire	+	Féminins	
<i>TSPYL1</i>	? Remodelage de la chromatine	604714	6q22.1	AR	Dysgénésie testiculaire	-	Féminins ou ambigus	Mort subite du nourrisson
<i>DHH</i>	Molécule de signalisation	605423	12q13.1	AR	Dysgénésie testiculaire	-	Féminins	Neuropathie minifasciculaire chez plusieurs patients
<i>ARX</i>	FT	300382	Xp22.13	X	Dysgénésie testiculaire (Leydig)	-	Ambigus	Lissencéphalie liée à l'X, épilepsie, instabilité de la température
<i>MAMLD1 (CXORF6)</i>	Inconnu	300120	Xq28	X	Normal (Dysfonction des cellules de Leydig)	-	Hypospadias	
<i>Troubles du développement gonadique (testiculaire): changements chromosomiques impliquant des gènes candidats</i>								
<i>DMRT1</i>	FT	602424	9p24.3	Délétion monosomique	Dysgénésie testiculaire	±	Féminins ou ambigus	Déficience Intellectuelle
<i>ATRX</i>	Hélicase (? Remodelage de la chromatine)	300032	Xq13.3	X	Dysgénésie testiculaire	-	Féminins, ambigus, ou Masculins	α-Thalassémie, Déficience Intellectuelle
<i>NR0B1 (DAX1)</i>	Récepteur nucléaire FT	300018	Xp21.3	dupXp21	Dysgénésie testiculaire ou ovarienne	±	Féminins ou ambigus	
<i>WN74</i>	Molécule de signalisation	603490	1p36.12	dup1p35	Dysgénésie testiculaire	+	Ambigus	Déficience Intellectuelle

FT: Facteur de transcription ; AR : autosomique récessive ; AD : autosomique dominant

4.2.2. Les troubles de la synthèse des androgènes

Une altération au niveau de la voie de synthèse des androgènes (Figure 28, Tableau 3) peut entraîner une anomalie de développement sexuel d'un individu 46,XY, dû à une virilisation incomplète des organes génitaux externes, anciennement appelé pseudohermaphrodisme masculin [Achermann and Hughes, 2016].

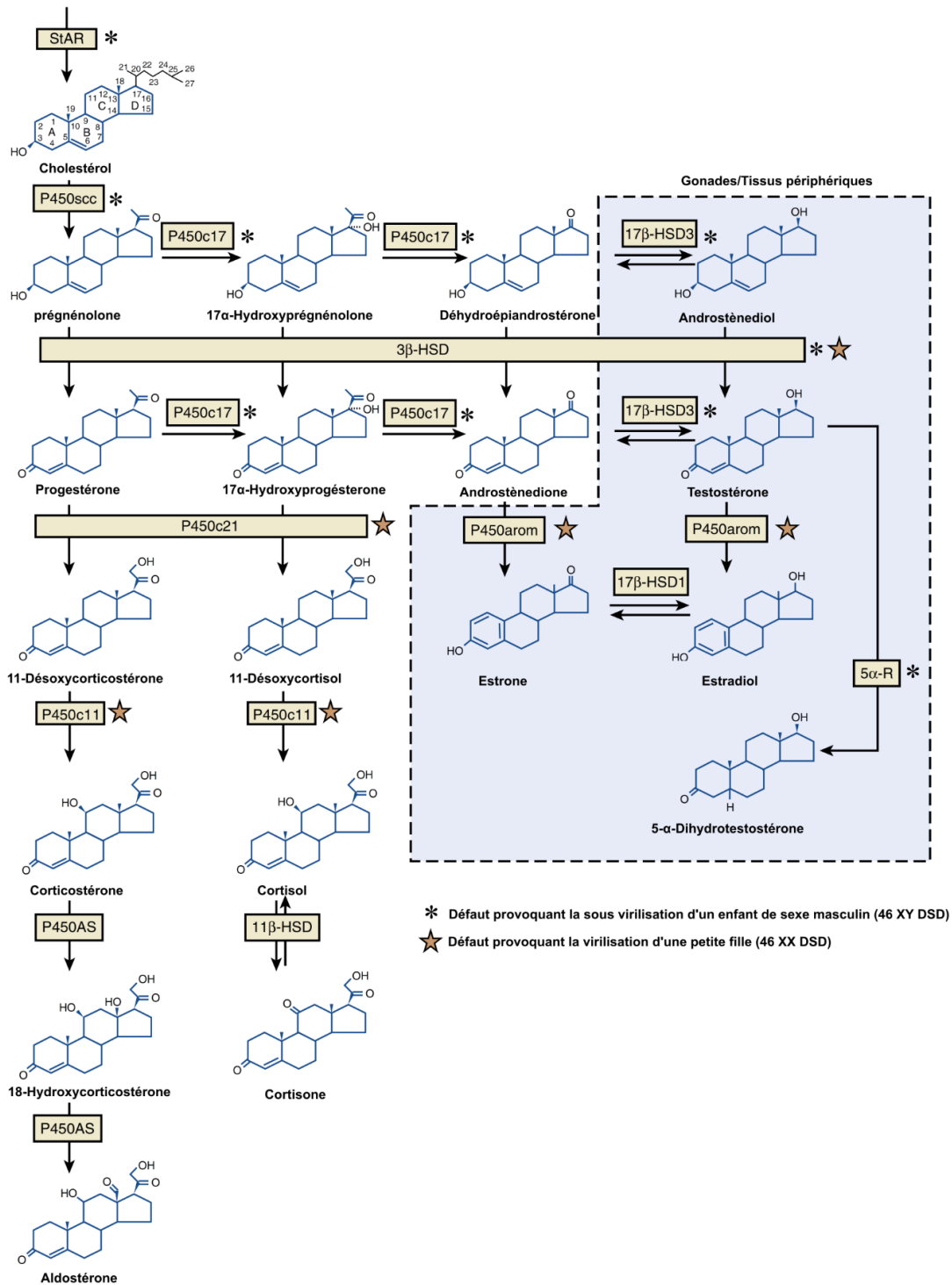


Figure 28: Voie de la biosynthèse des stéroïdes et défauts de la stéroïdogénèse

[Arboleda et al., 2016]

4.2.2.1. Déficit en 7-déshydrocholestérol réductase : syndrome de Smith-Lemli-Opitz

Le gène *DHCR7* est situé au niveau du chromosome 11, il code pour une enzyme qui intervient dans la dernière étape de la voie de synthèse du cholestérol appelée 7-déshydrocholestérol réductase. Un déficit au niveau de cette enzyme provoque l'apparition du syndrome de Smith-Lemli-Opitz [Achermann and Hughes, 2016; Délot and Vilain, 2019; Donohoue, 2018; Grinspon and Rey, 2020]. Ce dernier a un large spectre phénotypique et comprend généralement la microcéphalie, le retard de développement, les anomalies cardiaques, la ptose, le nez retroussé, la micrognathie, la fente palatine, la polydactylie, la syndactylie des orteils les hypospadias sévères, le micropénis et le retard de croissance [Porter, 2008]. À ce jour plus de 150 mutations au niveau du gène *DHCR7* ont été décrites [Waterham and Hennekam, 2012].

4.2.2.2. Déficit en récepteur de l'hormone lutéinisante

Le gène *LHCGR* est situé au niveau du chromosome 2, il code pour le récepteur LH/hCG. Une mutation délétère au niveau du gène *LHCGR* entraîne une altération de la réponse à l'hCG et à la LH, ce qui conduit à une agénésie ou une hypoplasie des cellules de Leydig. Phénotypiquement, le patient peut présenter une ambiguïté génitale [Délot and Vilain, 2019; Donohoue, 2018; Grinspon and Rey, 2020]. Les individus présentant une hypoplasie complète des cellules de Leydig sont généralement élevés comme des filles et ont besoin des œstrogènes en période de puberté. En revanche, si un sexe masculin est choisi, des suppléments de testostérone peuvent être administrés dès la petite enfance pour soutenir la puberté [Achermann and Hughes, 2016].

4.2.2.3. Déficit en protéine STAR

Le gène *STAR* est situé dans le chromosome 8, il code pour une protéine nommée STAR. Cette dernière est sécrétée dans la glande surrénale et dans les gonades. Elle joue un rôle clé en facilitant le mouvement rapide du cholestérol de la membrane mitochondriale externe vers la membrane interne [Miller, 2011]. Les patients présentant une mutation récessive du gène *STAR* développent une forme sévère d'insuffisance surrénalienne primaire, appelée hyperplasie congénitale lipoïde des surrénales (HCLS). Les nouveau-nés 46,XX atteints de HCLS présentent des organes génitaux normaux, et la plupart des nouveau-nés 46,XY sont nés avec un phénotype féminin et ont un déficit sévère en glucocorticoïdes et en minéralocorticoïdes. En effet, l'accumulation des lipides endommage les cellules de Leydig dans les testicules fœtales, mais n'affecte pas les ovaires fœtaux, parce que les follicules subissent une stimulation gonadotrophine minimale avant l'âge de la puberté. Par conséquent, les ovaires restent intacts jusqu'à l'adolescence dans les cas d'HCLS [Achermann and Hughes, 2016; Délot and Vilain, 2019; Donohoue, 2018; Grinspon and Rey, 2020].

Tableau 3: Liste des gènes (non exhaustive) impliqués dans la survenue des troubles de la synthèse ou de l'action hormonale

Gene	Protéine	OMIM	Locus	Transmission	Gonades	Structures Müllérienne	OGE	Caractéristiques associées
<i>DHCR7</i>	Enzyme	602858	11q13.4	AR	Testicules	-	Variable	Syndrome de Smith-Lemli-Opitz
<i>LHCGR</i>	Récepteur de la protéine G	152790	2p16.3	AR	Testicules	-	Féminins, ambigus ou hypospadias	Hypoplasie des cellules de Leydig
<i>STAR</i>	Protéine associée aux mitochondries	600617	8p11.2	AR	Testicules	-	Féminins, ambigus ou hypospadias	Lipotide CAH (insuffisance surrénale primaire), insuffisance pubertaire
<i>CYP11A1</i>	Enzyme	118485	15q24.1	AR	Testicules	-	Féminins ou ambigus	CAH (insuffisance surrénale primaire), insuffisance pubertaire
<i>HSD3B2</i>	Enzyme	201810	1p13.1	AR	Testicules	-	Ambigus	CAH, insuffisance surrénale primaire, ↑ Δ ⁴ : Δ ³ ratio
<i>CYP17A1</i>	Enzyme	202110	10q24.3	AR	Testicules	-	Féminins, ambigus ou microphénis	CAH, hypertension due à DOC (sauf en cas de déficit isolé en 17,20-lyase)
<i>POR (P450 oxidoreductase)</i>	Enzyme CYP Donneur d'électrons	124015	7q11.2	AR	Testicules	-	Masculins ou ambigus	Caractéristiques mixtes du déficit en 21-hydroxylase, du déficit en 17 α -hydroxylase / 17,20-lyase et du déficit en aromatasase; parfois associée à la craniosynostose Antley-Bixler
<i>CYB5A</i>	Cofacteur	613218	18q22.3	AR	Testicules	-	Ambigus ou hypospadias	Méthémoglobinémie
<i>AKR1C2 (AKR1C4)</i>	Enzyme	600450	10p15.1	AR	Testicules	-	Variable	
<i>HSD17B3</i>	Enzyme	605573	9q22.23	AR	Testicules	-	Féminins ou ambigus	Androgénisation partielle à la puberté, ↑ rapport de l'androsténone à la testostérone
<i>SRD5A2</i>	Enzyme	607306	2p23.1	AR	Testicules	-	Ambigus ou microphénis	Androgénisation partielle à la puberté, ↑ rapport testostérone/DHT
Récepteur des androgènes (NR3C4)	Récepteur nucléaire FT	313700	Xq12	X	Testicules	-	Féminins, ambigus, microphénis ou masculins normal	Spectre phénotypique de SIA complet (organes génitaux externes féminins) à SIA partiel (ambigu) aux organes génitaux masculins normaux / infertilité
<i>AMH</i>	Molécule de signalisation	600957	19p13.3	AR	Testicules	+	Masculins normal	Syndrome de persistance des canaux de Müller
AMH Récepteur	Récepteur transmembranaire sérine / thréonine kinase	600956	12q13.13	AR	Testicules	+	Masculins normal	Organes génitaux externes masculins, cryptorchidie bilatérale

FT: Facteur de transcription ; AR : autosomique récessive

4.2.2.4. Déficit en P450scc

Le gène CYP11A1 est situé au niveau du chromosome 15, il code pour une enzyme mitochondriale appelé P450scc. Cette enzyme convertit le cholestérol en prégnénolone. Le P450scc est donc l'enzyme clés d'une étape limitante de la synthèse des stéroïdes, qui est nécessaire pour la production de la prégnénolone par le placenta et pour la production de minéralocorticoïdes, de glucocorticoïdes et d'androgènes par les glandes surrénales et les gonades. Cependant, un déficit complète de l'activité P450, dû à une mutation faux-sens homozygote au niveau du gène *CYP11A1*, a été rapportée chez des nouveau-nés 46,XY avec un phénotype féminin et une insuffisance surrénale sévère avec perte de sel [Hiort et al., 2005; Kim et al., 2008; Tee et al., 2013]. Récemment, des pertes de fonctions partielles de P450scc ont été décrites chez des garçons atteints d'hypospadias, qui ont développé une insuffisance surrénalienne en fin de l'enfance, et chez des enfants avec une insuffisance surrénalienne primaire sans anomalie de développement sexuel [Rubtsov et al., 2009; Parajes et al., 2011].

4.2.2.5. Déficit en P450c17

Le gène CYP17A1 est situé dans le chromosome 10 et il code pour une enzyme microsomale (P450c17) avec une activité de 17 α -hydroxylase et 17,20-lyase. Elle est exprimée dans les glandes surrénales et les gonades mais pas dans le placenta ou dans les cellules de la granulosa ovarienne [New, 1970; Winter et al., 1989]. L'action 17 α -hydroxylase du P450c17 catalyse la conversion de la prégnénolone en 17 α -hydroxyprégnénolone et la conversion de la progestérone en 17 α -hydroxyprogestérone (17-OHP). L'action 17,20-lyase du CYP17A1 peut convertir la 17 α -hydroxyprégnénolone en déhydroépiandrostérone (DHEA) et la 17-OHP en androstènedione [Achermann and Hughes, 2016; Délot and Vilain, 2019; Donohoue, 2018; Grinson and Rey, 2020].

Le déficit en 17,20-lyase se traduit par une forme rare de l'hyperplasie congénitale des surrénales (HCS). Elle est caractérisée, chez les deux sexes, par une hypertension et une hypokaliémie dues à l'accumulation de désoxycorticostérone et de corticostérone [Achermann and Hughes, 2016]. En effet, un déficit en 17 α -hydroxylase dans le cortex surrénal et les gonades, causé par des mutations au niveau du gène *CYP17A1*, entraîne une altération de la synthèse de 17-OHP et 17 α -hydroxyprégnénolone et donc du cortisol, des androgènes et des œstrogènes [Achermann and Hughes, 2016]. Une diminution de la synthèse de cortisol entraîne une augmentation de la sécrétion de corticotropine, ce qui entraîne une sécrétion excessive de 17-désoxystéroïdes par le cortex surrénal, y compris les minéralocorticoïdes 11-désoxycorticostérone, corticostérone et 18-hydroxycorticostérone. Un excès de sécrétion de 11-désoxycorticostérone

entraîne une hypertension, une hypokaliémie et une altération du système rénine-angiotensine [Achermann and Hughes, 2016].

Les patientes 46, XX affectées ont des voies génitales internes et externes normales, mais les ovaires ne peuvent pas sécréter d'œstrogènes à la puberté, ce qui entraîne une absence de développement mammaire et un hypogonadisme avec des taux plasmatiques élevés de FSH et de LH [Achermann and Hughes, 2016].

Les patients 46,XY atteints d'un déficit combiné complet en 17α -hydroxylase/17,20-lyase, qui sont diagnostiqués à l'adolescence, ont généralement des organes génitaux externes féminins et une poche vaginale aveugle. Les testicules peuvent être intra-abdominaux, situés dans le canal inguinal ou dans les plis labioscrotaux. Les hernies inguinales sont communes, les structures müllériennes sont absentes et les dérivés wolffiens sont hypoplasiques [Achermann and Hughes, 2016]. L'âge osseux est souvent retardé. Les poils pubiens et axillaires sont absents ou clairsemés, et l'hypogonadisme hypergonadotrope est associé à une incapacité à développer des caractéristiques sexuelles secondaires à la puberté [Achermann and Hughes, 2016]. Le diagnostic de déficit en 17α -hydroxylase est suspecté chez tous les cas de DSD 46,XY et une gonadectomie est généralement réalisée [Achermann and Hughes, 2016; Délot and Vilain, 2019; Donohoue, 2018; Grinspon and Rey, 2020].

4.2.2.6. Déficit en 17β -HSD de type III

Le gène *HSD17B3* est situé au niveau du chromosome 9 et code pour l'enzyme 17β -HSD type 3 qui convertit l'androstènedione en testostérone au niveau des testicules [Bogani et al., 2009; Tevosian et al., 2002]. Les mutations au niveau de ce gène entraînent un déficit en 17β -HSD.

les patients 46,XY présentent un phénotype féminin ou une ambiguïté génitale avec une bonne fonction surrénale [Auchus and Miller, 2012]. La virilisation à la puberté peut s'expliquer par la synthèse des androgènes périphériques par d'autres isoformes de l'enzyme, comme *HSD17B5* (également appelé *AKR1C3*), qui participe à la voie stéroïdogénique alternative [Bogani et al., 2009]. Le diagnostic peut être confirmé si le rapport androstènedione/testostérone est supérieur à 1,25 [Bouma et al., 2007; Grinspon and Rey, 2020].

4.2.2.7. Déficit en 3β -HSD de type II

Le gène *HSD3B2* est situé au niveau du chromosome 1, il code pour l'isoenzyme 3β -HSD (3β -hydroxystéroïde déshydrogénase) de type 2. Cette enzyme catalyse la conversion des stéroïdes $\Delta 5$ en $\Delta 4$ et est exprimée principalement dans les glandes surrénales et les gonades [Simard et al., 2005]. Une mutation au niveau du gène *HSD3B2* entraîne un déficit en 3β -HSD. Ce déficit est une cause rare de l'hyperplasie congénitale des surrénales (HCS). Il affecte à la fois la production des

stéroïdes surrénaliens et gonadiques [Achermann and Hughes, 2016; Délot and Vilain, 2019; Donohoue, 2018; Grinspon and Rey, 2020].

Le déficit classique en HSD3B2 est subdivisé en formes sévères avec perte de sel et en formes moins sévères sans perte de sel. Les organes génitaux externes sont généralement atypiques, avec un micropénis, un hypospadias sévères, une fusion labioscrotale partielle, un sinus urogénital et une poche vaginale aveugle [Délot and Vilain, 2019].

Le profil biochimique d'une déficience classique en HSD3B2 est basé sur un rapport élevé des stéroïdes $\Delta 5/\Delta 4$, déterminé dans le plasma ou l'urine. Les concentrations de $\Delta 4$ -stéroïdes tels que le 17 α -Hydroxyprogestérone (17-OHP) et l'androstènedione peuvent également être élevées en cas de déficit en HSD3B2 en raison de l'activité périphérique de HSD3B1 [Donohoue, 2018].

La déficience en HSD3B2 peut être potentiellement diagnostiquée à tort comme une déficience en CYP21 chez des patients ayant un taux élevé de 17-OHP avec perte de sel [Johannsen et al., 2005; Benkert et al., 2015].

4.2.2.8. Déficit en POR

Le gène *POR* est situé au niveau du chromosome 7, il code pour une flavoprotéine liée à la membrane nommée POR. Cette dernière joue un rôle central dans le transfert d'électrons du NADPH aux enzymes P450. Le POR est crucial dans la réaction de 17,20-lyase du P450c17, il interagit avec les 57 enzymes microsomaux P450, y compris le P450c21 (21-hydroxylase) et le P450c19 (aromatase) [Grinspon and Rey, 2020].

Les nouveau-nés 46,XY avec une mutation au niveau du gène *POR* ne sont pas sous-virilisés mais présentent des signes de HCS ce qui suggère une déficience en POR. Le diagnostic peut être confirmé si les concentrations en progestérone, en 17-OHP sont élevées, et si les concentrations en DHEA et en androstènedione sont faibles. L'hormone adrénocorticotrope (ACTH) basale est élevée et le cortisol est généralement normal avec une réponse insuffisante à la stimulation de l'ACTH. À la puberté, les patients développent un hypogonadisme hypergonadotrope avec un taux élevé de 17-OHP et un taux faible ou normale des androgènes et des œstrogènes [Grinspon and Rey, 2020].

4.2.2.9. Déficit en 3 α -HSD de type I et III

Les déficits en 3 α -HSD ((3 α -Hydroxysteroid dehydrogenase) Type III et type I sont dues à des mutations au niveau des gènes *AKR1C2* et *AKR1C4*, respectivement. Elles affectent la voie alternative de la synthèse de dihydrotestostérone (DHT) sans l'intermédiaire de la DHEA, de l'androstènedione ou de la testostérone [Bogani et al., 2009; Pitetti et al., 2013; Grinspon and Rey,

2020]. Les cas 46,XY naissent avec des organes génitaux féminins ou ambigus. Les profils stéroïdiens standard ne sont pas informatifs [Grinspon and Rey, 2020].

4.2.2.10. Déficit en 5 α -réductase de type II

Le gène *SRD5A2* est situé dans le chromosome 2 et code pour l'enzyme 5 α -réductase de type 2 qui convertit la testostérone en dihydrotestostérone (DHT), androgène plus puissante [Lourenço et al., 2011; Bashamboo et al., 2014]. Les patients 46,XY avec une mutation au niveau de ce gène présentent une ambiguïté génitale avec présence des canaux de Wolff (Figure 29) [Donohoue, 2018]. À l'âge pubertaire, si les testicules n'ont pas été retirés, la virilisation se produit en raison de l'action de la 5 α -réductase de type 1 codée par le gène *SRD5A1*, conduisant dans certains cas au changement du sexe social de la femme vers l'homme [Grinspon and Rey, 2020]. Dans ces cas, la production spontanée des spermatozoïdes est réalisable lorsque les testicules sont en position scrotale [Grinspon and Rey, 2020]. Le profil biochimique est caractérisé par un rapport testostérone/DHT élevé (généralement supérieur à 18-20) après stimulation par l'hCG. Chez les patients de sexe masculin, une prescription des doses élevées de testostérone ou de DHT est utile pour augmenter la taille du pénis [Grinspon and Rey, 2020].



Figure 29: Organes génitaux externes d'un patient 46,XY avec une déficience en 5-alpha réductase

[Donohoue, 2018]

4.2.3. Les troubles de l'action des androgènes

Une virilisation insuffisante (Figure 30) peut résulter de défauts du récepteur des androgènes présents dans les organes cibles. le gène qui code pour le récepteur des androgènes est situé dans le chromosome Xq12, et, jusqu'à aujourd'hui, plus de 800 mutations génétiques ont été décrites [Grinspon and Rey, 2020].

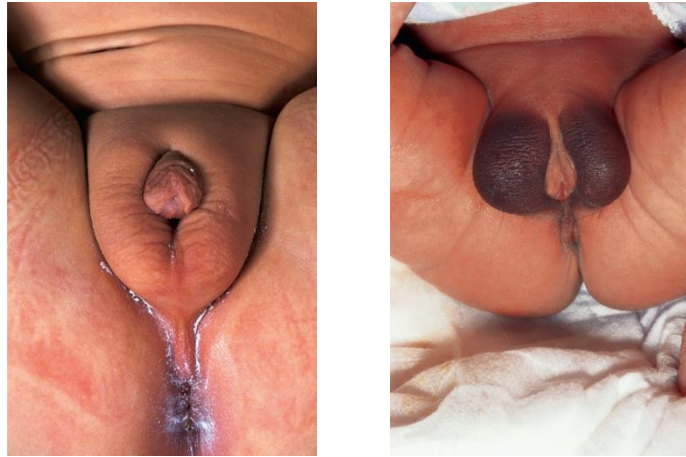


Figure 30: Organes génitaux externes des 2 patients 46,XY avec une insensibilité partielle aux androgènes

[Délot and Vilain, 2019]

Le syndrome d'insensibilité complète aux androgènes est dû à des mutations qui impactent complètement l'activité des récepteurs aux androgènes par différents mécanismes. Il s'agit de la cause la plus fréquente des patients DSD 46,XY incomplètement féminisés [Hughes et al., 2012]. À la naissance, il n'y a pas de suspicion de DSD sauf si un caryotype prénatal a été pratiqué pour d'autres raisons. D'une manière générale, ces patients consultent un médecin pour une aménorrhée primaire à l'âge pubertaire. Le développement mammaire se produit normalement en raison de la synthèse des œstrogènes à partir de la testostérone testiculaire [Grinspon and Rey, 2020]. Les poils pubiens et axillaires sont absents ou très rares, le vagin est court et aveugle et l'utérus est absent, car la production d'AMH est normale dans la vie fœtale. Le diagnostic est, généralement, posé plus tôt lorsqu'un testicule est trouvé au cours de la réparation d'une hernie inguinale chez une fille apparemment normale. L'histologie testiculaire est normale à la naissance, mais le nombre de cellules germinales diminue rapidement. En raison de l'insensibilité aux androgènes, la méiose ne peut pas se produire et les spermatozoïdes ne sont pas produits [Grinspon and Rey, 2020].

Le syndrome d'insensibilité partielle aux androgènes (PAIS) résulte des mutations moins graves du gène qui code pour le récepteur aux androgènes. Les nouveau-nés peuvent présenter différents degrés de virilisation des organes génitaux externes [Grinspon and Rey, 2020]. Il n'y a ni de trompes de Fallope ni d'utérus. Le diagnostic est difficile en absence d'antécédents familiaux et ne peut pas être facilement distingué du déficit en 5 α -réductase de type 2 [Grinspon and Rey, 2020]. Contrairement à ce qui est observé dans le syndrome d'insensibilité complète aux androgènes, la testostérone et la LH sont généralement élevées au cours de la période d'activation postnatale [Kreidberg et al., 1993]. À la puberté, le développement des poils pubiens et axillaires est rare et la gynécomastie est fréquente. Le taux de testostérone peut augmenter et celui de l'AMH peut

diminuer. Une mutation peut entraîner différents phénotypes, même au sein d'une même famille, ce qui rend une corrélation génotype/phénotype très difficile à établir [Grinspon and Rey, 2020].

4.2.4. *Autres affections*

4.2.4.1. **Le syndrome de persistance des canaux de Müller**

Le syndrome de persistance des canaux de Müller est caractérisé par la persistance de l'utérus et des trompes de Fallope en raison de la présence des mutations au niveau des gènes codant pour l'AMH, ou son récepteur de type 2, chez un garçon normalement virilisé. À la naissance, la cryptorchidie ou la hernie inguinale sont les seules anomalies observées. Le diagnostic n'est pas anticipé, sauf s'il y a des antécédents familiaux, et la présence des canaux de Müller est généralement découverte lorsqu'une chirurgie est effectuée pour corriger la cryptorchidie ou la hernie inguinale [Grinspon and Rey, 2020]. Des mutations dans les gènes *AMH* ou *AMHR2* sont retrouvées chez environ 85% des patients atteints de syndrome de persistance des canaux de Müller [Grinspon and Rey, 2020]. La concentration de la testostérone sérique et des gonadotrophines sont normale. L'AMH est indétectable chez les patients présentant des mutations au niveau du gène *AMH*, et sont de concentration masculine normale chez les patients présentant des mutations au niveau du gène *AMHR2* [Grinspon and Rey, 2020].

4.2.4.2. **L'hypospadias**

L'hypospadias est une fusion incomplète de l'urètre du pénis définie par un arrêt du développement du spongieux urétral et du prépuce ventral [Baskin and Ebbers, 2006]. Il s'agit d'une anomalie congénitale courante, avec une prévalence estimée à la naissance de 1:125 à 1:300 nouveau-nés vivants [Boisen et al., 2005]. La cause de l'apparition d'un hypospadias est inconnue dans la plupart des cas, mais on suppose qu'il existe une interaction de facteurs génétiques et environnementaux [George et al., 2015; Geller et al., 2014].

La prise en charge des patients avec un hypospadias est généralement chirurgicale. Le méat urétral est déplacé vers le gland et le pénis est redressé en corrigeant n'importe quelle courbure pour donner un flux urinaire normal et dirigé vers l'avant, et une capacité d'avoir des rapports sexuels satisfaisants. Les réparations se font généralement à partir de 6 à 12 mois et peuvent nécessiter plus qu'une étape [Achermann and Hughes, 2016].

4.2.4.3. **La cryptorchidie**

La cryptorchidie est l'échec de la migration d'un ou des deux testicules. Il s'agit de l'une des anomalies congénitales les plus courantes, survenant chez 1% à 9% des garçons dans le monde [Gurney et al., 2017]. Bien que chez la plupart de ces cas, la descente testiculaire se poursuit spontanément au cours des 3 premiers mois, 1% des garçons présentent encore une cryptorchide à

la fin de la première année. Le traitement primaire de la cryptorchidie est une intervention chirurgicale appelée orchidopexie. La descente des testicules est importante pour le bon fonctionnement des testicules en raison de la différence de température entre le corps et le scrotum. La cryptorchidie augmente le risque d'une infertilité. Le risque de développer un cancer des testicules est également lié à la cryptorchidie et il est considérablement plus élevé si la chirurgie n'est pas effectuée avant le début de la puberté [Achermann and Hughes, 2016].

4.3.DSD 46,XX

La catégorie des patients DSD 46,XX peut être divisé en 3 groupes : 1) troubles du développement ovarien, 2) troubles de la synthèse des androgènes et 3) autres affections [Hughes et al., 2006].

4.3.1. Les troubles du développement ovarien

Les troubles du développement ovarien se manifestent généralement par une absence de la puberté en raison d'une faible production d'œstrogène. D'autres troubles du développement gonadique peuvent entraîner chez une personne 46,XX un ovaire contenant du tissu testiculaire (DSD 46,XX ovotesticulaire) ou un testicule capable de produire suffisamment d'androgène pour un phénotype masculin et suffisamment d'AMH pour régresser l'utérus (DSD 46,XX testiculaire) [Achermann and Hughes, 2016].

4.3.1.1. Dysgénésie ovarienne

Les dysgénésies ovariennes surviennent le plus souvent à la suite d'une aneuploidie des chromosomes sexuels (par exemple, syndrome de Turner ; 45,X et variations) avec apoptose ovarienne progressive. Une dysfonction ovarienne peut également se produire avec une large gamme de syndromes multisystémiques, impliquant souvent des mécanismes de réparation de l'ADN [Achermann and Hughes, 2016]. Plusieurs causes d'une insuffisance ovarienne primaire (POI) ou prématurée (POF) ont été décrites, y compris POF1 (Xq26-q28, *FMRI*), POF2A (Xq22, *DIAPH2*), POF2B (Xq2, *POF1B* (actin-binding protein)), POF3 (3q22, *FOXL2*), POF4 (Xp11.2, *BMP15*), POF5 (7q35, *NOBOX*), POF6 (2p12, *FIGLA*), POF7 (9q33, *NR5A1*), POF8 (7q22, *STAG3*), POF9 (1p22, *HFMI*) et POF10 (20p12, *MCM8*), ainsi que des mutations au niveau du gène *POLG* [Lacombe et al., 2006; AlAsiri et al., 2015; Pagnamenta et al., 2006].

Tableau 4: Liste des gènes (non exhaustive) impliquées dans la survenue des troubles du développement ovarien et de l'excès d'androgène

Gene	Protéine	OMIM	Locus	Transmission	Gonades	Structures Mullérienne	OGE	Caractéristiques associées
<i>Troubles du développement ovarien</i>								
SRV	FT	480000	Yp11.3	Translocation	Testiculaires ou ovotestis	-	Masculins ou ambigus	
SOX9	FT	608160	17q24	dup17q24 ou del de la région de régulation	N'est pas déterminé	-	Masculins ou ambigus	
SOX3	FT	313430	Xq27.1	dup Xq27 ou del de région de régulation	Testiculaires (variable)	-	Masculins	Caractéristiques supplémentaires si la duplication est importante
RSP01	Thrombospondine (Signalisation Wnt)	609595	1p34.3	AR	Testiculaires ou ovotestis	-	Masculins	Hyperkératose palmo-plantaire, carcinome épidermoïde
WNT4	Signalisation Wnt	611812	1p36.12	AR	Testiculaires ou ovotestis	-	Masculins ou ambigus	Syndrome de SERKAL
<i>Excès d'androgène</i>								
HSD3B2	Enzyme	201810	1p13.1	AR	Ovaires	+	Clitormégalie (légère)	CAH, insuffisance surrénale primaire, partielle androgénisation due à la ↑ conversion de la DHEA
CYP21A2	Enzyme	201910	6p21.33	AR	Ovaires	+	Ambigus ; rarement Prader-V	CAH, spectre phénotypique des formes sévères de perte de sel associées à une insuffisance surrénale aux formes virilisantes simples avec fonction surrénale compensée, ↑ 17-OHP
CYP11B1	Enzyme	202010	8q24.3	AR	Ovaires	+	Ambigus ; rarement Prader-V	CAH, hypertension due à la ↑ 11-désoxycorticostérone
POR (P450 oxidoreductase)	Enzyme CYP Donneur d'électrons	124015	7q11.23	AR	Ovaires	+	Normal ou ambigus	Caractéristiques mixtes du déficit en 21-hydroxylase, du déficit en 17α-hydroxylase/17-20-hase et du déficit en aromatase ; associée à la craniostose Antley-Bixler
CYP19	Enzyme	107910	15q21.2	AR	Ovaires	+	Ambigus	Androgénisation maternelle pendant la grossesse, absence de développement mammaire à la puberté sauf dans les cas partiels
Récepteur glucocorticoïde (NR3C1)	Récepteur nucléaire (facteur de transcription)	138040	5q31.3	AR	Ovaires	+	Normal ou ambigus	↑ ACTH, 17-OHP, cortisol, minéralocorticoïdes et androgènes

FT : Facteur de transcription ; AR : autosomique récessive

4.3.1.2. DSD 46,XX Ovotesticulaire et DSD 46, XX testiculaire

Dans de rares situations, l'ovaire en développement peut contenir du tissu testiculaire, DSD 46,XX ovotesticulaire, ou peut même se développer comme un testicule fonctionnel, 46,XX testiculaire) [Achermann and Hughes, 2016]. Dans le cas de DSD 46, XX Ovotesticulaire, le patient présente généralement des organes génitaux ambigus à la naissance et une virilisation progressive à la puberté si le composant testiculaire n'est pas retiré. En revanche, le DSD 46,XX testiculaire est généralement associé à un phénotype masculin à la naissance et à l'absence de structures müllériennes. Cependant, l'infertilité se produit dans les deux situations car les gènes cruciaux de la spermatogenèse situés sur le chromosome Y sont absents [Achermann and Hughes, 2016].

De nombreux problèmes rencontrés chez les patients DSD 46,XX Ovotesticulaire sont similaires à ceux du chimérisme 46,XX/46,XY. La translocation et la régulation positive des gènes déterminant les testicules (par exemple, *SRY*, *SOX9*) ont été trouvées dans de rares cas. Ainsi, un dysfonctionnement partiel du gène répresseur des testicules ovariens *RSPO1* a été décrit dans un cas de DSD 46, XX ovotesticulaire [Tomaselli et al., 2008]. En revanche, les patients avec DSD 46, XX testiculaire présentent souvent en premier lieu une infertilité masculine, bien que parfois des hypospadias soient présents. Dans certains cas, des antécédents familiaux sont retrouvés avec différents phénotypes [Achermann and Hughes, 2016].

Jusqu'à 80% des mâles 46,XX ont une région du matériel chromosomique Y contenant le gène *SRY*. Les individus avec une translocation du gène *SRY* peuvent être diagnostiqués par une analyse de FISH, en utilisant une sonde dirigée vers ce gène. Un certain nombre de cas négatifs pour la *SRY* ont été signalés. Des altérations du chromosome X entraînant une surexpression de *SOX3* ont été également décrites [Sutton et al., 2011]. Des mutations de perte de fonction dans *RSPO1* (un gène ovarien codant pour la R-spondine 1) ont été signalées chez des personnes atteintes de DSD 46, XX testiculaire avec une hyperkératose palmo-plantaire (Figure 31) et un carcinome épidermoïde [Parma et al., 2006]. La perte de fonction de la R-spondine 1 chez des individus 46, XX peut entraîner un développement des testicules et par conséquent un phénotype mâle stérile [Achermann and Hughes, 2016].

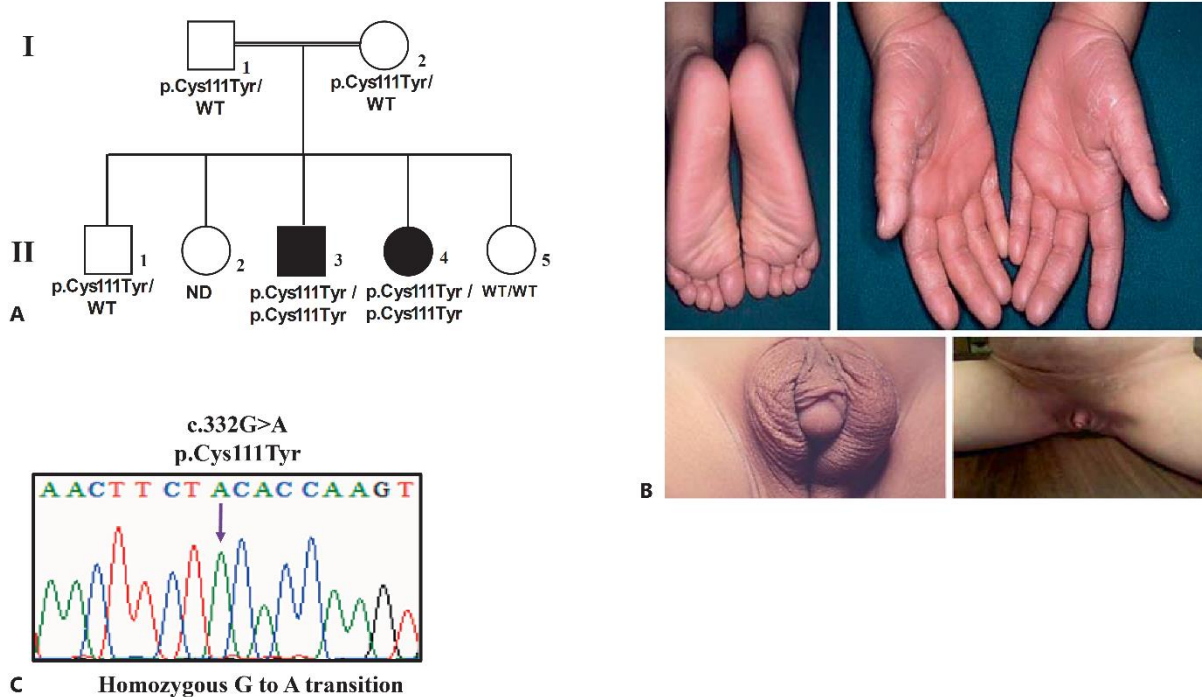


Figure 31: Cas d'une famille marocaine avec deux enfants atteints d'une anomalie de développement sexuel et keroderma palmoplantaire

Cas familial de DSD 46, XX et keroderma palmoplantaire. A) Un pedigree de la famille indiquant le génotype de la mutation p.Cys111Tyr chez les individus affectés et non affectés (ND, non déterminé). B) Les détails cliniques des 2 frères et sœurs montrant le palmoplantaire kératodermie de II.3 (en haut), l'hypospadias postérieur et transposition scrotale de II.3 (en bas à gauche), et l'hypertrophie clitoridienne de III.4 (en bas à droite) C) électrophérogramme de II.3 indiquant la position de la mutation c.332G> A homozygote [Naasse et al., 2017].

4.3.2. Les troubles de l'excès d'androgènes

4.3.2.1. Déficit en 3β-HSD de type II

En plus d'être impliqué (et détaillé) dans les DSD 46,XY, le déficit en HSD3B2 peut aussi se manifester chez des filles DSD 46,XX. Ainsi, des mutations sévères récessives peuvent provoquer, chez les filles présentant un déficit en glucocorticoïdes (avec ou sans perte de sel), une légère hypertrophie clitoridienne à la naissance. Cette virilisation modérée se produit non pas comme un effet androgène direct de l'excès de DHEA mais comme résultat de sa conversion en testostérone par HSD3B1, qui est exprimé dans le placenta et dans les tissus périphériques du fœtus [Achermann and Hughes, 2016]. Ceci peut augmenter les niveaux d'androgènes circulants chez le fœtus féminin et provoquer une clitoromégalie modeste chez une minorité de patientes. Le développement mammaire peut se produire à la puberté chez des filles atteintes, et une présence de règles a été signalée chez des femmes traitées [Achermann and Hughes, 2016].

4.3.2.2. Déficit en 21-hydroxylase

Le déficit en CYP21 est l'une des causes les plus courantes de l'apparition d'une ambiguïté génitale chez un nouveau-né. Il affecte environ 1 enfant sur 18000. La plupart des patients sont

des filles 46,XX avec divers degrés de virilisation des organes génitaux, comme illustré par la classification Prader (Figure 32) [White and Bachega, 2012; Khalid et al., 2012].

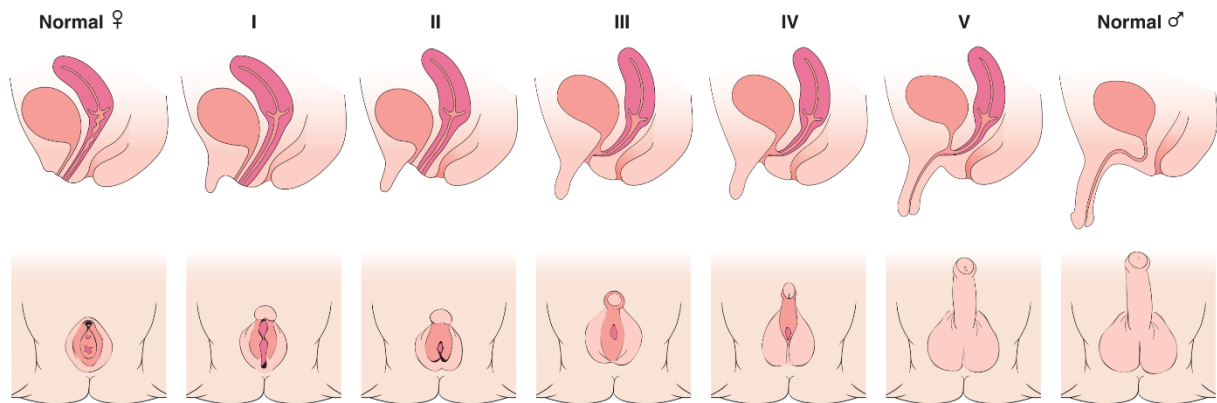


Figure 32: Méthode de détermination de degré de virilisation de Prader

[Donohoue, 2018]

4.3.2.3. Déficit en POR

En plus d'être impliqué (et détaillé) dans les DSD 46,XY. Un déficit en POR peut être associée à des organes génitaux ambigus chez des nouveau-nés 46,XX [Fukami et al., 2009; Idkowiak et al., 2012]. La virilisation de fœtus 46,XX peut résulter d'un défaut de l'activité de l'aromatase ou se produire via une voie d'alternance de production de DHT qui n'implique pas l'androstènedione ou la testostérone comme intermédiaires [Biason-Lauber et al., 2013]. Les enfants atteints de cette maladie ont généralement une carence en cortisol, mais la fonction minéralocorticoïde est relativement conservé. Une surveillance attentive de la puberté est nécessaire car elle peut être retardée ou interrompue [Flück et al., 2011].

4.3.2.4. Déficit en 11 β -hydroxylase

La 11 β -hydroxylase est codée par le gène *CYP11B1*. Ce dernier est localisé au niveau du chromosome 8q21-22 en tandem avec le *CYP11B2* qui code pour l'aldostérone synthase. [Achermann and Hughes, 2016].

Le déficit en 11 β -hydroxylase (*CYP11B1*) est un trouble de la stéroïdogénèse surrénale. Il peut provoquer une virilisation profonde chez un fœtus femelle atteint. Il représente 5% à 8% des patients atteints de CAH [Nimkarn and New, 2008; Parajes et al., 2011].

Le déficit en 11 β -hydroxylase conduit généralement à l'apparition des organes génitaux ambigus chez le nouveau-né 46,XX, bien que dans certaines situations, la virilisation peut être si grave que le bébé est considéré comme un garçon avec un petit pénis et des testicules non descendus [Soardi et al., 2009]. Par la suite, durant l'enfance, il peut y avoir une hyperandrogénie

et une puberté précoce, avec une accélération de la croissance et de la maturation squelettique. [Reisch et al., 2013].

4.3.2.5. Déficit en aromatasase

L'aromatase (CYP19A1) est la seule enzyme du cytochrome P450 connue pour catalyser la conversion des androgènes (stéroïdes C19) en œstrogènes (stéroïdes C18) chez l'homme [Santen et al., 2009]. L'aromatase est exprimée dans de nombreux tissus, y compris le placenta, l'ovaire, le cerveau, les os, l'endothélium vasculaire, les seins et le tissu adipeux, où elle est régulée par un certain nombre de promoteurs spécifiques pour convertir la testostérone en œstradiol et l'androstènedione en œstrone. L'aromatase joue un rôle crucial dans la production locale d'œstrogènes et dans la synthèse des œstrogènes circulants de l'ovaire au moment de la puberté [Achermann and Hughes, 2016].

Un déficit en aromatasase, dû à des mutations héréditaires récessives du *CYP19*, a été décrit chez plusieurs filles 46,XX DSD. L'aromatase joue un rôle essentiel dans la protection du fœtus contre une exposition excessive aux androgènes in utero. En absence d'aromatase, l'œstrogène ne peut pas être synthétisé par le placenta, et de grandes quantités de testostérone placentaire et d'androstènedione sont transférées dans la circulation fœtale et maternelle, entraînant une virilisation de la mère et de son fœtus féminin [Shozu et al., 1991].

Les filles 46,XX présentant une insuffisance en aromatasase naissent avec une clitoromégalie, divers degrés de fusion postérieure, une scrotalisation des plis labioscrotaux et, chez certains nouveau-nés avec un sinus urogénital, un seul orifice périnéal avec des structures müllériennes normales [Belgorosky et al., 2009; Conte et al., 1994]. À la puberté, les filles atteintes présentent un hypogonadisme hypergonadotrope et ne parviennent généralement pas à développer des caractéristiques sexuelles secondaires féminines avec une virilisation progressive. Les taux plasmatiques d'androstènedione et de testostérone sont élevés et les niveaux d'œstrone et d'œstradiol sont faibles [Achermann and Hughes, 2016].

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Patients

1.1. Cohorte des couples avec FCSR

Dans la première partie de l'étude, nous avons examiné la base de données d'analyse cytogénétique de tous les couples présentant des fausses couches spontanées à répétition (perte de deux grossesses ou plus avant 20 semaines de gestation), qui ont été référés au département de cytogénétique-IPM entre 1996 et 2016.

Tous les patients ayant une déficience intellectuelle, un syndrome de Down, un syndrome polymalformatif, une anomalie de développement sexuel et les patients sans informations cliniques ont été exclus.

1.2. Cohorte des patients avec une ambiguïté génitale, une aménorrhée et un phénotype de Turner

Dans la deuxième partie de l'étude, nous avons examiné la base de données d'analyse cytogénétique de tous les patients atteints d'une ambiguïté génitale, d'une aménorrhée et d'un phénotype de Turner qui ont été référés au département de cytogénétique-IPM entre 1996 et 2016.

Tous les patients soupçonnés d'avoir une déficience intellectuelle syndromique ou non syndromique, les patients atteints de syndrome polymalformatif, les couples avec fausse couche spontanée à répétition et les patients sans informations cliniques ont été exclus.

1.3. Cohorte des patients DSD

Dans la troisième partie de l'étude, nous avons recrutés 3 familles qui ont eu un enfant atteint d'une anomalie de développement sexuel. Les patients ont été référés à l'IPM dans le but d'identifier la cause génétique de l'apparition de cette anomalie de développement sexuel.

1.4. Conformité et éthique

Cette étude est approuvée par le comité local d'éthique de la recherche de l'Institut Pasteur du Maroc et le comité d'éthique pour la recherche biomédicale de la faculté de médecine et de pharmacie de Casablanca, Maroc.

2. Analyse cytogénétique conventionnelle

Le caryotype est une technique qui permet d'étudier l'aspect morphologique de l'ensemble des chromosomes d'une cellule au cours de la métaphase. Pour l'analyse cytogénétique de routine, le sang périphérique (2 à 3 ml) a été prélevé dans des tubes héparinés et incubés dans une solution de RPMI-1640 en présence de phytohémagglutinine pendant 72 h à 37 °C. La colchicine a été

ajoutée deux heures avant la fin de la culture. Après une centrifugation, le culot récupéré a été traité avec une solution hypotonique (0,075 M KCl) et fixé par le fixateur de carnoy (acide acétique/méthanol 1/3). Les suspensions de cellules fixes ont été étalées sur des lames de verre à l'aide d'une pipette Pasteur. Ces lames étaient immergées dans le fixateur Berger, puis, dans le milieu dénaturant Earle. Une coloration de Giemsa a été effectuée par la suite et les lames ont été lues par la technique de bande G à l'aide d'un microscope connecté à un ordinateur via une caméra. Au moins 20 métaphases ont été comptées pour chaque échantillon. Les chromosomes ont été classés en plusieurs groupes et numérotés selon le système international de nomenclature cytogénomique humaine.

3. Analyse génétique moléculaire

3.1.Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN génomique a été réalisée en utilisant le kit PureLink® Genomic DNA Mini Kit Invitrogen. Ce kit est conçu pour un isolement efficace de l'ADN génomique à partir des cellules et des tissus de mammifères, des queues de souris/rats, des échantillons sanguins et des bactéries. Ce kit utilise une technologie de membrane exclusive à base de silice qui fixe l'ADN et permet d'avoir un rendement élevé.

Un volume de 200 µl de sang total a été mis dans un tube eppendorf stérile (1,5 ml), additionné d'un volume de 20µl de Protéinase K (20mg/ml) et 20µl de RNase A (20mg/ml). La protéinase K est utilisée pour hydrolyser toutes les protéines associées à l'ADN et la RNase A pour éliminer tous les ARN. Ensuite, le tube a été vortexé et laissé 2 minutes à température ambiante. 200µl du tampon Purelink Genomic Lysis/Binding Buffer a été ajouté à la préparation et l'ensemble a été vortexé jusqu'à l'obtention d'une solution homogène. Puis, le tube a été incubé à 56°C pendant 10 minutes afin de favoriser la digestion des protéines. À la fin, un volume de 500µl d'éthanol a été ajouté au lysat et toute la préparation a été vortexée pendant cinq secondes afin d'obtenir une solution homogène.

Un volume de 640µl du lysat a été ajouté à la colonne et placé dans un tube collecteur, ensuite centrifugé à 10 000 × g pendant 1 minute à température ambiante. Cette étape d'extraction est basée sur l'absorption de l'ADN dans une mini-colonne contenant une membrane de silice.

Un volume de 500µl de Wash Buffer 1 a été ajouté à la colonne, cette dernière a été centrifugée à 10 000 ×g pendant 1 minute. Ensuite le tube de collecte a été changé par un nouveau tube de collecte propre et un volume de 500µl de Wash Buffer 2 a été rajouté à la colonne. À la fin, une centrifugation à la vitesse maximale a été réalisée pendant 3 minutes. Cette étape est essentielle

puisqu'elle permet l'élimination des composants cellulaires retenus dans la membrane de silice avec l'ADN.

Pour éluer l'ADN retenu dans la membrane de silice, la colonne a été placée dans un nouveau tube stérile (1,5ml), un volume de 30µl de tampon d'élution a été rajouté afin de récupérer 80 à 90% d'ADN, la colonne a été laissée 1 minute à température ambiante, et une centrifugation à la vitesse maximale a été effectuée pendant 1 minute. Pour récupérer le reste d'ADN retenu dans la colonne une autre élution a été réalisée dans un nouveau tube stérile.

L'ADN purifié a été conservé dans le tampon d'élution à une température de -20°C. La concentration et la qualité de l'ADN extrait ont été déterminées respectivement par le spectrophotomètre NanoVue™ et par une électrophorèse sur un gel d'agarose à 2 %.

3.2. Identification de nouvelles mutations chez les patients DSD

3.2.1. Mise en évidence de la région de détermination du sexe (SRY) par PCR

La détection du gène SRY chez les patients atteints d'une anomalie de développement sexuel a été réalisée à partir de l'ADN lymphocytaire du sang périphérique par PCR, en utilisant des séquences spécifiques (STS) pour cette région selon les recommandations de l'académie européenne d'androgénologie (EAA) : les amorces sY14 (470 pb) utilisées sont :

- SY14 F (Forward): 5' GAATATTCCCGCTCTCCGGA 3'
- SY14 R (Reverse): 5' GCTGGTGCTCCATTCTTGAG 3'

La PCR a été réalisée dans un volume total de 15µL, contenant 3µL d'ADN génomique (~15 à 25ng), 1,2µL des dNTP (désoxyribonucléotides) (2,5mM), 0,3µL de chaque amorce (20mM), 0,45µL de MgCl₂ (50mM), 0,05µL de la Taq polymérase (5U/µL) et 1,5µL du tampon PCR (10×). Elle s'est déroulée selon les conditions suivantes : une dénaturation initiale à 95°C pendant 5 minutes, suivie de 35 cycles, chacun comprend une dénaturation à 94°C pendant 40s, une hybridation à 61°C pendant 40s et une extension à 72°C pendant 50s. à la fin des 35 cycles une extension finale a été réalisée pour une durée de 7 min.

Le produit PCR a été contrôlé par électrophorèse sur gel d'agarose 3% en présence d'un marqueur de taille de 100pb. Ceci pour vérifier sous les rayons UV la présence du fragment du gène SRY dont la taille est de 472 pb.

3.2.2. Séquençage à haut débit, séquençage d'exomes

Le séquençage de l'exome a été réalisé sur la plate-forme Illumina HiSeq2000 ou HiSeq2500 avec le kit TruSeq v3 chemistry à la suite de l'enrichissement (ou la capture) des exons avec le kit Agilent SureSelect Human All Exon V4 ou V5. Ce kit se base sur la technologie SureSelect qui

permet la capture des exons selon la méthode d'enrichissement en solution. En effet, l'ADN génomique a été fragmenté et a été lié à des oligonucléotides adaptateurs puis les fragments ont été hybridés avec des milliers d'oligonucléotides (appâts/baits) biotinylés qui, collectivement, assurent la couverture de l'ensemble de l'exome. Les complexes fragments d'ADN/d'oligonucléotides biotinylés ont été purifiés à l'aide de billes magnétiques recouvertes de streptavidine. Après l'éluion de l'ADN capturé, les fragments ont été fixés sur un support solide et amplifiés (bridge amplification), ce qui mène à la création de foci où se retrouvent multiples copies du même fragment d'ADN (cluster generation).

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

3.2.3. Séquençage de Sanger

La procédure se divise en 5 étapes successives :

Purification des produits d'amplification : Les produits PCR ont été d'abord purifiés pour enlever les amorces et les nucléotides (dNTPs) non utilisés. Cette purification a été réalisée par l'utilisation de deux enzymes : l'exonucléase I (EXO I) 10 U/ μ L qui permet d'éliminer les amorces libres grâce à son activité exonucléasique et la phosphatase alcaline (2 U/ μ L) qui enlève les phosphates en 5' des dNTP et rend leur incorporation dans l'ADN impossible. Ainsi, pour 4 μ L de produit PCR, 1 μ L de la phosphatase alcaline, 0,5 μ L de l'EXO1 et 1 μ L d'eau ont été ajoutés. Le mélange est ensuite incubé à 37 °C pendant 15 min puis 80°C pendant 15 min.

Réaction de séquence : Les purifiées ont été soumises à une réaction de séquence visant l'incorporation des acides nucléiques marqués aux 4 fluorochromes (rouge, bleu, noir, vert). Chaque réaction de séquence nécessite 7 μ L du produit PCR purifié, un mélange réactionnel contenant 2 μ L du Big Dye sequencing Buffer du kit « BigDyeTerminatorV3.1 » (concentré 1X), 0,32 μ L d'amorce sens ou antisens (20 mM), 1 μ L du Ready Reaction Premix (concentré 1X) et 1,68 μ L de l'eau distillée stérile pour avoir un volume final de 12 μ L. Le programme permettant la

réaction de séquence comprend une dénaturation initiale à 96°C pendant 1 min suivie de 25 cycles de réaction de séquence (10 s à 96°C, 5 s à 50°C, 4 min à 60°C). La conservation a été réalisée à 4°C.

Purification du produit de réaction de séquence : La purification du produit de réaction de séquence permet d'éliminer les réactifs en excès et de reprendre le produit final dans une solution adaptée à la migration électrophorétique. Le protocole repose sur une purification EDTA éthanol. Brièvement, un mélange contenant le produit de réaction de séquence plus 5 µl d'EDTA (125mM), 35µl d'Ethanol 100% a été incubé à température ambiante pendant 15 minutes puis centrifugé pendant 45 minutes à 4500 trs/min et à 12°C. Le surnageant a été éliminé par retournement et centrifugation brève à l'envers pendant 30s à 1200 trs/min, puis pendant 60s à 3000 trs/min pour éliminer l'excès d'éthanol. Le culot a été ensuite repris par 35 µl d'éthanol 70%, centrifugé à 3500 trs/min pendant 15 min à 4°C. Le surnageant a été à nouveau éliminé par retournement et centrifugation brève à l'envers pendant 30s à 1200trs/min, puis pendant 60s à 3000 trs/min. Le culot séché à température ambiante pendant 15 min a été repris par 20 µl du tampon d'injection Hi-Di formamide.

Electrophorèse capillaire : Les différents échantillons préparés ont été introduites dans une plaque de 96 puits et chargés sur un séquenceur ABI Prism 3130XL pour réaliser l'électrophorèse capillaire.

Analyse des séquences : La recherche de variations et des mutations à partir de l'électrophérogramme a été effectuée à l'aide du logiciel BioEdit Sequence Alignmet

4. Analyse bio-informatique

4.1.Récupération du jeu de données

Les données sur la séquence et les variants du gène *PIWIL1* ont été obtenues via la base de données NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) et Ensembl 96 (<https://www.ensembl.org>) en juin 2019.

La séquence FASTA de la protéine PIWIL1 a été extraite de la base de données UNIPROT (<http://www.uniprot.org/>) [Q96J94].

4.2.Identification des variants les plus délétères

Huit différents outils bio-informatiques ont été utilisés pour prédire les effets fonctionnels des nsSNPs. Ces programmes algorithmiques comprenaient : SIFT, PolyPhen-2, Mutation Assessor, MutationTaster, PROVEAN, Condel, LRT et Fathmm. Le Tableau 5 décrit l'ensemble de ces outils.

Tableau 5: Description des outils de prédiction computationnelle utilisés dans la présente étude

Outils	Description de l'outil
SIFT (Sorting Intolerant from Tolerant)	Un logiciel basé sur l'homologie et les alignements de séquences protéiques avec un grand nombre des séquences homologues et des scores d'assesseurs à chaque résidu, allant de zéro à un. Les scores SIFT $\leq 0,05$ sont prévus par l'algorithme pour être des substitutions d'acides aminés intolérants ou délétères, alors que les scores $> 0,05$ sont considérés comme tolérants [Sim et al., 2012].
PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer)	Il prédit si le changement affecte la fonction de la protéine. PROVEAN évalue différents types de variation non-synonyme. La requête d'entrée est la séquence protéique [Choi et al., 2012].
FATHMM (Functional Analysis through Hidden Markov Models)	Prédiction principalement basée sur la conservation des acides aminés et domaines protéiques, ainsi qu'aux phénotypes associés. Cette méthode est ensuite pondérée (contrairement à SIFT et PolyPhen) de manière espèce-spécifique, en intégrant des données de fréquence espèce-spécifiques de neutralité ou de pathogénicité des acides aminés au sein d'un domaine conservé [Shihab et al., 2015].
MUTATION ASSESSOR	Prédiction de conséquence fonctionnelle basée sur la conservation inter-espèces des acides aminés au sein des protéines homologues [Reva et al., 2011]
LRT (Likelihood Ratio Test)	Le score est basé sur la conservation des acides aminés dans 32 espèces, dans le but d'identifier les mutations très probablement délétères [Chun and Fay, 2009].
POLYPHEN-2 (Polymorphism Phenotyping-2)	Un outil de calcul dans lequel les prédictions sont basées sur une combinaison d'informations phylogénétiques, structurelles et d'annotations de séquence caractérisant une substitution et sa position dans la protéine. Les scores de PolyPhen ont été classés comme « bénins », « potentiellement dommageables » ou « probablement dommageables » [Adzhubei et al., 2013].
MUTATION TASTER	Applique à chaque mutation une probabilité qu'elle soit plutôt pathogène ou qu'il s'agisse d'un polymorphisme, en fonction d'une base de plus de 390 000 mutations pathogènes identifiées (HGMD) et des 6 800 000 polymorphismes identifiés dans le projet 1000 Genomes [Schwarz et al., 2014].
CONDEL	Cet outil est considéré comme un score « d'ensemble » puisqu'il intègre les résultats de nombreux scores de pathogénicité (Logre, MAPP, Mutation Assessor, PolyPhen 2 et SIFT). C'est un exemple d'une utilisation combinée qui a pour objectif de centraliser les multiples sources d'informations en un score unique plus performant que chaque algorithme pris séparément [González-Pérez and López-Bigas, 2011].

4.3. Analyse de conservation

L'analyse de conservation a été réalisée à l'aide du serveur ConSurfweb (<http://consurf.tau.ac.il/>), qui est capable de prédire les régions fonctionnellement importantes

d'une protéine en estimant le degré de conservation des sites d'acides aminés sur la base de l'homologie.

Après identification des séquences homologues via l'algorithme de recherche HMMER. Un alignement multi-séquences des séquences homologues a été obtenu en utilisant MAFFT. Les scores de conservation spécifiques à la position ont été calculés en utilisant l'estimateur bayésien empirique. Les scores de conservation continue ont été divisés en une échelle discrète de neuf grades pour la visualisation.

- Les acides aminés les plus variables ont été colorés en vert (grade 1),
- Les acides aminés moyennement conservés ont été colorés en blanc (grade 5),
- Les acides aminés les plus conservés ont été colorés en violet (grade 9)

4.4. Structure tridimensionnelle du domaine PAZ de la protéine PIWIL1

La structure tridimensionnelle (3D) du domaine PAZ de la protéine PIWIL1 sous sa forme libre a été déterminée en utilisant la méthode de spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) par [Zeng et al., 2011]. Le fichier PDB [PDB ID : 2L5C] qui contient les coordonnées des atomes a été obtenu via la banque de données protéique PDB (<https://www.rcsb.org>). La création des structures tridimensionnelles du domaine PAZ avec des variants a été réalisée à l'aide du logiciel Pymol et la minimisation d'énergie pour toutes les structures 3D a été réalisée à l'aide du programme GROMACS [Pronk et al., 2013].

4.5. Analyse des changements de structures locales

La différence de structures tridimensionnelles locales entre le domaine PAZ natif (wt-PAZ) et les domaines PAZ avec des variants a été déterminée à l'aide du logiciel YASARA, qui est capable de générer les liaisons hydrogènes et les interactions hydrophobes entre l'acide aminé en question et les acides aminés qui les entourent [Krieger and Vriend, 2014].

4.6. Simulation de la dynamique moléculaire

4.6.1. Principe

La dynamique moléculaire (DM) est une technique couramment utilisée pour la simulation des molécules. Son objectif repose sur l'évolution du système en fonction du temps. Ceci est faisable en intégrant les équations de Newton relatives au système : $m_i \vec{a}_i = \vec{F}_i$

Où m_i est la masse d'un atome i , \vec{a}_i son accélération et \vec{F}_i la somme des forces qui lui sont appliquées du fait de son interaction avec les autres atomes et l'environnement. Or la force de l'équation précédente est le gradient de l'énergie potentielle de l'atome i :

$$\vec{F}_i = -\overrightarrow{\text{grad}}_i E_i(\vec{r}_1, \dots, \vec{r}_i, \dots, \vec{r}_n)$$

En connaissant l'énergie, on peut calculer la vitesse et donc la position de chaque atome. Le calcul de la trajectoire va se faire en intégrant numériquement les N équations à résoudre pour les N atomes du système à étudier. On obtient donc une succession de clichés instantanés du système. Pour obtenir des calculs stables, la valeur du pas d'intégration doit être extrêmement faible (1 fs = 10^{-15} s) de manière à prendre en compte les vibrations atomiques les plus rapides (ex : liaison C-H).

Les calculs de DM se font sous l'hypothèse ergodique : la moyenne d'une quantité sur un ensemble de particules équivalentes est égale à la moyenne sur le temps d'une particule. C'est cette hypothèse de physique statistique qui permet à la DM de calculer des propriétés physiques à partir d'une simulation de DM. La simulation de DM permet l'obtention d'informations sur la dynamique d'une macromolécule sans explorer l'ensemble de la surface d'énergie potentielle.

4.6.2. *Protocole expérimentale*

La simulation de la dynamique moléculaire a été réalisée, pour le domaine PAZ natif et les domaines PAZ avec des variants, par GROMACS 5.1.4 avec le champ de force CHARMM 27. Les atomes des protéines ont été placés dans une boîte cubique et le système a été optimisé pour effectuer les simulations. Le système a été solvato et neutralisé en ajoutant un nombre suffisant d'ions sodium ou chlorure. La minimisation de l'énergie a été réalisée en utilisant la méthode de descente de gradient sur 5000 étapes pour fournir une conformation stable. Après minimisation, des ensembles canoniques (NVT) ont été exécutés, à une température constante de 300 K pour 100 ps, suivis par des ensembles isobares-isothermes (NPT), avec une température constante de 300 K et une pression constante de 1 atm pour 100 ps. La production a été réalisé à 300 K pendant 50 ns. Les commandes `gmx rms`, `gmx rmsf` et `gmx gyrate` ont été utilisées pour calculer la déviation quadratique moyenne (RMSD), la fluctuation quadratique moyenne (RMSF) et le rayon de giration (Rg), respectivement. Tous les graphiques ont été créés à l'aide du logiciel QtGrace.

5. Analyse statistique

La comparaison de la fréquence des anomalies chromosomiques a été effectuée à l'aide du test du chi-2, lorsque les effectifs attendus sont inférieurs à 5, et à l'aide du test exact de Fisher, lorsque les effectifs sont supérieurs à 5. Les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du langage de programmation R.

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 1 : Nature et fréquence des anomalies chromosomiques chez des couples ayant subi des fausses couches spontanées à répétition

1. Introduction

Les fausses couches spontanées à répétition (FCSR) sont définies comme la perte des grossesses consécutives avant 20 semaines de gestation [Duckitt and Qureshi, 2011]. Depuis plus de 30 ans, la définition des FCSR a été largement discutée. La société américaine de médecine de la reproduction (ASRM), le comité international de surveillance des techniques de procréation assistée (ICMART) et l'organisation mondiale de la santé (OMS) ont défini les FCSR comme la perte de deux grossesses ou plus, pas nécessairement consécutives [Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, 2013; Zegers-Hochschild et al., 2009]. Selon cette définition, environ 3% de tous les couples essayant de concevoir sont atteints de FCSR. Cependant, si on considère la définition de la société européenne pour la reproduction humaine et l'embryologie (ESHRE) et le collège royal des obstétriciens et gynécologues (RCOG), qui définissent les FCSR comme la perte de trois ou plusieurs grossesses consécutives (pas nécessairement intra-utérine), l'incidence des FCSR chez les couples désirant un bébé est de 1% [Jauniaux et al., 2006; Green-top Guideline No.17, 2011].

À ce jour, de nombreuses étiologies potentielles de la FCSR ont été décrites, telles que: les facteurs génétiques (anomalies chromosomiques, aneuploïdie embryonnaire, variants génétiques), les facteurs anatomiques (malformations congénitales de l'utérus, anatomies acquises), l'incompétence cervicale, les facteurs infectieux, les facteurs endocriniens (dysfonctionnement thyroïdien, diabète sucré, Insuffisance lutéale, Syndrome des ovaires polykystiques) et les facteurs immunologiques comme le syndrome des antiphospholipides [Diejomaoh, 2015].

Les anomalies chromosomiques sont l'un des principaux facteurs génétiques des fausses couches spontanées à répétition. Le taux des anomalies chromosomiques dans la population générale est inférieur à 1% [Diejomaoh, 2015], alors qu'il est très élevé chez les couples avec FCSR [Jauniaux et al., 2006]. Les anomalies chromosomiques les plus courantes sont la translocation réciproque, le mosaïcisme des chromosomique sexuel et les inversions. Les translocations réciproques sont l'une des réarrangements structurels les plus fréquentes [Mierla et al., 2015]. Les individus porteurs de ce type de translocation sont cliniquement normaux, mais ils courent un risque accru d'avoir des enfants avec des caryotypes non équilibrés. Les translocations robertsoniennes sont plus présentes chez les hommes infertiles avec une fréquence de 3% par

rapport à la population générale dans laquelle cette incidence est d'environ 0,1% [Morin et al., 2017]. À notre connaissance, aucune étude rétrospective sur les anomalies chromosomiques n'a été réalisée, jusqu'à présent, sur les couples marocains qui ont subi des FSCR. Ainsi, ce présent travail est le premier au Maroc qui consiste à évaluer la fréquence et la nature des anomalies chromosomiques chez les couples marocains ayant subi des fausses couches spontanées à répétition et à comparer les résultats de tous les pays qui ont suivi la même stratégie d'étude.


2. Article 1

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'un article scientifique intitulé : Chromosomal abnormalities in couples with recurrent spontaneous miscarriage : a 21-year retrospective study, a report of a novel insertion, and a literature review.

L'article a été publié dans le journal : Journal of Assisted Reproduction and Genetics / Springer Editorial.



Chromosomal abnormalities in couples with recurrent spontaneous miscarriage: a 21-year retrospective study, a report of a novel insertion, and a literature review

Zouhair Elkarhat^{1,2} · Zineb Kindil¹ · Latifa Zarouf³ · Lunda Razoki³ · Jamila Aboulfaraj³ · Chadli Elbakay³ · Sanaa Nassereddine³ · Boubker Nasser² · Abdelhamid Barakat¹ · Hassan Rouba¹ 

Received: 31 May 2018 / Accepted: 14 November 2018
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

Purpose The aim of this study is to evaluate the frequency and nature of chromosomal abnormalities in Moroccan couples with recurrent spontaneous miscarriage (RSM). In addition, the data were compared with those reported elsewhere in order to give a global estimation of chromosomal abnormalities frequencies.

Methods The study was performed for all couples with RSM who were referred to the cytogenetic department, Pasteur Institute of Morocco, from different hospitals in Morocco between 1996 and 2016. Cytogenetic analysis was performed according to the standard method.

Results Among 627 couples with RSM, the chromosomal abnormalities were identified in 11.00% of couples, with chromosomal inversions in 4.30%, reciprocal translocations in 2.71%, Robertsonian translocations in 1.43%, and deletion, isochromosome, and insertion in 0.15% each. The insertion identified [46,XX,ins(6)(p24q21q27)] is new, and is the fourth reported in association with RSM. The mosaic karyotypes were observed in 0.64%, polymorphic variants were identified in 1.27%, and numerical aneuploidy was observed in 0.15%.

In regrouping our results with those in 27 other studies already published in 21 different countries, we obtained the frequency of chromosomal abnormalities in couple with RSM to be 5.16% (991/19197 couples). The reciprocal translocation was the most frequent with 2.50%, followed by Robertsonian translocation 0.83% and inversions 0.77%. The other types of chromosomal abnormalities were present with 0.98% in the world.

Conclusion This data showed that the frequency of chromosomal abnormalities in Moroccan couples with RSM is 11.00%, and in regrouping our results with other studies, the frequency changes to 5.16%.

Keywords Recurrent spontaneous miscarriage (RSM) · Chromosomal abnormalities · Reciprocal translocations · Robertsonian translocations · Inversions · Insertions

Introduction

Recurrent spontaneous miscarriage (RSM) also called recurrent spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss has

been traditionally defined as the loss of consecutive pregnancies before 20 weeks' gestation; this definition has been widely adopted [1–7]. Indeed, for more than 30 years, controversy exists on the number of pregnancy loss required to define the RSM and when diagnostic testing is needed [8]. The American Society for Reproductive Medicine (ASRM), International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART), and World Health Organization (WHO) have defined the RSM as the loss of two or more pregnancies, not necessarily consecutive [9, 10]. According to this definition, approximately 3% of all couples trying to conceive have RSM, but considering the definition of the European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) and the Royal College of Obstetricians and Gynecologists (RCOG) who defined the

✉ Hassan Rouba
hassan.rouba@pasteur.ma

¹ Laboratory of Genomics and Human Genetics, Département de la Recherche Scientifique, Institut Pasteur du Maroc, 1 Place Louis Pasteur, 20360 Casablanca, Morocco

² Laboratory of Neuroscience and Biochemistry, Faculty of Science and Technology, University Hassan 1er, 26000 Settat, Morocco

³ Laboratory of Cytogenetics, Institut Pasteur du Maroc, 20360 Casablanca, Morocco

RSM as the loss of three or more consecutive pregnancies (not necessarily intra-uterine), the incidence of RSM in couples desiring a baby is 1% [4, 11].

Until today, multiple potential etiologies for RSM have been described, such as genetic factors (chromosomal abnormalities, embryonic aneuploidy, genetic polymorphisms, and gene mutations); anatomical factors (congenital uterine malformations, acquired anatomic disorders); cervical incompetence; infective factors; endocrine factors (thyroid dysfunction, diabetes mellitus, luteal phase deficiency, PCOS); autoimmune factors/APS; and environmental, occupational, and personal habits [12].

Chromosomal abnormalities (CA) are one of the principal genetic factors in RSM. The rate of chromosomal abnormalities in the general population is less than 1% [12]. Reciprocal translocation (RT) is one of the most frequent structural rearrangements observed in humans [13]. The individuals carrying this type of translocation are clinically normal, but they do have an increased risk of having children with unbalanced karyotypes. Carriers of Robertsonian (Rob) translocations may also develop RSM and offspring with birth defects and mental retardation. Indeed, Robertsonian translocations are more present in infertile men with a frequency of 3% comparing with the general population in which this incidence is about 0.1% [14]. To the best of our knowledge, no retrospective study of chromosomal abnormalities has been performed so far on Moroccan couples with RSM. Thus, this is the first study conducted in Morocco to determine the frequency and nature of chromosomal abnormalities in Moroccan couples with RSM, in order to compare them with those reported elsewhere and give a global estimation of frequency of chromosomal abnormalities in these couples worldwide.

Materials and methods

Study population

In this retrospective study, we reviewed the cytogenetic analysis database of all couples with RSM (loss of two or more pregnancies before 20 weeks' gestation) who were referred to the cytogenetic department, Pasteur Institute of Morocco, from different hospitals in Morocco between 1996 and 2016.

All patients with intellectual disabilities, Down syndrome, polymalformative syndrome, and disorder of sex development and those without clinical information were excluded. Clinical information of all patients was collected and analyzed. The present study was approved by the local committee on research ethics of the Pasteur Institute of Morocco and performed following the STROBE guidelines.

Cytogenetic analysis

For routine cytogenetic analysis, peripheral blood (2–3 ml) was collected in heparin vacutainers and all samples were

incubated in an RPMI-1640 solution in the presence of phytohemagglutinin (PHA-E) for 72 h at 37 °C. Two hours before the end of the culture, colchicine was added. After centrifugation, the pellet recovered was treated with a hypotonic solution (0.075 M KCl). The samples were fixed by Carnoy's fixative (acetic acid/methanol 1/3 acid). Fixed cell suspensions were spread on glass slides using a Pasteur pipette. These slides were immersed in the fixative Berger. The slides were immersed in the denaturing medium Earle. Then, they underwent Giemsa staining, and finally reading slides by G-banding technique using a microscope connected to a computer through a camera. At least 20 metaphases were counted for each sample. The chromosomes were classified into several groups and numbered according to the International System for Human Cytogenomic Nomenclature.

Statistical analysis

The comparison of percentages was performed using the exact Fisher test. *P* values less than 0.05 were considered as statistically significant. All statistical analyses were performed using the R programming language.

Results

A total of 1254 individual cases comprising 627 couples with RSM were included in this study. All these patients had been referred to the cytogenetic department of the Pasteur Institute of Morocco, between 1996 and 2016, and they came from different parts of Morocco. The karyotype analysis revealed that 69 couples (11.00%) showed chromosome aberration, 22 men (3.50%) and 47 women (7.50%) (Table 1).

Structural chromosome abnormalities, which had been found in 56 cases (8.93%) (20 men and 36 women), are the most common chromosomal abnormalities. Twenty-seven cases (4.30%) of inversion (9 men and 18 women), 17 cases (2.71%) of reciprocal translocation (7 men and 10 women), 9 cases (1.43%) of Robertsonian translocation (3 men and 6 women), 1 case (0.15%) of deletion (1 man), 1 case (0.15%) of insertion (1 woman), and 1 case (0.15%) of isochromosome (1 woman) were found (Fig. 1). Mosaic karyotypes were observed in 4 women (0.64%); polymorphic variants in 8 cases (1.28%) (3 men and 5 women); and numerical aneuploidy in 1 case (0.16%) (1 man).

Reciprocal translocations

Reciprocal translocations were identified in 7 men and 10 women (2.71%). The chromosomes 1, 8, and 10 were found altered by reciprocal translocation in three cases each (2 men and 1 woman, 3 men, 3 women respectively). Chromosomes 6, 11, 14, 15, and 21 were also found altered in two women, while chromosome 18 showed reciprocal translocation in two

Table 1 The cytogenetic analysis results of patients with RSM

Cytogenetic grade	No. of cases (n = 1254)	Cytogenetic grade	No. of cases (n = 1256)
Chromosomal abnormalities	69		
Structural chromosome abnormalities	56		
Inversion	27	Insertion	1
46,XX,inv(7)(p1q21)	1	46,XX,ins(6)(p24q21q27)	1
46,XX,inv(9)(p11q13)	17	Isochromosome	1
46,XY,inv(9)(p11q13)	8	46,XX,i(9)(p10),i(9)(q10)	1
46,XY,inv(9)(p12q13)	1	Deletion	1
		46,X,del(Y)(q12)	1
Reciprocal translocation	17	Polymorphic variants	8
46,XX,t(1;7)(p16;q11)	1	46,XX,21ps+	3
46,XX,t(14;15)(q11;q23)	1	46,XX,9qh+	2
46,XX,t(14;17)(q33;q24)	1	46,XY,14ps+	1
46,XX,t(15;21)(q24;q22)	1	46,XY,21ps+	1
46,XX,t(2;11)(p14;q13)	1	46,XY,22ps+	1
46,XX,t(3;13)(3q24;13q34)	1	Numerical aneuploidy	1
46,XX,t(5;10)(p15;q26)	1	47,YYY	1
46,XX,t(6;10)(q22;q23)	1	Mosaicism	4
46,XX,t(6;11)(p21;q21)	1	46,XX/45,X0	2
46,XX,t(9;10)(q31;q25)	1	46,XX[89%]/46,XX,fra(16)(q22)[7%]/	1
46,XY,t(1;18)(q11;p11)	1	46,XX,del(16)(q22)[4%]	
46,XY,t(1;9)(q41;p23)	1	46,XX/47,XX,+mar	1
46,XY,t(13;19)(q33;q11)	1		
46,XY,t(2;8)(p22;p22)	1		
46,XY,t(3;18)(q28;q22)	1		
46,XY,t(7;8)(p21;p12)	1		
46,XY,t(8?;8?)(p22?;q23?)	1		
Robertsonian translocation	9		
45,XX,rob(13;13)(q10;q10)	1		
45,XY,rob(13;14)(q10;q10)	2		
45,XX,rob(13;14)(q10;q10)	1		
45,XX,rob(13;14)(p11;p11)	1		
45,XX,rob(13;22)(p11;p11)	1		
45,XY,rob(15;21)(q10;q10)	1		
45,XX,rob(21;21)(q10;q10)	1		
45,XX,rob(21;21)(p11;p11)	1		

men. Chromosomes 2, 3, 7, 9, and 13 were found altered in two cases (1 man and 1 woman).

Unlike one man who presented with reciprocal translocation on the 19th chromosome, two women showed this structural alteration on the 5th and 17th chromosomes respectively. No reciprocal translocation was identified on chromosomes 4, 12, 16, 20, 22, X, and Y (Fig. 1).

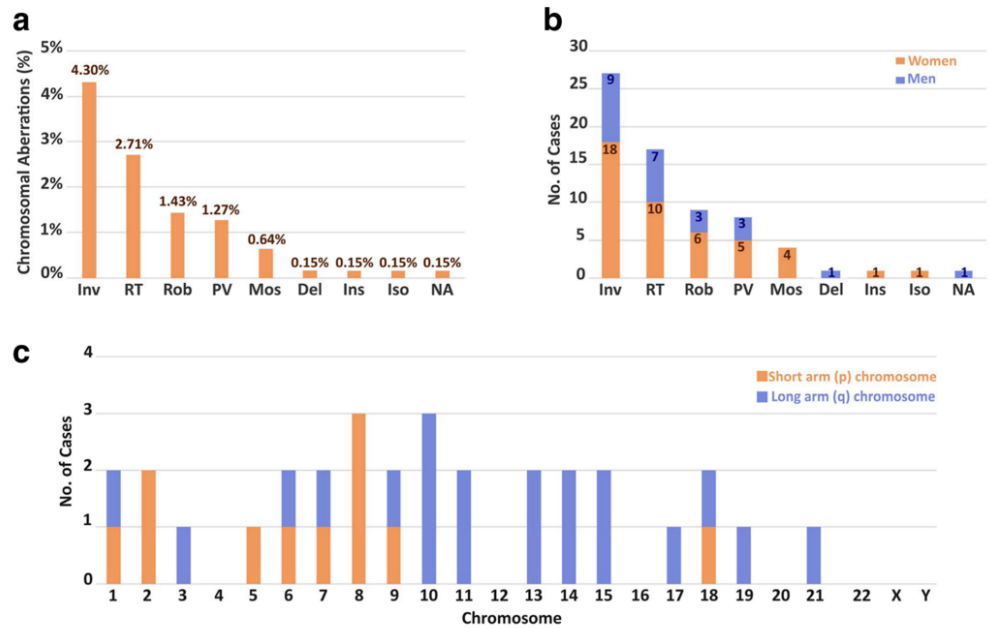
It should be noted that chromosomes cited above do not have the same translocation points. Thus, both chromosomes

2 and 5 were found altered in the short arm (p) while chromosomes 3, 10, 11, 15, 17, and 19 were found affected in the long arm (q), whereas chromosome 1, 6, 7, 8, 9, 13, 14, 18, and 21 were found affected in both arms (p and q) (Fig. 1).

Robertsonian translocations

Robertsonian translocations were seen in 3 men and 6 women (1.43%). Only chromosomes 13, 14, 15, 21, and 22 were

Fig. 1 Frequency of various chromosomal abnormalities and distribution of chromosomes involved in RSM. **a** Frequency of various chromosomal abnormalities in couples with RSM. **b** Gender distribution of various chromosomal abnormalities in couples with RSM. **c** Distribution of p and q arm chromosome involved in RSM. Inv, inversion; RT, reciprocal translocation; PV, polymorphic variation; Rob, Robertsonian translocation; Mos, mosaicism; Del, deletion; Ins, insertion; Iso, isochromosome; NA, numerical aneuploidy



found altered. Robertsonian translocations between chromosomes 13 and 14 were the most frequent. Translocations involving both the homologues of chromosome 13 and the homologues of chromosome 21 were observed in three women. Translocation between chromosomes (13, 22) and (15, 21) was identified in one woman and one man respectively.

Inversions, insertions, deletions, and isochromosomes

Inversions were identified in 9 men and 18 women (4.30%) on chromosome 7 (1 woman) and chromosome 9 (17 women and 9 men). Chromosome 7 was found affected in only one woman *inv(7)(p1q21)*, while on the chromosome 9, the *inv(9)(p12q13)* was observed in one man, and all the others carried the similar break point (*inv(9)(p11q13)*).

A new insertion that has not been previously reported was determined in one woman (0.15%). It is an insertion of the q21q27 fragment of chromosome 6 at the p24 of the same chromosome *ins(6)(p24q21q27)*.

Deletion and isochromosome were observed in one patient each (man and woman). The man (0.15%) showed a deletion in chromosome Yq12 and the woman (0.15%) had isochromosome (9) (p10) and isochromosome (9) (q10) instead of normal chromosome 9.

Numerical chromosomal abnormalities and mosaicism

47,YYY is the only numerical chromosomal abnormality identified in this study (0.15%), whereas the mosaic forms

were identified in 4 cases (0.64) (all of them women). Two women with 46,XX/45,X0, one woman with 46,XX/47,XX,+mar, and one woman with 46,XX[89%]/46,XX,tra(16)(q22)[7%]/46,XX,del(16)(q22)[4%].

Polymorphic variations

Heterochromatin polymorphic variants were observed in chromosome 9 (9qh+) in two women (0.32%), whereas the satellite polymorphic variant was most common in our patients with a frequency of 0.96%. This polymorphic variant touched chromosome 14 (14ps+) in one man, chromosome 21(21ps+) in three women and one man, and chromosome 22 (22ps+) in one man.

Discussion

The present study determines the frequency of chromosomal abnormalities in Moroccan couples with RSM and compares these frequencies with other studies, which had followed the same method and gave a global estimation of frequency of chromosomal abnormalities in these couples worldwide.

During the 20-year study period (1996–2016), the cytogenetic department of the Pasteur Institute in Morocco received 627 couples with RSM for cytogenetic analysis. Therefore, we identified that 69 couples (11.00%) had chromosomal abnormalities. This frequency is comparable to that reported in Iran (11.68%) [15], Italy (9.66%) [16], the Netherlands (9.46%) [16], Sultanate of Oman (8.68%) [17], Switzerland (7.29%) [16], Saudi Arabia (7.10%) [18, 19], Egypt (6.40%) [20], Mexico (5.83%) [16, 21], Belgium (5.34%) [22], Pakistan

(5.33%) [23], Argentina (5.28%) [24], Brazil (5.09%) [25], the Philippines (5.06%) [26], India (4.90%) [27–29], Japan (4.54%) [30], Turkey (4.21%) [16, 31], France (4.14%) [16], Tunisia (4.07%) [32], and the UK (3.52%) [33]. But it is significantly higher than that identified in China (2.98%, $P = 0.048$) [34] and in the USA (2.96%; $P = 0.048$) [35]. Table 2 regroups cytogenetic results of all these countries.

After regrouping the countries and the results obtained by regions, the highest frequency of chromosomal abnormalities in couples with RSM is that of the Middle East (6.84%; 281/4111 couples) varying between 4.21% in Turkey and 11.68% in Iran, followed by North Africa, Europe, Asia, and America. Indeed, in North Africa, the frequency of CA in couples with RSM is 6.28% (134/2152 couples) varying between 4.07% in Tunisia and 11.00% in Morocco (present study). In Europe, the frequency of CA is 5.15% (178/3495 couples) varying

between 3.52% in the UK and 9.66% in Italy. In Asia, the frequency of CA is 4.22% (236/5587 couples) varying between 2.98% in China and 5.33% in Pakistan. In addition, in America, the frequency of CA is 4.17% (162/3888 couples) varying between 2.69% in the USA and 5.83% in Mexico (Fig. 2).

In this study, the most common structural abnormalities were inversions. They were observed in 27 couples with 4.32%, making it the most frequent in North Africa and in the world. In the Sultanate of Oman, pericentric inversion (9)(p13q12) was identified in 6 cases; all of them had a history of RSM [17]. Other chromosomal inversions have been identified in different populations, such as inversion in chromosomes 8 and 4 which have been identified in Saudi Arabia [18], inversion in chromosomes 1, 5, 7, 12, 18, and Y in Turkey [31], and inversion in chromosomes 1, 5, 7, and 10

Table 2 Summary of frequency of chromosomal abnormalities identified in different studies worldwide of RSM

Country	No. of couples	Reciprocal translocations	Robertsonian translocations	Inversions	Other	Total
Europe	3459	101 (2.92%)	30 (0.87%)	25 (0.72%)	22 (0.64%)	178 (5.15%)
Belgium	1743	62 (3.56%)	9 (0.52%)	10 (0.57%)	12 (0.69%)	93 (5.34%)
The UK	795	18 (2.26%)	3 (0.38%)	2 (0.25%)	5 (0.63%)	28 (3.52%)
France	532	7 (1.32%)	9 (1.67%)	6 (1.13%)	0 (0.00%)	22 (4.14%)
The Netherlands	148	6 (4.05%)	3 (2.03%)	3 (2.03%)	2 (1.35%)	14 (9.46%)
Italy	145	4 (2.76%)	4 (2.76%)	4 (2.76%)	2 (1.38%)	14 (9.66%)
Switzerland	96	4 (4.17%)	2 (2.08%)	0 (0.00%)	1 (1.04%)	7 (7.29%)
Asia	5587	119 (2.13%)	37 (0.66%)	16 (0.29%)	64 (1.15%)	236 (4.22%)
India	2344	44 (1.88%)	11 (0.47%)	4 (0.17%)	56 (2.39%)	115 (4.90%)
China	1948	42 (2.16%)	11 (0.56%)	5 (0.26%)	0 (0.00%)	58 (2.98%)
Japan	639	19 (2.97%)	9 (1.41%)	1 (0.16%)	0 (0.00%)	29 (4.54%)
Pakistan	300	7 (2.33%)	0 (0.00%)	5 (1.67%)	4 (1.33%)	16 (5.33%)
The Philippines	356	7 (1.97%)	6 (1.69%)	1 (0.28%)	4 (1.12%)	18 (5.06%)
America	3888	89 (2.29%)	35 (0.90%)	11 (0.28%)	27 (0.70%)	162 (4.17%)
USA	1893	28 (1.48%)	12 (0.63%)	7 (0.37%)	4 (0.21%)	51(2.69%)
Mexico	1097	31 (2.82%)	12 (1.10%)	3 (0.27%)	18 (1.64%)	64 (5.83%)
Argentina	682	27 (3.96%)	9 (1.32%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	36(5.28%)
Brazil	216	3 (1.39%)	2 (0.93%)	1 (0.46%)	5 (2.31%)	11(5.09%)
Middle East	4111	135 (3.28%)	35 (0.85%)	52 (1.26%)	59 (1.44%)	281 (6.84%)
Turkey	1736	34 (1.95%)	16 (0.92%)	11 (0.63%)	12 (0.70)	73 (4.21%)
Saudi Arabia	1267	46 (3.63%)	9 (0.71%)	13 (1.02%)	22 (1.73%)	90 (7.10%)
Iran	728	37 (5.08%)	7 (0.96%)	21 (2.88%)	20 (2.75%)	85 (11.68%)
Sultanate of Oman	380	18 (4.74%)	3 (0.79%)	7 (1.84%)	5 (1.32%)	33 (8.68%)
North Africa	2152	53 (2.47%)	22 (1.02%)	43 (2.00%)	17 (0.79%)	134 (6.23%)
Tunisia	1400	29 (2.07%)	12 (0.86%)	16 (1.14%)	0 (0.00%)	57 (4.07%)
Egypt	125	7 (5.60%)	1 (0.80%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	8 (6.40%)
Our study	627	17 (2.72%)	9 (1.44%)	27 (4.32%)	16 (2.55%)	69 (11.00%)
World	19,197	479 (2.50%)	159 (0.83%)	147 (0.77%)	188 (0.98%)	991 (5.16%)

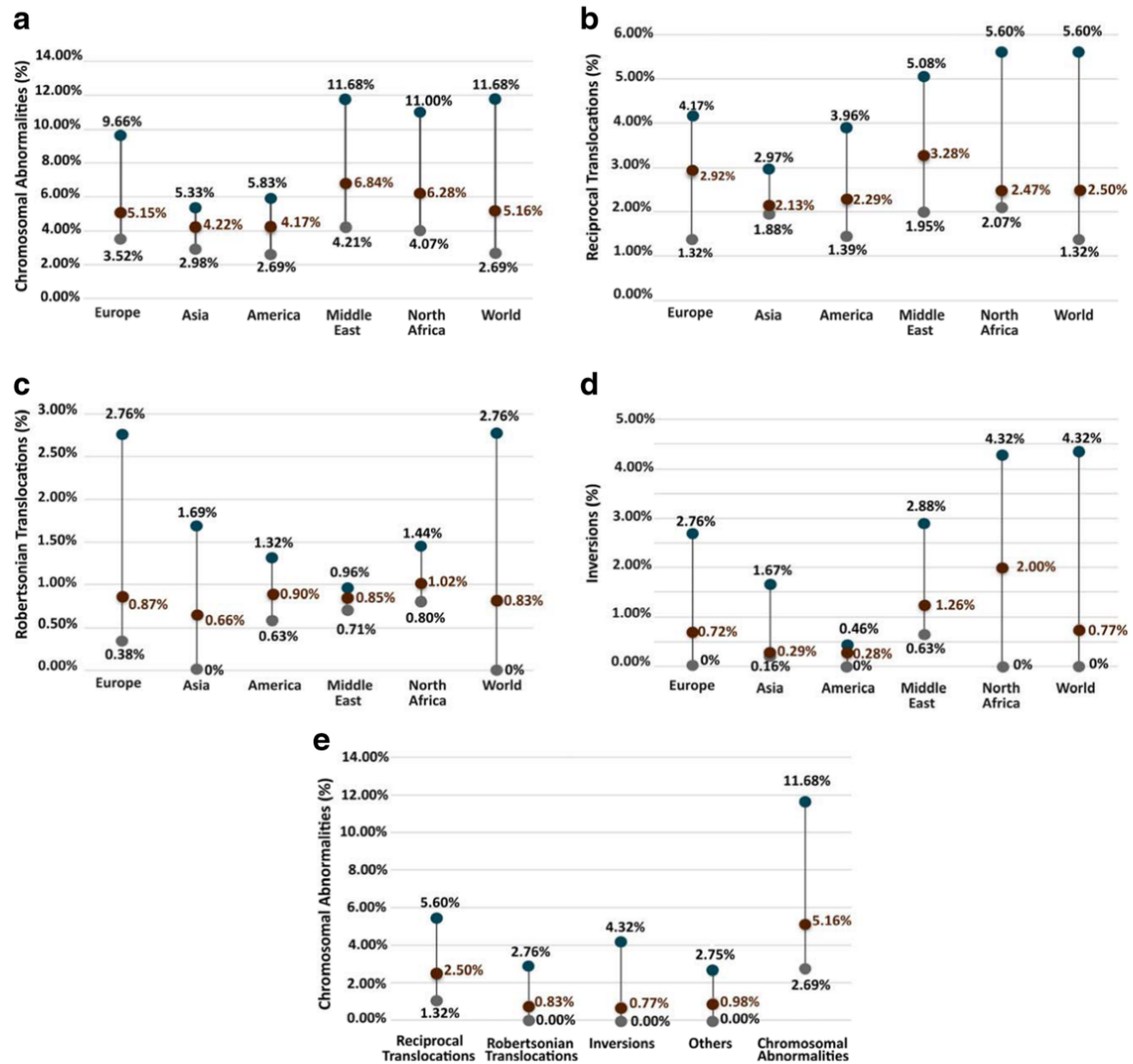


Fig. 2 Frequency of various chromosomal abnormalities observed in different studies by region. **a** Distribution of chromosomal abnormalities frequencies in couples with RSM by region. **b** Distribution of reciprocal translocation frequencies in couples with RSM by region. **c** Distribution of Robertsonian translocation

frequencies in couples with RSM by region. **d** Distribution of chromosome inversion frequencies in couples with RSM by region. **e** Distribution of various chromosomal abnormalities in the world. Blue, highest frequency; brown, mean frequency; gray, lowest frequency

in India [36]. The results of all these studies indicate that chromosomal inversions may have a role in the etiology of RSM, which must be confirmed by other studies.

Even if the inversions are the most frequent in our study (North Africa), they are the least frequent when compared to other studies. Indeed, in the Middle East, the frequency of inversions is 1.26% varying between 0.63% in Turkey and 2.88% in Iran. Furthermore, in Europe, the frequency of inversions is 0.72% varying between 0% in Switzerland and 2.76% in Italy. In America, the frequency of inversions is 0.28% varying between 0% in Argentina and 0.46% in Brazil. Furthermore, in Asia, the frequency of inversions is 0.29% varying between 0.16% in Japan and 1.67% in Pakistan (Fig. 2).

In the present work, reciprocal translocation was identified in all chromosomes except chromosomes 4, 12, 16, 20, 22, X, and Y. However, this does not exclude their involvement in RSM. In the Sultanate of Oman, Goud et al. identified a reciprocal translocation in chromosomes 4, 12, 20, and 22 and chromosome X [17]. Additionally, in India, Saxena observed a reciprocal translocation in chromosomes 4, 12, 16, 22, and 22 [36]. In Turkey, Tunç et al. found a reciprocal translocation in chromosomes 4 and 12 (Fig. 3) [31]. However, in the Middle East, the frequency of RT in couples with RSM is 3.28% varying between 1.95% in Turkey and 5.08% in Iran. In Europe, the frequency of RT is 2.92% varying between 1.32% in France and 4.17% in Switzerland. In North Africa, the frequency of RT is 2.47% varying between 2.07% in Tunisia and 5.60% in Egypt. In America, the frequency of

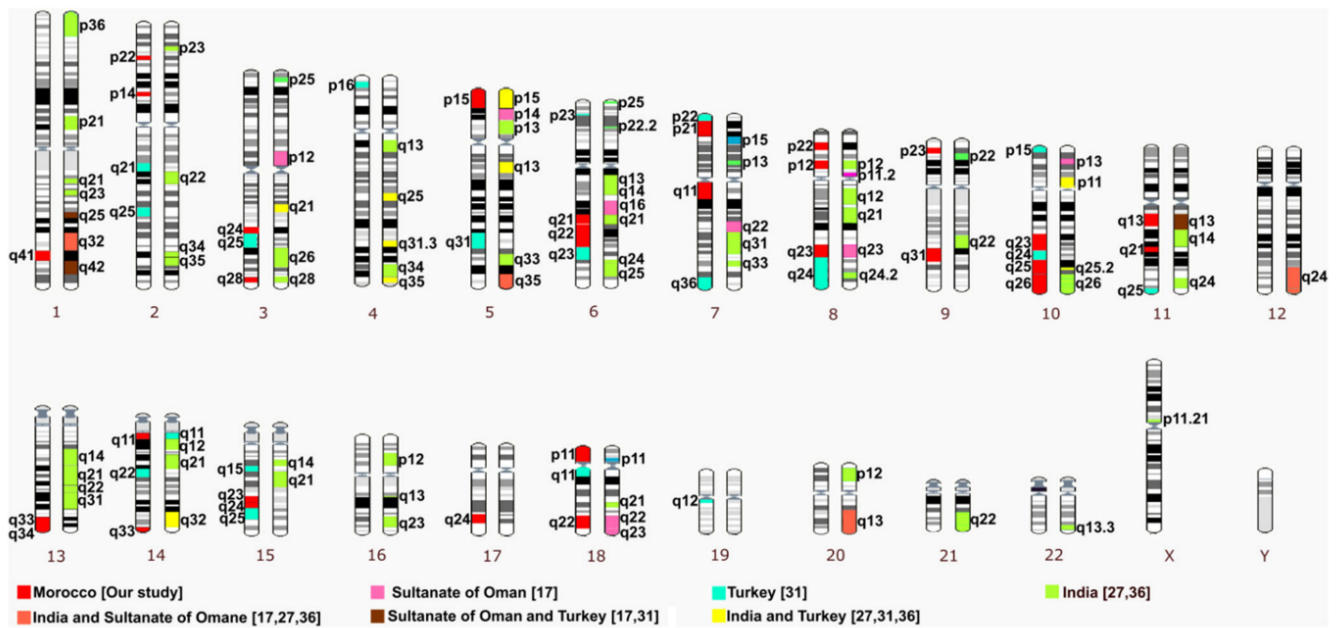


Fig. 3 Human chromosome ideograms showing regions of reciprocal translocation identified in different studies. The red indicates regions of reciprocal translocation identified in Morocco, the pink in the Sultanate of Oman [17], the aqua in Turkey [31], the green in India [27, 36], the

yellow in India and Turkey [27, 31, 36], the orange in India and the Sultanate of Oman [17, 27, 36], and finally the brown in the Sultanate of Oman and Turkey [17, 31]

RT is 2.29% varying between 1.39% in Brazil and 3.96% in Argentina. In Asia, the frequency of RT is 2.13% varying between 1.88% in India and 2.97% in Japan (Fig. 2).

In this study, Robertsonian translocations were observed in 5 couples with a frequency of 0.8%. These observations agreed with previous reports (0.78%) [17], (0.66%) [31], and (0.94%) [36].

In North Africa, the frequency of Robertsonian translocation in couples with RSM is 1.02% varying between 0.80% in Egypt and 1.44% in Morocco (the present study). In America, the frequency is 0.90% varying between 0.63% in the USA and 1.32% in Argentina. In Europe, the frequency is 0.87% varying between 0.38% in the UK and 2.76% in Italy. In the Middle East, the frequency is 0.85% varying between 0.71% in Saudi Arabia and 0.96% in Iran. In Asia, the frequency of Robertsonian translocation in couples with RSM is 0.66% varying between 0% in Pakistan and 1.69% in the Philippines (Fig. 2).

The global frequency of chromosomal abnormalities in couples with RSM is 5.16% (991/19197 couples). The reciprocal translocation was the most frequent with 2.50%, followed by Robertsonian translocations 0.83% and inversions 0.77%. The other types of chromosomal abnormalities were present with 0.99% in the world (Fig. 2).

Pericentric inversion of the chromosome 9, Inv(9)(p11q13), is considered as the most commonly observed structurally balanced rearrangement of chromosome involving the heterochromatic region. It is frequently found in normal individuals, and its frequency in the general population is expected to be

approximately 1–3% [37]. Most cytogeneticists believe that this variant is a chromosomal polymorphism of the normal human karyotype without any clinical significance. Contradictorily, many clinical investigators have suggested several associations of inv(9) with clinical diagnosis, particularly with idiopathic reproductive failure. Various reports on its association with infertility, recurrent miscarriages, hydatidiform moles, azoospermia, congenital anomalies, growth retardation, and rarely abnormal phenotype have been published [38]. Sasiadek et al. reported inv(9) in 2.3% of all couples presenting with infertility and recurrent abortions [39]. Šípek et al. published the largest study on inv(9) and found a higher frequency among females than in males, especially among those who suffer from infertility [40]. In the present study, we have identified that 4.14% of couples with RSM showed inversions of chromosome 9. This indicates that inversion of chromosome 9 may play an unknown significant role in RSM.

Intrachromosomal insertion in couples with RSM is very rare. Indeed, three couples with RSM were described until today. The first couple was reported in India by Rao L et al., who noticed an insertion in women with karyotype 46,XX,ins(12:6)(12;6)(q24.2;q23q25) [41]. The second was reported by Iyer P, who identified an insertion in men with karyotype 46,XY,ins(1;13)(q22;q31q33) [42], and the third was reported by Fuente-Cortés BED, who found an insertion in women with karyotype 46,XX,ins(15;8)(q26;p11p23) [16]. In our study, we identified a new insertion, 46,XX,ins(6)(p24q21q27), in one woman with RSM, and to the best of our knowledge, this is the fourth insertion reported in the literature.

Limitations of the present study include the lack of questionnaire data (e.g., history of diagnosis, obstetric history, and previous treatment received) from the couples who were included in this study and the lack of cytogenetic analysis of miscarriages.

Conclusion

Our data clearly illustrates that the frequency of chromosomal abnormalities in Moroccan couples is 11.00%, while in regrouping our results with other studies, the frequency changes to 5.16%. Cytogenetic analysis should be part of the investigation of any couple who has experienced at least three consecutive pregnancies of unknown origin. Genetic counseling is important in the management of couples with RSM because of the clear relationship between a chromosomal abnormality in a parent and subsequent miscarriages and a malformed child. Thus, the couples with RSM and normal karyotype should be evaluated with molecular techniques, such as chromosome microarray analysis (CMA) and next-generation sequencing (NGS), which have opened new possibilities for discovery of genetic changes that are undetectable by constitutional chromosome analysis.

Acknowledgments We acknowledge and greatly appreciate the excellent technical assistance of all the staff at the Genomics and Human Genetics laboratory, and we thank all patients for their cooperation.

Compliance with ethical standards

The present study was approved by the local committee on research ethics of the Pasteur Institute of Morocco.

Competing interests The authors declare that they have no competing interests.

References

- McNamee K, Dawood F, Farquharson R. Recurrent miscarriage and thrombophilia: an update. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2012;24:229–34.
- Duckitt K, Qureshi A. Recurrent miscarriage. *BMJ Clin Evid*. 2011;2011.
- Cohn DM, Goddijn M, Middeldorp S, Korevaar JC, Dawood F, Farquharson RG. Recurrent miscarriage and antiphospholipid antibodies: prognosis of subsequent pregnancy. *J Thromb Haemost*. 2010;8:2208–13.
- Jauniaux E, Farquharson RG, Christiansen OB, Exalto N. Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. *Hum Reprod*. 2006;21:2216–22.
- Christiansen OB, Nybo Andersen A-M, Bosch E, Daya S, Delves PJ, Hviid TV, et al. Evidence-based investigations and treatments of recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*. 2005;83:821–39.
- Coulam CB. Epidemiology of recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol*. 1991;26:23–7.
- Stirrat GM. Recurrent miscarriage. *Lancet*. 1990;336:673–5.
- Jaslow CR, Kutteh WH. Effect of prior birth and miscarriage frequency on the prevalence of acquired and congenital uterine anomalies in women with recurrent miscarriage: a cross-sectional study. *Fertil Steril*. 2013;99:1916–1922.e1.
- Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2013;99:63.
- Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary on ART terminology, 2009. *Hum Reprod*. 2009;24:2683–7.
- Green-top Guideline No.17. Recurrent miscarriage, investigation and treatment of couples (Green-top Guideline No. 17) [Internet]. Royal College of Obstetricians & Gynaecologists. 2011 [cited 2017 Nov 16]. Available from: <https://www.rcog.org.uk/en/guidelines-research-services/guidelines/gtg17/>
- Diejomaoh MFE. Recurrent spontaneous miscarriage is still a challenging diagnostic and therapeutic quagmire. *Med Princ Pract*. 2015;24:38–55.
- Mierla D, Malageanu M, Tulin R, Albu D. Prevalence of chromosomal abnormalities in infertile couples in Romania. *Balkan J Med Genet*. 2015;18:23–30.
- Morin SJ, Eccles J, Iturriaga A, Zimmerman RS. Translocations, inversions and other chromosome rearrangements. *Fertil Steril*. 2017;107:19–26.
- Ghazaey S, Keify F, Mirzaei F, Maleki M, Tootian S, Ahadian M, et al. Chromosomal analysis of couples with repeated spontaneous abortions in Northeastern Iran. *Int J Fertil Steril*. 2015;9:47–54.
- De la Fuente-Cortés BE, Cerda-Flores RM, Dávila-Rodríguez MI, García-Vielma C, Alvarado RMD la R, Cortés-Gutiérrez EI. Chromosomal abnormalities and polymorphic variants in couples with repeated miscarriage in Mexico. *Reprod BioMed Online*. 2009;18:543–8.
- Goud TM, Mohammed Al Harassi S, Khalfan Al Salmani K, Mohammed Al Busaidy S, Rajab A. Cytogenetic studies in couples with recurrent miscarriage in the Sultanate of Oman. *Reprod BioMed Online*. 2009;18:424–9.
- Al-Hussain M, Al-Nuaim L, Abu ZT, Zaki OK. Cytogenetic study in cases with recurrent abortion in Saudi Arabia. *Ann Saudi Med*. 2000;20:233–6.
- Awartani KA, Al Shabibi MS. Description of cytogenetic abnormalities and the pregnancy outcomes of couples with recurrent pregnancy loss in a tertiary-care center in Saudi Arabia. *Saudi Med J*. 2018;39:239–42.
- Gaboon NEA, Mohamed AR, Elsayed SM, Zaki OK, Elsayed MA. Structural chromosomal abnormalities in couples with recurrent abortion in Egypt. *Turk J Med Sci*. 2015;45:208–13.
- Meza-Espinoza JP, Anguiano LO, Rivera H. Chromosomal abnormalities in couples with reproductive disorders. *Gynecol Obstet Investig*. 2008;66:237–40.
- Fryns JP, Van Buggenhout G. Structural chromosome rearrangements in couples with recurrent fetal wastage. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1998;81:171–6.
- Azim M, Khan AH, Khilji ZL, Pal JA, Khurshid M. Chromosomal abnormalities as a cause of recurrent abortions: a hospital experience. *J Pak Med Assoc*. 2003;53:117–9.
- Gadow EC, Lippold S, Otano L, Serafin E, Scarpati R, Matayoshi T. Chromosome rearrangements among couples with pregnancy losses and other adverse reproductive outcomes. *Am J Med Genet*. 1991;41:279–81.

25. Kiss A, Rosa RFM, Dibi RP, Zen PRG, Pfeil JN, Graziadio C, et al. Anormalidades cromossômicas em casais com história de aborto recorrente. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2009;31:68–74.
26. Cutiongco-de la Paz E, Berboso AG, Salonga EAG, Padilla C. Chromosomal structural abnormalities among Filipino couples with recurrent pregnancy losses. *Acta Med Philipp.* 2011;45:58–62.
27. Dutta UR, Rajitha P, Pidugu VK, Dalal AB. Cytogenetic abnormalities in 1162 couples with recurrent miscarriages in southern region of India: report and review. *J Assist Reprod Genet.* 2011;28:145–9.
28. Dubey S, Chowdhury MR, Prahlad B, Kumar V, Mathur R, Hamilton S, et al. Cytogenetic causes for recurrent spontaneous abortions – an experience of 742 couples (1484 cases). 2005 [cited 2018 Aug 8]; Available from: <https://tspace.library.utoronto.ca/handle/1807/5942>
29. Sudhir N, Kaur T, Beri A, Kaur A. Cytogenetic analysis in couples with recurrent miscarriages: a retrospective study from Punjab, north India. *J Genet.* 2016;95:887–94.
30. Makino T, Tabuchi T, Nakada K, Iwasaki K, Tamura S, Iizuka R. Chromosomal analysis in Japanese couples with repeated spontaneous abortions. *Int J Fertil.* 1990;35:266–70.
31. Tunç E, Tanrıverdi N, Demirhan O, Süleymanova D, Çetinel N. Chromosomal analyses of 1510 couples who have experienced recurrent spontaneous abortions. *Reprod BioMed Online.* 2016;32:414–9.
32. Elghezal H, Hidar S, Mougou S, Khairi H, Saâd A. Prevalence of chromosomal abnormalities in couples with recurrent miscarriage. *Fertil Steril.* 2007;88:721–3.
33. Flynn H, Yan J, Saravelos SH, Li T-C. Comparison of reproductive outcome, including the pattern of loss, between couples with chromosomal abnormalities and those with unexplained repeated miscarriages. *J Obstet Gynaecol Res.* 2014;40:109–16.
34. Fan H-T, Zhang M, Zhan P, Yang X, Tian W-J, Li R-W. Structural chromosomal abnormalities in couples in cases of recurrent spontaneous abortions in Jilin Province, China. *Genet Mol Res.* 2016;15.
35. Stephenson MD, Sierra S. Reproductive outcomes in recurrent pregnancy loss associated with a parental carrier of a structural chromosome rearrangement. *Hum Reprod.* 2006;21:1076–82.
36. Saxena SG, Desai K, Shewale L, Ranjan P, Saranath D. Chromosomal aberrations in 2000 couples of Indian ethnicity with reproductive failure. *Reprod BioMed Online.* 2012;25:209–18.
37. Amiel A, Sardos-Albertini F, Fejgin MD, Sharony R, Diukman R, Bartoov B. Interchromosomal effect leading to an increase in aneuploidy in sperm nuclei in a man heterozygous for pericentric inversion (inv 9) and C-heterochromatin. *J Hum Genet.* 2001;46:245–50.
38. Yamada K. Population studies of INV(9) chromosomes in 4,300 Japanese: incidence, sex difference and clinical significance. *Jpn J Hum Genet.* 1992;37:293–301.
39. Sasiadek M, Haus O, Lukasik-Majchrowska M, Slezak R, Paprocka-Borowicz M, Busza H, et al. Cytogenetic analysis in couples with spontaneous abortions. *Ginekol Pol.* 1997;68:248–52.
40. Šípek A, Panczak A, Mihalová R, Hřčková L, Suttrová E, Sobotka V, et al. Pericentric inversion of human chromosome 9 epidemiology study in Czech males and females. *Folia Biol (Praha).* 2015;61:140–6.
41. Rao L, Murthy K, Babu A, Venkata P, Deenadayal M, Singh L. Chromosome inversions and a novel chromosome insertion associated with recurrent miscarriages in South India. *Arch Gynecol Obstet.* 2005;272:273–7.
42. Iyer P, Wani L, Joshi S, Lakshmi J, Dalvi R, Chavan D, et al. Cytogenetic investigations in couples with repeated miscarriages and malformed children: report of a novel insertion. *Reprod BioMed Online.* 2007;14:314–21.

3. Résultats et Discussion

3.1. Anomalies chromosomiques chez des couples marocains ayant subi des fausses couches spontanées à répétition

La présente étude consiste à déterminer la fréquence des anomalies chromosomiques chez les couples marocains ayant subi des fausses couches spontanées à répétition et à comparer nos résultats avec les résultats d'autres études qu'ayant suivi la même méthode.

Le service de cytogénétique-IPM a accueillie, durant une période de 21 ans (entre 1996 et 2016), un total de 627 couples qui ont subi des fausses couches spontanées à répétition. L'analyse de caryotype de ces couples a révélé que 69 couples (11%), 22 hommes (3,50%) et 47 femmes (7.50%), présentent une anomalie chromosomique.

Les anomalies chromosomiques structurelles ont été identifiées chez 56 couples (8,93%) (20 hommes et 36 femmes) ce qui les rends les plus fréquentes. En effet, nous avons identifié 27 couples (4,30%) avec une inversion (9 hommes et 18 femmes), 17 couples (2,71%) avec une translocation réciproque (7 hommes et 10 femmes), 9 couples (1,43%) avec une translocation robertsonienne (3 hommes et 6 femmes), un couple (0,15%) avec une délétion (1 homme), un couple (0,15%) avec une insertion (1 femme) et un couple (0,15%) avec un isochromosome (1 homme).

Les translocations réciproques touchent les chromosomes 1, 8 et 10 chez 3 patients chacun. Elles touchent les chromosomes 2, 3, 6, 7, 9, 11, 13, 14, 15, et 21 chez deux couples chacun, et les chromosomes 5, 17 et 19 chez un couple chacun. Aucun couple n'a présenté une translocation réciproque dans les chromosomes 4, 12, 16, 20, 22, X et Y. Les points de cassures de ces translocations sont situés dans le bras court (p) pour les chromosomes 2 et 5, dans le bras long (q) pour les chromosomes 3, 10, 11, 15, 17 et 19 et dans les deux bras (p et q) pour les chromosomes 1, 6, 7, 8, 9, 13, 14, 18 et 21.

En ce qui concerne les translocations robertsoniennes, les chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22 sont les seuls chromosomes touchés par ce genre de translocation. Aussi bien, pour les inversions chromosomiques, seuls les chromosomes 9 et 7 ont été touchés.

Une nouvelle insertion, jamais décrite dans la littérature, a été identifié chez un couple avec une fréquence de 0,15%. Il s'agit d'une insertion du fragment q21q27 du chromosome 6 à la p24 du même chromosome [ins (6) (p24q21q27)].

Une délétion au niveau du bras long du chromosome Y (q12) a été identifiée chez un homme ainsi qu'un isochromosome 9 (p10) et un isochromosome 9 (q10) chez une femme.

Une seule anomalie chromosomique de nombre 47,XYX a été identifiée chez un homme, alors que les aneuploïdie en mosaïque ont été observées chez 4 femmes, deux femmes avec le caryotype 46,XX/45,X0, une femme avec le caryotype 46,XX/47,XX,+mar et une femme avec le caryotype 46,XX[89%]/46,XX,fra(16)(q22)[7%]/ 46,XX,del(16)(q22)[4%]

Les variants polymorphes de l'hétérochromatine ont été observés sur le chromosome 9 (9qh+), alors que les variants polymorphes satellites ont été observés sur le chromosome 14ps+, 21ps+ et 22ps+.

3.2. Fréquence mondiale des anomalies chromosomiques chez les couples ayant subi des fausses couches spontanées à répétition

L'étude des anomalies chromosomiques (AC) chez les couples présentant des fausses couches spontanées à répétition (FCSR) a fait l'objet de plusieurs études rétrospectives dans presque le monde entier. Dans cette partie, nous voulons comparer notre fréquence avec les fréquences identifiées chez différentes populations et déterminer, à partir des résultats de tous les pays, la fréquence mondiale. Ainsi, à partir de cette étude, nous avons pu identifier la fréquence des AC chez les couples Marocains présentant les FCSR qui est de l'ordre de 11%.

Après regroupement des résultats cytogénétique des couples de chaque continent, nous avons trouvés que la fréquence mondiale des anomalies chromosomiques chez les couples présentant des FCSR est 5,16% (991/19197 couples). L'anomalie chromosomique la plus fréquente est la translocation réciproque, elle est présente chez 2,50% des couples, suivie par la translocation robertsonienne et les inversions avec une fréquence de 0,83% et 0,77% respectivement. Les autres types d'anomalies chromosomiques touchent 0,99% des couples présentant des FCSR dans le monde.

Le Moyen-Orient présente la fréquence la plus élevée d'anomalies chromosomiques chez les couples présentant des FCSR (6,84% ; 281/4111 couples), suivies par l'Afrique du Nord (6,28% ; 134/2152 couples), l'Europe (5,15% ; 178/3495 couples), l'Asie (4,22% ; 236/5587 couples) et l'Amérique (4,17% ; 162/3888 couples).

Dans notre pays, nous avons trouvé que les inversions chromosomiques sont le type d'anomalie chromosomique le plus fréquent chez ces couples avec une fréquence de 4,32%. En comparant avec les autres pays, cette fréquence n'est pas uniquement la plus élevée en Afrique mais la plus élevée au monde entier. En sultanat d'Oman, une inversion péricentrique (9)(p13q12) a été identifiée chez 6 cas, tous ayant des antécédents des FCSR [Goud et al., 2009]. D'autres inversions chromosomiques ont été identifiées dans différentes populations. Ces inversions ne touchent pas uniquement les chromosomes 7 et 9 comme ce que nous avons trouvé dans notre étude mais elles

touchent aussi les chromosomes 8 et 4 d'après l'étude de Al-Hussain et al. en Arabie saoudite, les chromosomes 1,5,7,12,18 et Y d'après l'étude de Tunç et al. en Turquie et les chromosomes 1,5,7 et 10 d'après l'étude de Saxena et al. en Inde [Al-Hussain et al., 2000; Tunç et al., 2016; Saxena et al., 2012]. En revanche, à notre connaissance, aucune inversion n'a été observée dans les chromosomes 2, 3, 6, 9, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22 et X.

En ce qui concerne la fréquence des inversions chromosomiques chez les couples FCSR, nous avons trouvé qu'elle est de l'ordre de 1,26% en Moyen orient, 0,72% en Europe, 0,28% en Amérique et 0,29% en Asie.

Dans notre étude, nous avons observé que les translocations réciproques touchent tous les chromosomes à l'exception des chromosomes 4, 12, 16, 20, 22, X et Y. Néanmoins, cela n'exclut pas leur implication dans les FCSR. En fait, Goud et al. ont bien identifié des translocations réciproques au niveau des chromosomes 4, 12, 20, 22 et X chez des couples Omanais [Goud et al., 2009]. De plus, Saxena et al. ont observé des translocations réciproques au niveau des chromosomes 4, 12, 16, 20 et 22 chez des couples indiens [Saxena et al., 2012]. En outre, Tunç et al. ont déterminé des translocations réciproques touchant les deux chromosomes 4 et 12 [Tunç et al., 2016]. Les résultats de ces études indiquent que tous les chromosomes sont sujet d'une translocation réciproque à l'exception du chromosome Y.

Les translocations réciproques chez les couples présentant des FCSR est de l'ordre de 3,28% en Moyen-Orient, 2,92% en Europe, 2,47% en Afrique du Nord 2,29% en Amérique, et à la fin, on trouve l'Asie avec une fréquence de 2,13%.

Dans cette étude, les translocations robertsoniennes ont été observées chez 5 couples avec une fréquence de 0,8%, ce qui est comparable avec Sultanat d'Oman (0,78%), Turquie (0,66%) et Inde (0,94%) [Goud et al., 2009; Tunç et al., 2016; Saxena et al., 2012]. La fréquence de la translocation robertsonienne chez les couples présentant des FCSR est 1,02% en Afrique du Nord, 0,90% en Amérique, 0,87% en Europe, 0,85% en Moyen-Orient et 0,66% en Asie.

L'inversion péricentrique du chromosome 9 ; Inv(9)(p11q13) ; est l'anomalie chromosomique la plus fréquente chez des individus normaux. Elle touche environ 1 à 3% de la population générale [Amiel et al., 2001]. La plupart des cytogénéticiens considèrent cette anomalie chromosomique comme un polymorphisme chromosomique qui n'a aucune signification clinique. En revanche, plusieurs chercheurs ont confirmé l'association de cette anomalie chromosomique avec l'infertilité, les fausses couches spontanées à répétition et le retard de croissance [Yamada et al., 2003]. En effet, Sasiadek et al. ont rapportés une inversion dans le chromosome 9 chez environ 2,3% de tous les couples présentant une infertilité et des FCSR [Sasiadek et al., 1997]. Aussi bien,

Šípek et al. ont publié la plus grande étude sur les inversions du chromosome 9 et ils ont constaté qu'elles sont plus fréquentes chez les femmes qui souffrent d'une infertilité [Šípek et al., 2015]. Dans cette étude, nous avons identifié que 4,14% des couples présentant des FCSR présentaient des inversions du chromosome 9. Ceci indique que les inversions du chromosome 9 pourrait jouer un rôle dans les FCSR.

Les insertions intrachromosomiques sont très rares chez les couples qui ont subi des FCSR. En effet, à ce jour, cette anomalie a été identifiée chez trois couples présentant des FCSR. Le premier couple a été rapporté en Inde par Rao L et al. Le deuxième a été rapporté par Iyer P et le troisième a été rapporté par Fuente-Cortés BED. Les chromosomes touchés sont les chromosome 1, 6, 8, 12 et 15. Dans notre étude, nous avons identifié une nouvelle insertion au niveau du chromosome 6 [46, XX, ins (6) (p24q21q27)] chez une femme qui a subi plusieurs fausses couches spontanées à répétition qui, selon notre connaissance, s'agit de la quatrième insertion rapportée dans la littérature [Rao et al., 2005; Iyer et al., 2007; Fuente-Cortés et al., 2009].

4. Conclusion

Dans cette étude, nous avons déterminé que la fréquence des anomalies chromosomiques chez les couples Marocains présentant des FCSR est de 11%. En regroupant les résultats de tous les pays qui ont suivi la même méthode, nous avons identifié que la fréquence mondiale est de l'ordre de 5,16%, ce qui fait que l'analyse cytogénétique doit être faite devant des FCSR pour donner un conseil génétique en raison de la relation entre une anomalie chromosomique chez un parent et la naissance d'un enfant malformé. Pour les couples qui ont un caryotype normal, d'autres techniques peuvent déterminer la cause génétique de leurs FCSR comme les puces à ADN et le séquençage de nouvelle génération.

Chapitre 2 : Profil cytogénétique des patients présentant une ambiguïté génitale, une aménorrhée et un phénotype de Turner

1. Introduction

L'ambiguïté génitale (AG), le syndrome de Turner (ST) et l'aménorrhée sont des troubles de développement qui sont connus pour être associés à des anomalies au niveau des chromosomes sexuels. En effet, l'AG est l'une des manifestations cliniques les plus courantes des anomalies de développement sexuel (DSD). Elle peut être détectée à la naissance par le médecin ou les parents et son incidence est estimée entre 1: 2000 et 1: 4500 [Hughes et al., 2007]. Alors que les autres manifestations comme les troubles de la puberté sont généralement détectées à l'adolescence soit par le patient lui-même, soit par ses parents.

Par définition, le terme DSD englobe tous les patients ayant une discordance entre le sexe chromosomique, le sexe gonadique et le sexe phénotypique [Hughes et al., 2006]. Le spectre d'expression clinique des DSD est très variable et la gravité de la maladie va des anomalies génitales qui n'affectent pas le phénotype sexuel du patient, tels que l'hypospadias, à des anomalies génitales qui remettent en question le phénotype sexuel du patient. En 2006, le consensus de Chicago a établi une nouvelle terminologie, qui est actuellement appliquée par la majorité des médecins et des scientifiques dans le monde entier, pour identifier les patients ayant un DSD, en se basant sur le résultat du caryotype [Hughes et al., 2006].

Le syndrome de Turner est diagnostiqué lorsqu'un chromosome sexuel est complètement supprimé ou structurellement modifié. Il est très variable et affecte environ 1: 2000 nouveau-nés [Gravholt, 2005; Jacobs, 1992; Stochholm et al., 2006]. Les patients atteints de ST peuvent développer une grande variété de symptômes, touchant de nombreux organes. Les signes cliniques incluent une petite taille, une diminution de la vitesse de croissance, une dysgénésie gonadique, une insuffisance ovarienne primaire, une infertilité, une hypothyroïdie, une anomalie cardiovasculaire et rénale, une déficience auditive et une hypertension [Gravholt, 2005]. Ces signes cliniques ne se trouvent pas toutes chez la même personne, et dans environ 98% des cas une petite taille est la seule manifestation du syndrome dans l'enfance. À l'adolescence, 90% des cas présentent une aménorrhée primaire [Oktay et al., 2016].

L'aménorrhée peut être primaire ou secondaire, elle touche environ 1 à 3% des femmes en âge de procréer [Geckinli et al., 2014]. L'aménorrhée primaire (AP) est définie comme l'absence de menstruation chez les filles de 16 ans présentant un développement normal de caractères sexuels secondaires (développement de la poitrine, de la pilosité au pubis et aux aisselles et répartition des tissus adipeux aux hanches, aux fesses et aux cuisses) ou l'absence de menstruation chez les filles

de 14 ans qui n'ont pas développés des caractères sexuels secondaires [Geckinli et al., 2014]. C'est un symptôme de diverses causes potentielles, telles que les anomalies du développement génitale ou le retard pubertaire. Des études antérieures ont montré que les étiologies les plus courantes sont la dysgénésie gonadique, l'agénésie müllérienne et l'hypogonadisme hypothalamo-hypophysaire [Geckinli et al., 2014].


L'objectif de cette étude est de déterminer la nature et la fréquence des anomalies chromosomiques chez des patients marocains présentant une ambiguïté génitale, une aménorrhée et un phénotype de Turner, afin de comparer nos résultats avec ceux d'autres pays qui ont suivi la même méthode.

2. Article 2

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'un article scientifique intitulé : Cytogenetic profile of patients with clinical spectrum of ambiguous genitalia, amenorrhea, and Turner phenotype: A 21-year single-center experience.

L'article a été publié dans le journal : American Journal of Medical Genetics Part A / Wiley Online Library.

Cytogenetic profile of patients with clinical spectrum of ambiguous genitalia, amenorrhea, and Turner phenotype: A 21-year single-center experience

Zouhair Elkarhat^{1,2}  | Boutaina Belkady¹ | Hicham Charoute¹ | Latifa Zarouf³ | Lunda Razoki³ | Jamila Aboulfaraj³ | Sanaa Nassereddine³ | Chadli Elbakay³ | Boubker Nasser² | Abdelhamid Barakat¹ | Hassan Rouba¹

¹Laboratory of Genomics and Human Genetics, Institut Pasteur du Maroc, Casablanca, Morocco

²Laboratory of Neuroscience and Biochemistry, Faculty of Science and Technology, University Hassan 1er, Settat, Morocco

³Laboratory of Cytogenetics, Institut Pasteur du Maroc, Casablanca, Morocco

Correspondence

Hassan Rouba, Laboratory of Genomics and Human Genetics, Institut Pasteur du Maroc, 1 Place Louis Pasteur, 20360 Casablanca, Morocco.

Email: hassan.rouba@pasteur.ma

Funding information

Pasteur Institute of Morocco

Abstract

The aim of the present study was to determine the frequency and nature of chromosomal abnormalities involved in patients with the clinical spectrum of ambiguous genitalia (AG), amenorrhea, and Turner phenotype, in order to compare them with those reported elsewhere. The study was conducted in the Cytogenetic Department of Pasteur Institute of Morocco, and it reports on the patients who were recruited between 1996 and 2016. Cytogenetic analysis was performed according to the standard method. Among 1,415 patients, chromosomal abnormalities were identified in 7.13% (48/673) of patients with AG, 17.39% (28/161) of patients with primary amenorrhea (PA), 4% (1/25) of patients with secondary amenorrhea, and 23.20% (129/556) of patients with Turner phenotype. However, Turner syndrome was diagnosed in 0.89% (6/673) of patients with AG, 10.56% (17/161) of patients with PA, and 19.78% (110/556) of patients with Turner phenotype. In addition, Klinefelter syndrome and mixed gonadal dysgenesis were confirmed in 2.97% and 1.93% of patients, respectively, with AG, while, chimerism, trisomy 8, and trisomy 13 were confirmed only in 0.15% each. Trisomy 21 was confirmed in patients with AG and Turner phenotype (0.15% and 0.36%, respectively). Moreover, 5.60% (9/161) of patients with PA have been diagnosed as having sex reversal. Thus, the frequency of chromosomal abnormalities observed in Moroccan patients with PA is comparable to that reported in Tunisia, Turkey, Iran, and Hong Kong. However, the frequency is significantly less than that identified in India, Malaysia, Italy, and Romania.

KEYWORDS

ambiguous genitalia, amenorrhea, chromosomal abnormalities, Morocco, Turner syndrome

1 | INTRODUCTION

Ambiguous genitalia (AG), Turner syndrome (TS), and amenorrhea are known to be associated with sex chromosome disorders and may also be associated with autosomal abnormalities. Indeed, AG is one of the

common clinical manifestations of disorders of sexual development (DSDs), and can be detected at birth by both physicians and parents, whereas other manifestations of DSD, such as pubertal disorders, are usually detected later in childhood or in the adolescent period by parents. However, the term DSD encompasses all the medical conditions

featuring an atypical chromosomal, gonadal, or phenotypical sex (Hughes, Houk, Ahmed, Lee, & Group, 2006). DSDs show different occurrence, and their severity ranges from genital anomalies that do not undermine sexual definition or functionality, such as hypospadias, to conditions that would lead to sexual ambiguity or incompatibility between chromosomal and internal or external sex anatomies.

In 2006, the consensus statement on the management of DSD came up with the latest classification of DSD based on studies and research on the sex chromosomal and gonadal development or phenotypic differentiation in which the alteration took place (Hughes et al., 2006). The incidence of patients presenting with AG is estimated to be in the range of 1:2000–1:4500 (Hughes, Nihoul-Fékété, Thomas, & Cohen-Kettenis, 2007). The cytogenetic analysis for this patient may reveal a normal male/female karyotype or sex chromosome abnormalities including TS, Klinefelter syndrome, mixed gonadal dysgenesis (MGD), and chimerism.

TS occurs when one sex chromosome is completely deleted or structurally altered. It is highly variable and affects about 1:2000 female newborns (Gravholt, 2005a, 2005b; Jacobs, 1992; Stochholm, Juul, Juel, Naeraa, & Gravholt, 2006). The patients with TS can potentially develop a wide variety of symptoms, affecting many different organ systems. Clinical features include short stature, reduction of growth velocity, gonadal dysgenesis, primary ovarian insufficiency, infertility, anomalies of cardiovascular and renal/collecting system, and higher frequency of autoimmune thyroid disorders, hearing impairment and hypertension, among other associated diseases (Gravholt, 2005a, 2005b). In addition, it should be noted that approximately 70–80% of women with TS have no spontaneous pubertal development and 90% experience primary amenorrhea (PA) (Oktay et al., 2016). About 1–3% of women of the reproductive age are affected by amenorrhea (Geckinli et al., 2014). Amenorrhea can either be primary or secondary. PA is defined as the absence of menstruation in 16-year-old girls with normal development of secondary sexual characteristics, or absence of menstruation in 14-year-old girls without the development of secondary sexual characteristics (Geckinli et al., 2014). It is a symptom of various potential causes, such as developmental abnormalities of the genital organs and delayed pubertal development (Schachter & Shoham, 1994). Previous studies show that the most common etiologies were gonadal dysgenesis, Müllerian agenesis, and hypothalamic/pituitary hypogonadism (Geckinli et al., 2014).

The aims of this study are to present the nature and frequency of chromosomal abnormalities identified in all patients with the clinical presentations of AG, amenorrhea, and Turner phenotype during our 21-year experience and to compare our results with other studies following the same method.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Patients

In this retrospective study, we reviewed the cytogenetic analysis database of all patients with AG, amenorrhea, and Turner phenotype who

were referred to the Cytogenetic Department, Pasteur Institute of Morocco, from different hospitals in Morocco between 1996 and 2016. All patients suspected to have syndromic or nonsyndromic intellectual disabilities, patients with multiple malformation syndromes, couples with recurrent spontaneous miscarriage, and patients without clinical information were excluded. Clinical information of all patients was collected and analyzed. This study was approved by the local committee on research ethics of the Pasteur Institute of Morocco.

2.2 | Karyotype analysis

The karyotype analysis was performed according to the standard method on peripheral using Giemsa staining. At least 20 metaphases were counted for each sample. The chromosomes were classified into several groups and numbered according to International System for Human Cytogenetic Nomenclature.

2.3 | Statistical methods

The comparison of the frequency of chromosomal abnormalities was performed using the chi-square test, if expected values are >5. Otherwise, we used Fisher's exact test. The values of $p < .05$ were considered as statistically significant. All statistical analysis was performed using the R programming language.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

To our knowledge, this is the first retrospective study conducted in Morocco, which includes all patients with AG, amenorrhea, and Turner phenotype who were referred to the Cytogenetic Department of Pasteur Institute of Morocco from different hospitals during these last 21 years (1996–2016). Thus, we have identified 673 patients with AG, 186 patients suffered from amenorrhea (161 patients with PA and 25 patients with secondary amenorrhea), and 556 patients with Turner phenotype (Figure 1).

3.1 | Patients presenting with AG

In the 673 patients with AG, 527 patients (78.31%) had a normal male karyotype 46,XY and 98 patients (14.56%) had a normal female karyotype 46,XX, while chromosomal abnormalities were found in 48 patients (7.13%). The most common chromosomal abnormalities in patients with AG are the gonosomal abnormalities, which were found in 40 patients (5.94%), while the autosomal abnormalities were observed in 8 patients (1.19%) (Table 1).

The karyotype analysis confirmed a diagnosis for 48 patients with AG. We identified 20 patients (2.97%) with Klinefelter syndrome (XXY, 18/20) and its variants (XXYY, 1/20) (X/X,dic(Y)/XXY, 1/20); 13 patients (1.93%) with MGD (X/XY, 9/13) (X/X,dic(Y), 3/13) (X/X,+mar1,+mar2, 1/13); 6 patients with TS (45X, 4/6) and its variants (X,del(Y)(q11), 1/6) (X,i(Y)(q10), 1/6); and 1 patient with XX/XY chimerism.

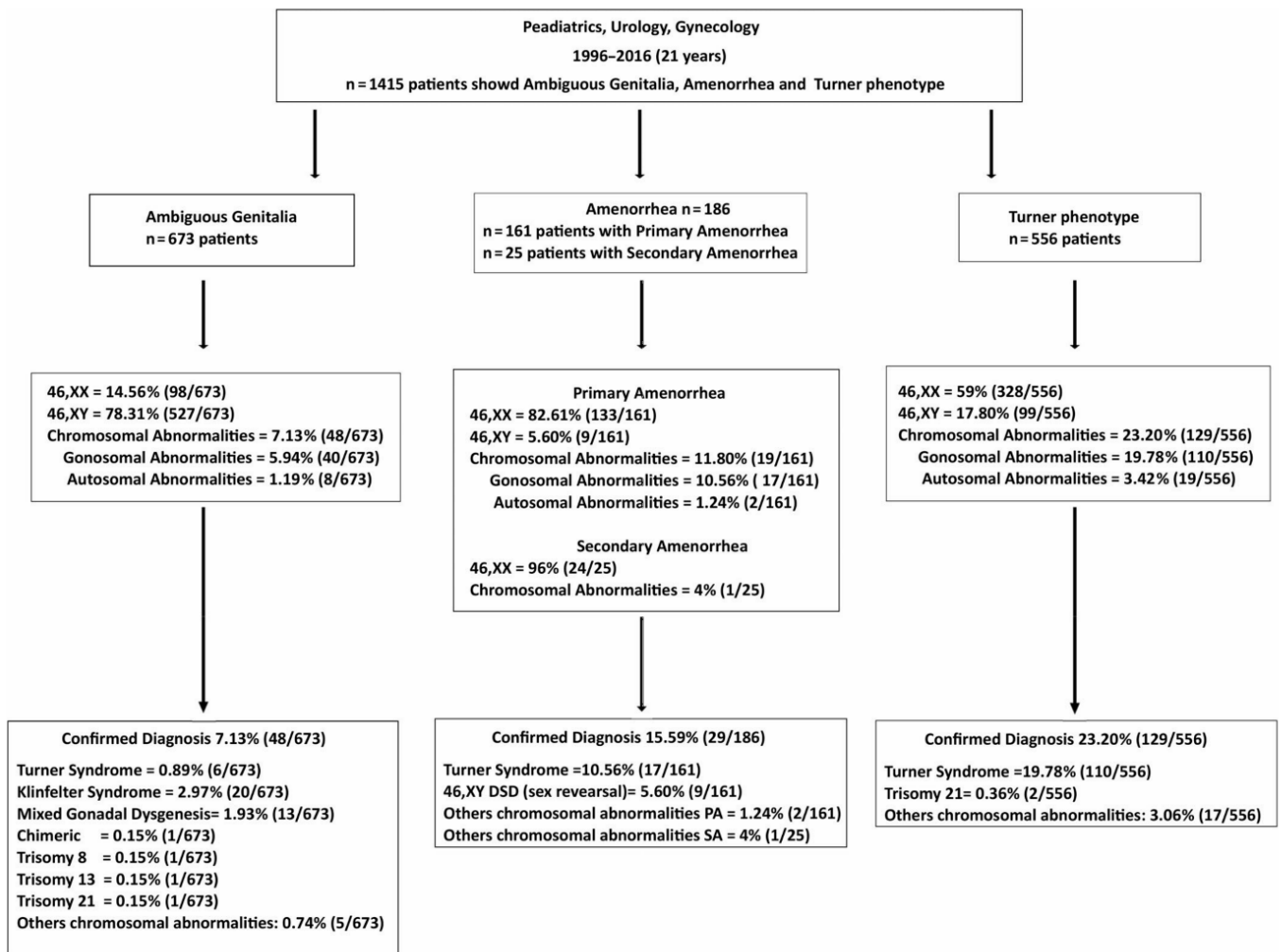


FIGURE 1 Flow chart of retrospective study design and cytogenetic analysis results

Concerning autosomal abnormalities, numerical aneuploidy was observed in three patients (trisomy 8, trisomy 13, and trisomy 21). Structural chromosome abnormalities were found in five patients: two patients had Robertsonian translocations (rob(13;13) and rob(14;15)) (also two patients had inversion in chromosome 9 and the last patient had a polymorphic variant (46,XY,9qh+) [Table 1]).

Comparing our results with other studies, the frequency of chromosomal abnormalities identified in this study (7.13%) is in accordance ($p > .05$) with the frequencies reported in Saudi Arabia (4.4%) (Husain & Zaki, 1999) and in Sultanate of Oman (10.07%) (Al-Alawi, Goud, Al-Harasi, & Rajab, 2016), and is less frequent than the frequency reported in Turkey (13.6%) (Balkan et al., 2010) (Figure 2).

3.2 | Patients with amenorrhea

In this study, we found that most patients with PA have a normal female karyotype 46,XX (82.60%) (Table 2), which is in accordance ($p > .05$) with that reported in Tunisia (85.88%) (Lakhal et al., 2010), Turkey (79.82%) (Balkan et al., 2010; Geckinli et al., 2014), Iran (80%) (Ayatollahi, Safaei, & Vasei, 2010), and Hong Kong (75.5%) (Wong &

Lam, 2005). But, it is significantly high ($p < .05$) than that identified in India (74.18%) (Kalavathi et al., 2009), Malaysia (69.23%) (Ten, Chin, Noor, & Hassan, 1990), Italy (53.10%) (Anglani, Baccichetti, Artifoni, Lenzi, & Tenconi, 1984), and Romania (49.34%) (Butnariu et al., 2011) (Table 3).

The male karyotype or sex reversal was identified only in nine patients (5.60%) with PA, whereas none of the patients with secondary amenorrhea had this problem. However, there is no significant difference ($p > .05$) between what was found and what has been reported in Romania (2.64%) (Butnariu et al., 2011), Turkey (5.04%) (Balkan et al., 2010; Geckinli et al., 2014), Italy (4.14%) (Anglani et al., 1984), Iran (5.5%) (Ayatollahi et al., 2010), India (6.1%) (Kalavathi et al., 2009), and Hong Kong (8.4%) (Wong & Lam, 2005). Interestingly, our frequency is significantly lower ($p < .05$) than those reported in Malaysia (14.52%) (Ten et al., 1990) and is higher than those reported in Tunisia (0%) (Lakhal et al., 2010).

In 161 patients with PA, chromosomal abnormalities, including male karyotype, were identified in 28 patients (17.39%). This is comparable ($p > .05$) to that reported in Tunisia (14.12%) (Lakhal et al., 2010), Turkey (20.87%) (Balkan et al., 2010; Geckinli et al., 2014), Iran

TABLE 1 The cytogenetic analysis results of patients with clinical spectrum of AG

Cytogenetic grade	Karyotype	No. of cases	Frequency of all cases (%)
Female karyotype	46,XX	98	14.56
Male karyotype	46,XY	527	78.31
Gonosomal abnormalities		40	5.94
Turner syndrome		6	0.89
Pure Turner	45,X	4	
Turner with structural chromosome Y rearrangements	46,X,del(Y)(q11)	1	
	46,X,i(Y)(q10)	1	
Klinefelter syndrome		20	2.97
	47,XXY	18	
	48,XXYY,22 ps+	1	
	45,X/46,X,idi(Y)/47,XXY	1	
Chimeric	46,XX/46,XY	1	0.15
Mixed gonadal dysgenesis		13	1.93
	45,X/46,XY	9	
	45,X/46,X,dic(Y)(p11)	1	
	45,X/46,X,dic(Y)(q12)	1	
	45,X/46,X,dic(Y)(p11.3)	1	
	45,X/47,X,+mar1,+mar2	1	
Autosomal abnormalities		8	1.19
Robertsonian translocations		2	0.30
	45,XY,rob(13;13)(q10;q10)	1	
	45,XY,rob(14;15)(q10;q10)	1	
Mosaic trisomy 8		1	0.15
	46,XY/47,XY,+8	1	
Trisomy 13		1	0.15
	47,XY,+13	1	
Trisomy 21		1	0.15
	47,XY,+21	1	
Polymorphic variants		3	0.45
	46,XY,9qh+	1	
	46,XY,inv(9)(p12q13)	1	
	46,XY,inv(9)(p11q13)	1	

The bold values are the results of the groups and the others values are the results of the subgroups.

(20%) (Ayatollahi et al., 2010), and Hong Kong (24.47%) (Wong & Lam, 2005), but is still significantly lower ($p < .05$) than that reported in India (25.82%) (Kalavathi et al., 2009), Malaysia (30.76%) (Ten et al., 1990), Italy (46.89%) (Anglani et al., 1984), and Romania (50.66%) (Butnariu et al., 2011) (Table 3).

The cytogenetic analysis of 25 patients with secondary amenorrhea revealed no chromosomal abnormalities except for a single case which had a polymorphic variant 46,XX,9pqh.

TS was confirmed in 17 patients (10.56%) who showed PA with pure Turner (45,X) in 6 patients (3.73%), mosaic 45,X without structural abnormalities in 4 patients (X/XX) (2.48%), mosaicism with X chromosomal abnormalities in 3 patients ((X/X,i(X)(q10)) (X/X,del(X)(q22)) (X/X,+mar)) (1.86%), pure Turner with X chromosomal abnormalities in

3 patients (X,i(X)(q10)) (X,del(X)(q22)) (X,dup(X)(q13q23)) (1.86%), and mosaic 45X/Turner with Y chromosomal abnormalities in 1 patient (45X/46,X,i(Y)(q10)) (0.62%) (Table 2). Indeed, the frequency of TS in Moroccan patients with PA (10.56%) is comparable ($p > .05$) with the frequencies observed in Turkey (10.78%) (Balkan et al., 2010; Geckinli et al., 2014), Tunisia (13.66%) (Lakhal et al., 2010), Iran (14.54%) (Ayatollahi et al., 2010), Hong Kong (15.61%) (Wong & Lam, 2005), and Malaysia (16.23%) (Ten et al., 1990). However, it is significantly lower ($p < .05$) than that identified in India (19.72%) (Kalavathi et al., 2009), Romania (45%) (Butnariu et al., 2011), and Italy (42.06%) (Anglani et al., 1984) (Table 3).

After regrouping our results with those reported in different countries, the frequency of chromosomal abnormalities changes to 27.95%

(875/3131), with sex reversal of 4.88% (153/3131), pure TS with or without chromosomal abnormalities of 21.75% (688/3131), and others types of chromosomal abnormalities of 1.30% (41/3131).

3.3 | Patients presenting with Turner phenotype

During these last 21 years, the Pasteur Institute of Morocco has received 556 patients with different clinical spectrum of TS. However, 129 patients showed chromosomal abnormalities in their karyotype and 110 patients (19.78%) of them had been diagnosed with TS. Among these 110 patients, 44 patients (7.91%) had pure TS/45,X,

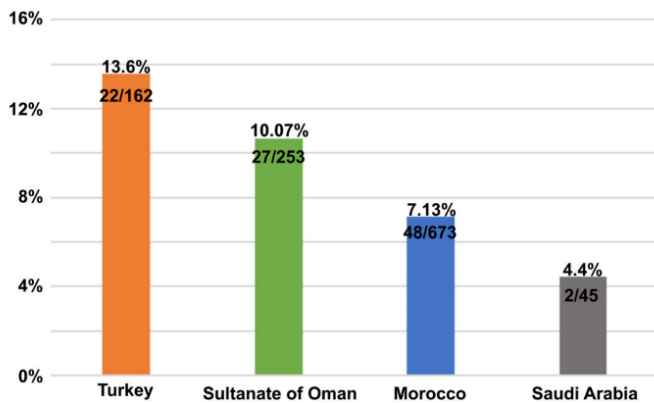


FIGURE 2 Distribution of the frequency of chromosomal abnormalities of patients with ambiguous genitalia from different countries [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

35 patients (6.29%) had mosaicism with structural chromosome X rearrangements with predominance of (X/X,i(X)(q10)) and (X/X,+mar) (15 and 12 patients, respectively), and 22 patients (3.96%) with structural chromosome X rearrangements with predominance of (X,i(X)(q10)) in 14 patients (Table 4).

The frequency of pure nonmosaic 45,X observed in this study (40%) is lower ($p < .05$) than the frequency in Turkey (50.7%) (Yeşilkaya et al., 2015) and comparable ($p > .05$) to those reported in Denmark (44.7%) (Stochholm et al., 2006), France (37.7%) (Bernard et al., 2016), United Kingdom (41.2%) (Cameron-Pimblett, La Rosa, King, Davies, & Conway, 2017), and Brazil (37.6%) (Carvalho, Lemos-Marini, Guerra-Junior, & Maciel-Guerra, 2018). However, the frequency of mosaic 45,X (39.09%) is more frequent ($p < .05$) than Brazil (20.4%), United Kingdom (26.4%), France (27.1%), and Turkey (15.9%) frequencies despite the fact that the frequency identified in Denmark (55.3%) remains the highest (Figure 3).

Of the 556 patients suspected TS, the autosomal abnormalities were observed in 19 patients (3.42%). The structural chromosome abnormalities were the most frequent and were observed in 16 patients (2.88%), whereas the numerical aneuploidy was only identified in 2 patients (0.36%) both having trisomy 21 (Table 4).

The chromosomes 1, 5, 6, 8, 9, 12, 18, and 19 were the only chromosomes altered in patients suspected with TS. Chromosome 8 was the most affected (deletion in two patients) and as derivative chromosome in one patient. There was a deletion of the chromosome 5 in two patients and inversion in one patient. An apparently reciprocal translocation was observed between the chromosomes 1 and 12, and between

TABLE 2 The cytogenetic analysis results of patients with primary amenorrhea

Cytogenetic grade	Karyotype	No. of cases	Frequency of all cases (%)
Female karyotype	46,XX	133	82.60
Male karyotype	46,XY	9	5.60
Gonosomal abnormalities		17	10.56
Pure turner	45,X	6	3.73
Pure turner with X chromosomal abnormalities		3	1.86
Isochromosome	46,X,i(X)(q10)	1	
Deletion	46,X,del(X)(q22)	1	
Duplication	46,X,dup(X)(q13q23)	1	
Mosaic turner without structural abnormalities	45,X/46,XX	4	2.48
Mosaic turner with X chromosomal abnormalities		3	1.86
Isochromosome	45,X/46,X,i(X)(q10)	1	
Deletion	45,X/46,X,del(X)(p22)	1	
Marker chromosome	45,X/46,X,+mar	1	
Mosaic turner with Y chromosomal abnormalities	45,X/46,X,i(Y)(q10)	1	0.62
Autosomal abnormalities		2	1.24
Polymorphic variants		2	1.24
	46,XX,inv(9)(p11q13)	1	
	46,XX,21ps+	1	

The bold values are the results of the groups and the others values are the results of the subgroups.

TABLE 3 Cytogenetic results of patients with primary amenorrhea observed in different part of the world

Country	No. of cases	Female karyotype No. of cases (%)	Male karyotype No. of cases (%)	Pure Turner with or without CA No. of cases (%)	Others	Total of CA No. of cases (%)
Malaysia (Ten et al., 1990)	117	81 (69.23)	17 (14.52)	19 (16.23)	0 (0.00)	36 (30.77)
India (Kalavathi et al., 2009)	852	632 (74.18)	52 (6.1)	168 (19.72)	0 (0.00)	220 (25.82)
Hong Kong (Wong & Lam, 2005)	237	179 (75.5)	20 (8.4)	37 (15.61)	1 (0.42)	58 (24.47)
Romania (Butnariu et al., 2011)	531	262 (49.34)	14 (2.64)	239 (45)	16 (3.01)	269 (50.66)
Turkey (Balkan et al., 2010; Geckinli et al., 2014)	436	345 (79.82)	23 (5.04)	49 (10.78)	19 (5.04)	91 (20.87)
Iran (Ayatollahi et al., 2010)	220	176 (80)	12 (5.5)	32 (14.54)	0 (0.00)	44 (20)
Italy (Anglani et al., 1984)	145	77 (53.10)	6 (4.14)	61 (42.06)	1 (0.69)	68 (46.89)
Tunisia (Lakhal et al., 2010)	432	371 (85.88)	0 (0.00)	59 (13.66)	2 (0.46)	61 (14.12)
Morocco (our study)	161	133 (82.60)	9 (5.60)	17 (10.56)	2 (1.24)	28 (17.39)
	3,131	2,256 (72.05)	153 (4.88)	681 (21.75)	41 (1.30)	875 (27.95)

the chromosomes 1 and 19 in one patient each. Chromosomes 1, 14, and 6 were altered in one patient each (insertion, addition, and derivative chromosomes, respectively).

3.4 | Phenotypic variability

In this study, we identified 143 patients with TS with whom the reason for recruitment was different, that is, 6 patients presented with AG (DSD), 17 patients with PA, and 110 patients with other symptoms of TS (Figure 1).

Klinefelter syndrome is a relatively common sex chromosome abnormality. It is characterized by the presence of small testes, lack of sperm development, and late puberty with diminished secondary sexual characteristics. The physique is usually fine and elongated with sometimes gynecomastia (Al-Alawi et al., 2016). However, the XXY karyotype was identified in 18 patients with AG, while XYY, 22ps+ and X/X, idic(Y)/XXY karyotypes were observed in one patient each with AG.

The karyotype 46,XY DSD can be divided into three broad categories: disorders of gonadal development where the patients may have partial or complete gonadal dysgenesis, disorders in androgen synthesis or action and other causes, including testicular ectopia, hypogonadotropic hypogonadism, and isolated hypospadias (Kyriakou, Lucas-Herald, McGowan, Tobias, & Ahmed, 2015). Girls with 46,XY DSD will most likely have gonadal dysgenesis, biochemical disorder of androgen synthesis, or an androgen insensitivity syndrome (Kyriakou et al., 2015). The incidence rate among patients with 46,XY to have a DSD has been estimated to be 1 in 20,000 births (Nistal, Paniagua, González-Peramato, & Reyes-Múgica, 2015). In the present study, the sex reversal was confirmed in 5.59% of patients with PA who have presented a female phenotype with XY karyotype.

The 45,X/46,XY mosaicism is an extremely rare sex chromosome disorder and its prevalence varies between 1.5/10,000 and 1.7/10,000 (Moussaif, Haddad, Iraqi, & Gaouzi, 2011). In 2006, the

consensus statement on the management of DSD introduced the 45,X/46,XY patients in sex chromosome DSD group (Hughes et al., 2006). Clinical features of 45,X/46,XY mosaicism are highly variable, ranging from partial virilization and AG at birth to patients with a completely male or female phenotype. In the present study, 45,X/46,XY mosaicism is only identified in patients presenting with AG and none of patients identified had amenorrhea or presented with Turner phenotype in our series.

3.5 | Limitations of the study

Our study describes the usual challenges of a retrospective analysis including potential ascertainment and misclassification biases. The details of the clinical information of the patients with AG are limited. Apart from the physical examination, we do not have any information about the serum levels of anti-Müllerian hormone (AMH), 17-hydroxyprogesterone, testosterone, cortisol, androstenedione, gonadotropins, and urinalysis. However, we cannot go further and give a diagnosis for patients with AG who presented 46,XX and 46,XY karyotypes. In addition, the conventional cytogenetic testing method is limited to the detection of chromosomal alterations larger than 5 Mb; thus, we cannot identify any chromosomal microdeletions/microduplications (detected by cytogenomic microarray) or genetic mutations. It should be noted that several genes have been identified as associated with DSDs. In patients with 46,XY DSDs, with a wide range of reproductive abnormalities including AG, approximately 30% of patients had a mutation in the SRY and NR5A1 genes (Bashamboo & McElreavey, 2016). In addition, in patients with 46,XX DSD, point mutations in coding genes leading to testis formation are mainly associated with dysregulation of the expression of SOX genes (e.g., SOX9, SOX3, and SOX10) and with syndromic forms of DSD involving the R-Spondin/WNT signaling pathway (Bashamboo & McElreavey, 2016). Overall, the genetic etiology in the majority of DSD cases is unknown and reflects our poor knowledge of the genetic pathways that are involved.

TABLE 4 The cytogenetic analysis results of patients with Turner phenotype

Cytogenetic grade	Karyotype	No. of cases	Frequency of all cases (%)
Female karyotype	46,XX	328	59.00
Male karyotype	46,XY	99	17.80
Gonosomal abnormalities		110	19.78
Pure turner	45,X	44	7.91
Pure turner with polymorphic variants	45,X,22ps+	1	0.18
Mosaic turner without structural chromosome abnormalities		8	1.44
	45,X/46,XX	7	
	45,X/47,XXX	1	
Mosaic turner with structural chromosome X rearrangements		35	6.29
Isochromosome	45,X/46,X,i(X)(q10)	15	
Deletion	45,X/46,X,del(X)	5	
Deletion + marker chromosome	45,X/47,X,del(X)(q24),+mar	1	
Dicentric chromosome	45,X/46,X,dic(X)(p23)	1	
Ring chromosome	45,X/46,X,r(X)	1	
Marker chromosome	45,X/46,X,+mar	12	
Turner with structural chromosome X rearrangements		22	3.96
Isochromosome	46,X,i(X)(q10)	14	
Isochromosome and inversion	46,X,iso(Xq),inv(9)(p13q13)	1	
Deletion	46,X,del(X)(p12)	1	
	46,X,del(X)(p21.2)	1	
	46,X,del(X)(q13)	1	
	47,X,del(Xp),+mar	1	
Derivative chromosome	46,X,der(X)	1	
	46,X,der(X)	1	
	46,X,der(X)dup(X)(q21-q28)del(X)(p21)	1	
Autosomal abnormalities		19	3.42
Structural chromosome abnormalities		16	2.88
Reciprocal translocations		2	0.36
	46,XX,t(1;12)(p11;p12)	1	
	46,XX,t(1;19)(p32;q13)	1	
Deletions		4	0.72
	46,XX,del(18)(p11)	2	
	46,XX,del(5)(p13)	1	
	46,XY,del(5)(p11)	1	
Inversions		1	0.18
	46,XY,inv(5)(q14q34)	1	
Additions		3	0.54
	46,XX,add(14)(p11)	1	
	46,XX,add(8)(p23)	1	
	46,XY,add(8)(p23)	1	
Insertions		1	0.18
	46,XX,ins(1)(p22p34)	1	
Derivative chromosome		2	0.36
	46,XY,der(6)add(6)(q26)	1	
	46,XY,der(8)	1	

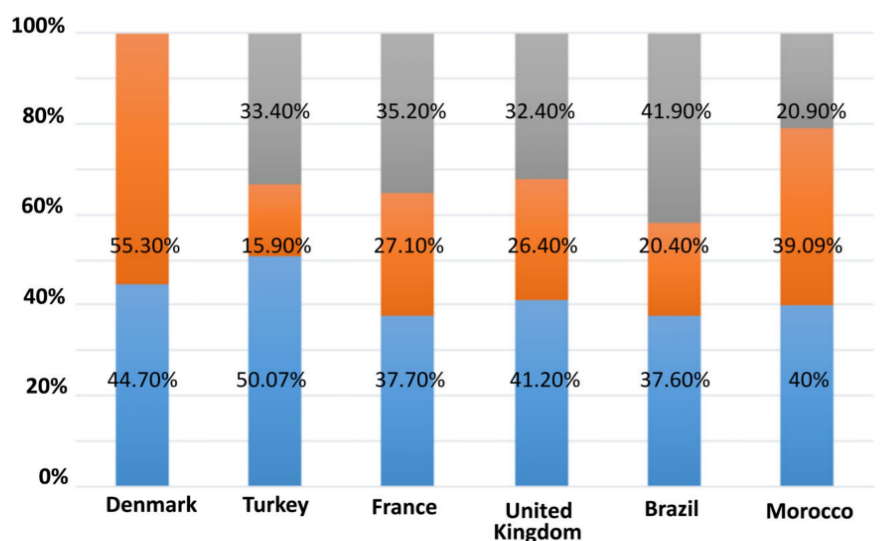
(Continues)

TABLE 4 (Continued)

Cytogenetic grade	Karyotype	No. of cases	Frequency of all cases (%)
Polymorphic variants		3	0.54
	46,XY,21ps+	1	
	46,XY,inv(9)(p11q13)	2	
Mosaicism		1	0.18
	46,X,del(X)(p11),inv(9)(p11q13)/45,X,inv(9)(p11q13)	1	
Numerical aneuploidy		2	0.36
	47,XX,+21	2	

The bold values are the results of the groups and the others values are the results of the subgroups.

FIGURE 3 Distribution of the frequency of gonosomal abnormalities of patients with Turner phenotype from different countries. Blue: 45,X; orange: mosaic Turner without structural abnormalities; gray: structural abnormalities [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]



4 | CONCLUSIONS

The present study is one of the largest cohorts of cytogenetic evaluation of sex chromosome abnormalities in patients with AG, amenorrhea, and Turner phenotype. The chromosomal abnormalities were found in 7.13% of patients with AG, 17.39% of patients with amenorrhea, and 23.20% of patients presenting with a Turner phenotype. The results of this study suggest or confirmed the karyotype/phenotype correlations and demonstrate the importance of cytogenetic analysis in confirming the diagnosis of patients suspected of having a sex chromosome abnormality.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all patients for their cooperation. This work was supported by Pasteur Institute of Morocco.

ORCID

Zouhair Elkarhat <https://orcid.org/0000-0002-6778-380X>

REFERENCES

Al-Alawi, I., Goud, T. M., Al-Harasi, S., & Rajab, A. (2016). Cytogenetic studies of 1232 patients with different sexual development abnormalities from the Sultanate of Oman. *Reproductive Biomedicine Online*, 32, 162–169.

Anglani, F., Baccichetti, C., Artifoni, L., Lenzi, E., & Tenconi, R. (1984). Frequency of abnormal karyotypes in relation to the ascertainment method in females referred for suspected sex chromosome abnormality. *Clinical Genetics*, 25, 242–247.

Ayatollahi, H., Safaei, A., & Vasei, M. (2010). Cytogenetic analysis of patients with primary amenorrhea in southwest of Iran. *Iranian Journal of Pathology*, 5, 121–125.

Balkan, M., Akbas, H., Isi, H., Oral, D., Turkyilmaz, A., Kalkanli, S., ... Budak, T. (2010). Cytogenetic analysis of 4216 patients referred for suspected chromosomal abnormalities in southeast Turkey. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 9, 1094–1103.

Bashamboo, A., & McElreavey, K. (2016). Mechanism of sex determination in humans: Insights from disorders of sex development. *Sexual Development*, 10, 313–325.

Bernard, V., Donadille, B., Zenaty, D., Courtillot, C., Salenave, S., Brac de la Perrière, A., ... CMERC Center for Rare Disease. (2016). Spontaneous fertility and pregnancy outcomes amongst 480 women with Turner syndrome. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 31, 782–788.

Butnariu, L., Covic, M., Ivanov, I., Bujoran, C., Gramescu, M., & Gorduz, E. (2011). Clinical and cytogenetic correlation in primary and secondary

- amenorrhea: Retrospective study on 531 patients. *Revista Romana de Medicina de Laborator*, 19, 149–160.
- Cameron-Pimblett, A., La Rosa, C., King, T. F. J., Davies, M. C., & Conway, G. S. (2017). The Turner syndrome life course project: Karyotype-phenotype analyses across the lifespan. *Clinical Endocrinology*, 87, 532–538.
- Carvalho, A. B., Lemos-Marini, S. H. V., Guerra-Junior, G., & Maciel-Guerra, A. T. (2018). Clinical and cytogenetic features of 516 patients with suspected Turner syndrome—a single-center experience. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism: JPEM*, 31, 167–173.
- Geckinli, B. B., Toksoy, G., Sayar, C., Soylemez, M. A., Yesil, G., Aydin, H., ... Devranoglu, B. (2014). Prevalence of X-aneuploidies, X-structural abnormalities and 46,XY sex reversal in Turkish women with primary amenorrhea or premature ovarian insufficiency. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 182, 211–215.
- Gravholt, C. H. (2005a). Clinical practice in Turner syndrome. *Nature Clinical Practice. Endocrinology & Metabolism*, 1, 41–52.
- Gravholt, C. H. (2005b). Epidemiological, endocrine and metabolic features in Turner syndrome. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, 49, 145–156.
- Hughes, I. A., Houk, C., Ahmed, S. F., Lee, P. A., & Group, L. C. (2006). Consensus statement on management of intersex disorders. *Archives of Disease in Childhood*, 91, 554–563.
- Hughes, I. A., Nihoul-Fékété, C., Thomas, B., & Cohen-Kettenis, P. T. (2007). Consequences of the ESPE/LWPES guidelines for diagnosis and treatment of disorders of sex development. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 21, 351–365.
- Husain, M. A., & Zaki, O. K. (1999). A survey of 1,000 cases referred for cytogenetic study to King Khalid University Hospital, Saudi Arabia. *Human Heredity*, 49, 208–214.
- Jacobs, P. A. (1992). The chromosome complement of human gametes. *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, 14, 47–72.
- Kalavathi, V., Chandra, N., Renjini Nambiar, G., Shanker, J., Sugunashankari, P., Meena, J., ... Marimuthu, K. M. (2009). Chromosomal abnormalities in 979 cases of amenorrhea: A review. *International Journal of Human Genetics*, 10, 65–69.
- Kyriakou, A., Lucas-Herald, A. K., McGowan, R., Tobias, E. S., & Ahmed, S. F. (2015). Disorders of sex development: Advances in genetic diagnosis and challenges in management. *Advances in Genomics and Genetics*, 5, 165–177.
- Lakkhal, B., Braham, R., Berguigua, R., Bouali, N., Zaouali, M., Chaieb, M., ... Elghezal, H. (2010). Cytogenetic analyses of premature ovarian failure using karyotyping and interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) in a group of 1000 patients. *Clinical Genetics*, 78, 181–185.
- Moussaif, N. E., Haddad, N. E., Iraqi, N., & Gaouzi, A. (2011). 45,X/46,XY mosaicism: Report of five cases and clinical review. *Annales d'Endocrinologie*, 72, 239–243. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2011.04.009>
- Nistal, M., Paniagua, R., González-Peramato, P., & Reyes-Múgica, M. (2015). Perspectives in pediatric pathology, Chapter 7. Ovotesticular DSD (true hermaphroditism). *Pediatric and Developmental Pathology*, 18, 345–352.
- Oktaç, K., Bedoschi, G., Berkowitz, K., Bronson, R., Kashani, B., McGovern, P., ... Rubin, K. (2016). Fertility preservation in females with Turner syndrome: A comprehensive review and practical guidelines. *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology*, 29, 409–416.
- Schachter, M., & Shoham, Z. (1994). Amenorrhea during the reproductive years—Is it safe? *Fertility and Sterility*, 62, 1–16.
- Stochholm, K., Juul, S., Juel, K., Naeraa, R. W., & Gravholt, C. H. (2006). Prevalence, incidence, diagnostic delay, and mortality in Turner syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91, 3897–3902.
- Ten, S. K., Chin, Y. M., Noor, P. J., & Hassan, K. (1990). Cytogenetic studies in women with primary amenorrhea. *Singapore Medical Journal*, 31, 355–359.
- Wong, M. S. F., & Lam, S. T. S. (2005). Cytogenetic analysis of patients with primary and secondary amenorrhoea in Hong Kong: Retrospective study. *Hong Kong Medical Journal = Xianggang Yi Xue Za Zhi*, 11, 267–272.
- Yeşilkaya, E., Bereket, A., Darendeliler, F., Baş, F., Poyrazoğlu, Ş., Küçükemre Aydın, B., ... Bondy, C. (2015). Turner syndrome and associated problems in Turkish children: A multicenter study. *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*, 7, 27–36.

How to cite this article: Elkarhat Z, Belkady B, Charoute H, et al. Cytogenetic profile of patients with clinical spectrum of ambiguous genitalia, amenorrhea, and Turner phenotype: A 21-year single-center experience. *Am J Med Genet Part A*. 2019;179A:1516–1524. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61257>

3. Résultats et Discussion

A notre connaissance, ce travail est le premier au Maroc qui inclut tous les patients présentant une ambiguïté génitale, une aménorrhée et un phénotype de Turner, qui ont été référés au service de cytogénétique-IPM au cours de ces 21 années (1996-2016). Ainsi, nous avons identifié 673 patients présentant une ambiguïté génitale, 186 patients présentant une aménorrhée (161 patients présentant une aménorrhée primaire et 25 patients présentant une aménorrhée secondaire) et 556 patients présentant un phénotype de Turner.

3.1. Patients présentant une ambiguïté génitale, une aménorrhée et un phénotype de Turner

Parmi les 673 patients ayant une ambiguïté génitale, nous avons observé que 78,31% des patients ont un caryotype masculin normal 46,XY, 14,56% des patients ont un caryotype féminin normal 46,XX et 7,13% des patients présentent une anomalie chromosomique. Les anomalies des gonosomes étaient les plus fréquentes dans cette cohorte de patients, elles touchaient 5,94% des patients, alors que les anomalies des autosomes n'ont été identifiées que chez 1,19% des patients. Cela dit, l'analyse du caryotype a confirmé le diagnostic de 7,13% des patients ayant une ambiguïté génitale.

En effet, 2,97% des patients sont atteints du syndrome de Klinefelter et ses variations, 1,93% des patients sont atteints de dysgénésie gonadique mixte, 0,89% des patients sont atteints du syndrome de Turner et ses variations, 0,14% des patients sont atteints de chimérisme, 0,14% des patients sont atteints d'une trisomie 8, 0,14% des patients sont atteints d'une trisomie 13, 0,14% des patients sont atteints d'une trisomie 21, 0,29% des patients ont des translocations robertsoniennes, 0,29% des patients ont une inversion du chromosome 9 et 0,14% des patients ont un polymorphisme chromosomique.

En comparant nos résultats avec ceux d'autres pays, la fréquence des anomalies chromosomiques identifiées dans cette étude (7,13%) est comparable (valeur $P > 0,05$) aux fréquences rapportées en Arabie Saoudite (4,4%) et en Sultanat d'Oman (10,07%), alors qu'elle est moins fréquente par rapport à la Turquie (13,6%) [Husain and Zaki, 1999; Al-Alawi et al., 2016; Balkan et al., 2010].

Chez 161 patientes atteintes d'une aménorrhée primaire, des anomalies chromosomiques, y compris un caryotype masculin, ont été identifiées chez 17,39% des patientes, avec 10,56% ont le syndrome de Turner qui est une anomalie gonosomique, 5,60% ont un caryotype masculin indiquant une inversion sexuelle et 1,24% ont une anomalie chromosomique autosomique.

En effet, 3,73% des patientes ont un syndrome de Turner pur, 1,86% des patientes présentent un syndrome de Turner pur avec une anomalie chromosomique structurelle, 2,48% des patientes

ont un syndrome de Turner en mosaïque sans anomalie chromosomique structurale, 1,86% des patientes présentent un syndrome de Turner en mosaïque avec une anomalie chromosomique structurale et 0,62% des patientes ont un syndrome de Turner en mosaïque avec une anomalie chromosomique au niveau du chromosome Y.

En comparant nos résultats avec ceux d'autres pays, la fréquence des anomalies chromosomiques identifiées dans cette étude (17,39%) est comparable ($p > 0,05$) avec ce qui a été rapporté en Tunisie (14,12%), en Turquie (20,87%), en Iran (20%) et en Hong Kong (24,47%), mais elle reste nettement inférieure ($p < 0,05$) à celle rapporté en Inde (25,82%), en Malaisie (30,76%), en Italie (46,89%) et en Roumanie (50,66%) [Lakhal et al., 2010; Balkan et al., 2010; Ayatollahi et al., 2010; Wong and Lam, 2005; Kalavathi et al., 2009; Ten et al., 1990; Anglani et al., 1984; Butnariu et al., 2011].

Afin d'identifier la fréquence mondiale des anomalies chromosomiques chez les patientes atteintes d'une aménorrhée primaire, nous avons regroupé nos résultats avec les résultats des pays qui ont suivi la même méthodologie d'étude, et nous avons trouvé que 27,95% des patientes (875/3131) avec une AP ont une anomalie chromosomique, 4,88% (153/3131) des patientes ont une inversion du sexe, 21,75% (688/3131) des patientes ont un syndrome de Turner et 1,30% (41/3131) des patientes ont d'autres types d'anomalies chromosomiques.

En ce qui concerne les 25 patientes atteintes d'une AS, l'analyse cytogénétique n'a révélé qu'un seul polymorphisme chromosomique 46,XX,9phqh chez une seule patiente, et aucune patiente n'avait une anomalie chromosomique ou bien le syndrome de Turner.

Chez 556 patients présentant des manifestations cliniques différentes du ST, nous avons observé que 23,20% des patients ont une anomalie chromosomique. En effet, 19,78% des patients ont été diagnostiqués d'avoir le syndrome de Turner, 2,88% ont une anomalie chromosomique de structure, 0,54% des patients ont un polymorphisme chromosomique, 0,36% des patients ont une anomalie chromosomique du nombre (trisomie 21) et 0,18% des patients ont une anomalie chromosomique en mosaïque.

Parmi les 19,78% des patients diagnostiqués d'avoir le syndrome de Turner, 7,91% des patient ont un syndrome de Turner pur 45,X, 6,29% des patients ont un syndrome de Turner en mosaïque avec une anomalie chromosomique structurale au niveau du chromosome X et 3,96% des patients ont un syndrome de Turner pur avec une anomalie chromosomique structurale au niveau du chromosome X.

3.2. *La variabilité phénotypique des patients*

Dans cette étude, nous avons identifié 143 patients atteints du syndrome de Turner. Ces patients ont présenté des manifestations cliniques différentes ce qui les ont conduits à faire une analyse du caryotype. Autrement dit, six de ces patients présentaient une ambiguïté génitale, 17 de ces patients présentaient une aménorrhée primaire et 110 de ces patients suscitaient d'avoir le syndrome de Turner.

Le syndrome de Klinefelter est une anomalie relativement commune des chromosomes sexuels. Il se caractérise avant la puberté par une cryptorchidie, un micropénis, des membres supérieurs et inférieurs de longueur excessive, des troubles du langage et de l'apprentissage et par des difficultés relationnelles. Pendant la puberté, le syndrome de Klinefelter peut être caractérisé par un retard pubertaire, un hypogonadisme de sévérité variable, une gynécomastie, une hypotrophie testiculaire. À l'Age adulte, il peut être caractérisé par une hypotrophie testiculaire sévère, une infertilité, une gynécomastie et un hypogonadisme de sévérité variable. Ainsi, nous avons identifié dans la présente étude que 18 patients, présentant une ambiguïté génitale, ont un syndrome de Klinefelter pur (47,XXY). Aussi bien, une anomalie du nombre et de structure de chromosome Y ont été identifiées chez trois patients présentant une ambiguïté génitale.

Les patients présentant une anomalie de développement sexuel avec un caryotype 46,XY peuvent être classés sous trois grandes catégories: la première catégorie regroupe les patients qui ont un développement gonadique anormale comme une dysgénésie gonadique partielle ou complète, la deuxième catégorie regroupe les patients qui ont une perturbation de la synthèse ou de l'activité des androgènes et une dernière catégories qui regroupe d'autres causes, notamment l'ectopie testiculaire, l'hypogonadisme hypogonadotrope et les hypospadias isolés [Kyriakou et al., 2015]. Les filles qui présentent un caryotype 46, XY ont très probablement une dysgénésie gonadique, un trouble de synthèse des androgènes ou un syndrome d'insensibilité aux androgènes [Kyriakou et al., 2015]. Le taux d'incidence des patients 46,XY DSD a été estimé à 1 sur 20 000 naissances [Nistal et al., 2015]. Dans la présente étude, l'inversion du sexe a été confirmée chez 5,59% des patientes atteintes d'une aménorrhée primaire.

Le mosaïcisme 45,X/46,XY est une anomalie chromosomique extrêmement rare et sa prévalence varie entre 1,5/10000 et 1,7/10000 [Moussaïf et al., 2011]. En 2006, le consensus de Chicago a classé les patients 45,X/46,XY dans une catégorie des patients appelé chromosome DSD. Les manifestations cliniques de ces patients sont très variables, allant d'une ambiguïté génitale à la naissance aux patients ayant un phénotype complètement masculin ou féminin. Dans la présente étude, le mosaïcisme 45,X/46,XY n'a été identifié que chez des patients ayant une ambiguïté génitale.

4. Conclusion

Notre étude est l'une des plus grandes études rétrospectives cytogénétiques des patients ayant une ambiguïté génitale, une aménorrhée et un phénotype de Turner. Ainsi, les anomalies chromosomiques ont été observées chez 7,13% des patients atteints d'une ambiguïté génitale, 17,39% des patients ayant une aménorrhée et 23,20% des patients présentant un phénotype de Turner. Les résultats de cette étude confirment les corrélations caryotype/phénotype de certains patients et montrent l'importance de l'analyse cytogénétique des patients suspectés d'avoir une anomalie chromosomique au niveau des chromosomes sexuels.

Chapitre 3 : Identification d'une nouvelle mutation chez un patient DSD avec le séquençage d'exome complet

1. Introduction

La détermination du sexe chez l'homme repose sur trois étapes essentielles : la première étape est l'établissement du sexe chromosomique, qui se produit lors de la formation du zygote et qui dépend du matériel génétique apporté par chacun des gamètes. La deuxième étape est la détermination du sexe gonadique, qui correspond à la formation des gonades testiculaires ou ovariennes à la 6^{ème} semaine de gestation. La troisième étape est la détermination du sexe phénotypique qui correspond à la différenciation des voies génitales et des organes génitaux externes, et qui s'effectue sous l'influence des facteurs hormonaux. Lorsqu'une erreur survient au cours de l'une de ces étapes, l'enfant à naître pourra être porteur d'une anomalie de développement sexuel (DSD dans la littérature anglophone) [McNamara et al., 2017].

Le terme anomalie du développement sexuel (DSD) englobe tous les patients ayant une discordance entre le sexe chromosomique, le sexe gonadique et le sexe phénotypique [Hughes et al., 2006]. En 2006, Hughes a publié la dernière classification de DSD, qui se base sur le résultat du caryotype, et qui a été établie suite à la réunion de la société Lawson Wilkins de l'endocrinologie pédiatrique (LWPES) et la société européenne de l'endocrinologie pédiatrique à Chicago. La première classe comprend les patients DSD présentant le caryotype 46,XY. La deuxième classe comprend les patients DSD ayant un caryotype 46,XX et la dernière classe comprend les patients DSD avec une anomalie chromosomique [Hughes et al., 2006].

Les examens anatomiques, endocriniens, d'imagerie et les expériences des cliniciens ont toujours guidé les généticiens vers une analyse d'un seul gène candidat. Cependant, dans le cas des DSD, l'étude génétique ciblée présente un défi majeur à cause d'une faible corrélation génotype-phénotype des patients d'une part, et du chevauchement des phénotypes des patients d'autre part. En conséquence, les examens génétiques des DSD ont progressivement évolué d'un examen monogénique, qui est généralement réalisé à l'aide du séquençage Sanger, à des examens multigéniques grâce à la nouvelle génération de séquençage. Ainsi, l'objectif de cette étude est d'identifier la cause génétique de l'apparition d'une anomalie de développement sexuel chez des familles marocaines avec le séquençage haut débit de l'exome (WES).

2. Article 3

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'un article scientifique intitulé : New homozygous missense variant of *HSD3B2* gene cause disorder of sex development in 46,XY patient.

18 INTRODUCTION

19 Sex determination in humans is based on three essential steps: the first one is the chromosomal
20 sex, which happens during the formation of the zygote and which depends on the chromosomal
21 material provided by each gamete. The second is gonadal determination, which occurs by the 6th
22 week of gestation It corresponds to the formation of the testicular or ovary gonads. The third is
23 anatomic sex differentiation where the gonad and presence of hormones acts to determine
24 phenotypic sex. An alteration during these steps can lead to disorder of sex development (DSD)
25 [McNamara et al., 2017].

26 The term disorders of sex development (DSD) encompasses all the medical conditions featuring
27 an atypical chromosomal, gonadal, or phenotypical sex [Hughes et al., 2006]. They show different
28 occurrence and their severity ranges from genital anomalies that do not undermine sexual
29 definition or functionality, such as Hypospadias, to levels that would lead to sexual ambiguity or
30 incompatibility between chromosomal and internal or external sex anatomy. In 2006, Hughes came
31 up with the latest classification of DSD based on studies and researches on the sex chromosomal
32 and gonadal development or phenotypic differentiation in which the alteration took place [Hughes
33 et al., 2006]. The first class includes DSD patients with the karyotype 46,XY. The second class
34 comprises DSD patients having a karyotype 46,XX, and the last class includes DSD patients with
35 a chromosomal abnormality [Hughes et al., 2006].

36 46,XY DSD can be divided to three broad categories: disorders of gonadal development where
37 the Patients may have partial or complete gonadal dysgenesis, disorders in androgen synthesis or
38 action and other causes, including testicular ectopia, hypogonadotropic hypogonadism, and
39 isolated hypospadias [Kyriakou et al., 2015]. Girls with 46,XY DSD will most likely have gonadal
40 dysgenesis, biochemical disorder of androgen synthesis or an androgen insensitivity syndrome
41 (AIS) [Kyriakou et al., 2015]. The incidence rate among subjects with 46,XY to have a DSD has
42 been estimated to be 1 in 20,000 births [Nistal et al., 2015].

43 46,XX DSD includes disorders of gonadal development, and disorders secondary to androgen
44 excess [Ahmed et al., 2013]. The disorders of gonadal development may be characterized by the
45 presence of gonadal dysgenesis, ovotestis or differentiation of the gonad in testis [Hyon and
46 Rouen, 2013; Lee et al., 2006]. The first cause of abnormal sexual development in patients 46, XX
47 is the presence of the SRY gene on the short arm of an X chromosome by unequal recombination
48 with the Y chromosome during paternal meiosis [Hyon and Rouen, 2013]. However, other genetic
49 causes are responsible for testicular differentiation such as duplication or upstream of SOX9 gene
50 [Huang et al., 1999; Benko et al., 2011; Cox et al., 2011] and mutations of RSPO1 gene [Parma et
51 al., 2006; Naasse et al., 2017]. The second cause of abnormal sexual development in patients 46,
52 XX is an excess of androgens during embryonic development. It may be of fetal origin in cases of
53 congenital adrenal hyperplasia due to an abnormality of the biosynthesis of adrenal hormones
54 [White and Speiser, 2000] or fetoplacental origin due to deficit in aromatase or in oxidoreductase
55 [Hyon and Rouen, 2013]. The worldwide incidence of 46,XX DSD, has been estimated to be 1 in
56 14,000–15,000 live births [Pang et al., 1988], but When all congenital genital anomalies are
57 considered, including Cryptorchidism and Hypospadias, the rate may be as high as 1 in 200-300
58 [Nordenvall et al., 2014].

59 Chromosomal DSD include Turner Syndrome XO, Klinefelter Syndrome XXY, Jacob
60 Syndrome XYY, Mixed Gonadal Dysgenesis (MGD) 45,X/46,XY, Chimerism 46,XX/46,XY and
61 any combinations of reduced or excessive numbers of chromosomes [Hughes et al., 2006].

62 Anatomical, endocrine, imaging, and clinician experiences have always guided geneticists
63 toward a single candidate gene analysis. However, in the case of DSD, the targeted genetic study
64 presents a major challenge because of a weak genotype-phenotype correlation of the patients and
65 the overlapping of the phenotypes of the patients. As a result, DSD genetic examinations have
66 progressively evolved from a monogenic examination, which is usually performed using Sanger
67 sequencing, to multigene examinations using the new generation of sequencing. Thus, the

68 objective of this study is to identify the genetic cause of disorder of sex development in Moroccan
69 patients using next-generation sequencing.

70 **MATERIALS AND METHODS**

71 **Consent for genetics investigations**

72 Written informed consent was obtained from the parents of subjects under 18 years of age,
73 according to approved protocols by the local research ethics committee of the Pasteur Institute of
74 Morocco and the ethics committee for biomedical research of the faculty of medicine and
75 pharmacy in Casablanca, Morocco.

76 **DNA extraction**

77 Genomic DNA Extraction from whole blood was performed using the PureLink® Genomic
78 DNA Mini Kit Invitrogen according to manufacturer's instructions. DNA extracts were stored at -
79 20° C until use.

80 **SRY analysis**

81 SRY gene detection in patients with disorder of sex development was carried out from the
82 peripheral blood lymphocyte DNA by PCR, using specific sequences (STS) for this region
83 according to the recommendations of the European Academy of Andrology (EAA): the primers
84 sY14 (470 bp) used are: SY14 F (Forward): 5' GAATATTCCCGCTCTCCGGA 3', SY14 R
85 (Reverse): 5' GCTGGTGCTCCATTCTTGAG 3'. PCR was carried out in a total volume of 15µL,
86 containing 3µL of genomic DNA (~ 15 to 25ng), 1.2µL of dNTP (deoxyribonucleotides) (2.5mM),
87 0.3µL of each primer (20mM), 0.45µL of MgCl₂ (50mM), 0.05µL of Taq polymerase (5U / µL)
88 and 1.5µL of PCR buffer (10 ×). The PCR was performed according to the following conditions :
89 an initial denaturation at 95 °C for 5 minutes, followed by 35 cycles, each includes denaturation
90 at 94 °C for 40s, hybridization at 61 °C for 40s and extension to 72 °C for 50s. at the end of the 35
91 cycles a final extension was carried out for a period of 7 min. The PCR product was checked by
92 electrophoresis on a 3% agarose gel in the presence of a 100 bp size marker.

93 **Whole Exome Sequencing**

94 Exon enrichment was performed with Agilent SureSelect Human All Exon V4 or V5. Paired-
95 end sequencing was performed on the Illumina HiSeq2000 or HiSeq2500 platform with TruSeq
96 v3 chemistry. Read files (fastq) were generated from the sequencing platform via the
97 manufacturer's proprietary software. Reads were mapped with the Burrows-Wheeler Aligner, and
98 local realignment of the mapped reads around potential insertion/deletion (indel) sites was carried
99 out with GATK version 1.6. Duplicate reads were marked with Picard version 1.62
100 (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). Additional BAM file manipulations were performed with
101 Samtools (0.1.18). SNP and indel variants were called with the GATK Unified Genotyper for each
102 sample. SNP novelty was determined against dbSNP138. Novel variants were analyzed by a range
103 of web-based bioinformatics tools on Ensembl SNP Effect Predictor
104 (<http://www.ensembl.org/homosapiens/userdata/uploadvariations>). All variants were screened
105 manually against the Human Gene Mutation Database Professional Biobase
106 (<http://www.biobaseinternational.com/product/hgmd/>). In silico analysis was performed to
107 determine the potential pathogenicity of the variants. Potentially pathogenic mutations were
108 verified with classic Sanger sequencing.

109 **RESULTS AND DISCUSSION**

110 **Clinical examination of patients**

111 The patient 1 have a 46,XX karyotype and was noted to have ambiguous genitalia. Indeed,
112 clinical examination reveals that the genital bud has a bent and buried appearance and the genital
113 buds have a smooth appearance resembling the labia majora. Pelvic ultrasound confirms the
114 absence of testis, uterus, pelvic mass and good morphology of the kidneys and bladder. The patient
115 has constipation and according to their mother, the patient also has erection episodes. SRY gene
116 does not been detected, using PCR analysis, which places this patient in 46,XX SRY-negative
117 category. Exome sequencing of the patient and their parents did not reveal the presence of any
118 deleterious variant that could cause this disorder of sex development.

119 The patient 2 have 46,XX karyotype and diagnosed as having a disorder of sex development.
120 The genitography shows the presence of Müllerian cavity of 29 mm and a urethra corresponding
121 to a Prader 5. Pelvic ultrasonography reveals a full bladder with thin wall and transonorous content,
122 a uterus in place of regular content with endocavitary line regular and in place, right ovary of
123 normal appearance, left ovary not observed and pelvic mass is absent. The radioimmunoassay at
124 the age of 6 months revealed a very high concentration of 17α -hydroxyprogesterone (20.3 nmol/l).
125 The dosage of fasting blood sugar, sodium Na and potassium K at the age of 9 months was normal
126 (4.83 nmol/l, 140 nmol/l, and 4.20 nmol/l respectively). Analysis of the SRY gene by PCR simplex
127 confirms its absence in the patient, which places it in the 46, XX SRY-negative category. Exome
128 sequencing of the patient did not reveal the presence of any deleterious variants that could cause
129 this disorder of sex development.

130 The patient 3 was born in 2014 with a weight of 3300 g and a height of 51 cm. The neurological
131 examination at birth is normal and the patient did not show clinical signs of acute hypotonic
132 dehydration. During the first examination of the external genital organs, it was noted that the
133 patient has a 2 cm bud, striated and pigmented bulges, palpated gonads and perineal hypospadias.
134 Pelvic ultrasonography revealed the absence of a retro-bladder uterus, the presence of a good
135 bladder-capacity with a thin wall of transonorous content, and the absence of effusion in the
136 Douglas. The hormonal assay revealed a normal concentration of inhibin, progesterone, 11-
137 deoxyprogesterone, free T4, T.S.H, and a very high concentration of 17α -hydroxyprogesterone,
138 dehydroepiandrosterone, AMH, testosterone, renin and androstenedione (Table 1). Analysis of the
139 SRY gene by PCR simplex confirms the presence of the SRY gene, which classifies the patient in
140 the 46,XY SRY-Positive category. The male sex was assigned to the child and surgical treatment
141 was performed using the two-staged Bracka method. At the age of 5 years-old, an X-ray of the left
142 wrist from the front revealed that the bone age is estimated at 30 months according to the Atlas of
143 Greulich and Pyle.

144 Exome sequencing of the patient has revealed an homozygous missense mutation
145 p.(Asn323Lys) in the *HSD3B2* gene. This mutation is located on exon 4 of the *HSD3B2* gene
146 (NM_001166120: exon4: c.T969G) and, to the best of our knowledge, it is new and is not
147 described in any public genetic database. The impact of this mutation on the HSD3B2 protein has
148 been predicted by SIFT and Polyphen-2 as deleterious.

149 ***HSD3B2*, gene involved in disorder of sex development**

150 *HSD3B2* gene is located at chromosome 1p11-13, and codes for a 372 amino acid protein called
151 3 β -HSD type 2. This protein catalyzes the oxidation and isomerization of pregnenolone, 17 α -
152 hydroxypregnenolone and dehydroepiandrosterone (DHEA) to progesterone, 17 α -
153 hydroxyprogesterone and androstenedione. Thus permitting the adrenal gland to produce the
154 cortisol, aldosterone, androgens and estrogens. This protein is expressed in adrenal glands and
155 gonads, unlike 3 β -HSD type 1 which is expressed in the placenta and peripheral tissues
156 [Baquedano et al., 2018].

157 We identified a new homozygous missense variant p.(Asn323Lys) of *HSD3B2* gene in a
158 46,XY-SRY positive patient with disorder of sex development. This variant was never reported in
159 any public genetic database. Indeed, the patient had perineal hypospadias at birth with a high level
160 of 17 α -hydroxyprogesterone, dehydroepiandrosterone, AMH, testosterone, renin and
161 androstenedione.

162 To date, 52 missense mutations in the *HSD3B2* gene have been reported in the HGM (Human
163 genome mutation) database, including 48 missense mutations (Table 2). The functional studies of
164 several mutations confirmed their implications 3 β -HSD deficiency and consequently in disorder
165 of sex development.

166 Classic 3 β -HSD deficiency is a rare type of congenital adrenal hyperplasia (HCS) with a
167 prevalence of one per million inhabitants [Simard et al., 2005]. It is caused by mutations in the
168 *HSD3B2* gene. In addition to adrenal insufficiency, gonadal function in patients with 3 β -HSD

169 deficiency is also impaired, since the enzyme also plays a key role in the synthesis of sex steroids.
170 Affected individuals 46, XY exhibit insufficient virilization ranging from hypospadias to genital
171 ambiguity, and individuals 46,XX suffering from 3 β -HSD deficiency also exhibit moderate signs
172 of virilization of the external genital organs [Baquedano et al., 2018]. This deficit requires a
173 clinical approach different from the deficit in 21-hydroxylase (21-OHD), the main type of CAH,
174 because in 21-OHD, only patients 46, XX have genital ambiguity.

175 CONCLUSION

176 The present study is based on the identification of the genetic cause of the appearance of
177 Disorder of sex development. Indeed, we performed the sequencing analysis of the whole exome
178 of 3 patients with different DSD phenotypes, and we identified a new homozygous missense
179 variant in the *HSD3B2* gene in a patient 46, XY-SRY positive with perineal hypospadias at birth
180 and a high level of 17 α -hydroxyprogesterone, dehydroepiandrosterone, AMH, testosterone, renin
181 and androstenedione.

182 ACKNOWLEDGMENTS

183 We thank all patients for their cooperation. This work was supported by Pasteur Institute of
184 Morocco and funded in part by the French National Research Agency (ANR).

185 REFERENCES

- 186 Ahmed SF, Bashamboo A, Lucas-Herald A, McElreavey K. 2013. Understanding the genetic
187 aetiology in patients with XY DSD. *Br. Med. Bull.* 106: 67–89.
- 188 Baquedano MS, Guercio G, Costanzo M, Marino R, Rivarola MA, Belgorosky A. 2018. Mutation
189 of HSD3B2 Gene and Fate of Dehydroepiandrosterone. *Vitam. Horm.* 108: 75–123.
- 190 Benko S, Gordon CT, Mallet D, Sreenivasan R, Thauvin-Robinet C, Brendehaug A, Thomas S,
191 Bruland O, David M, Nicolino M, Labalme A, Sanlaville D, Callier P, Malan V, Huet F, Molven
192 A, Dijoud F, Munnich A, Faivre L, Amiel J, Harley V, Houge G, Morel Y, Lyonnet S. 2011.
193 Disruption of a long distance regulatory region upstream of SOX9 in isolated disorders of sex
194 development. *J. Med. Genet.* 48: 825–830.

- 195 Cox JJ, Willatt L, Homfray T, Woods CG. 2011. A SOX9 Duplication and Familial 46,XX
196 Developmental Testicular Disorder. *N. Engl. J. Med.* 364: 91–93.
- 197 Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb AN, Bartley J. 1999. Autosomal XX sex reversal caused by
198 duplication of SOX9. *Am. J. Med. Genet.* 87: 349–353.
- 199 Hughes IA, Houk C, Ahmed SF, Lee PA, Group LC. 2006. Consensus statement on management
200 of intersex disorders. *Arch. Dis. Child.* 91: 554–563.
- 201 Hyon C, Rouen A. 2013. Entre déterminisme génétique et théorie du genre. *Médecine
202 Thérapeutique Médecine Reprod. Gynécologie Endocrinol.* 15: 96–105.
- 203 Kyriakou A, Lucas-Herald AK, McGowan R, Tobias ES, Ahmed SF. 2015. Disorders of sex
204 development: advances in genetic diagnosis and challenges in management. *Adv. Genomics
205 Genet.* 5: 165–177.
- 206 Lee PA, Houk CP, Ahmed SF, Hughes IA, International Consensus Conference on Intersex
207 organized by the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society and the European Society for
208 Paediatric Endocrinology. 2006. Consensus statement on management of intersex disorders.
209 International Consensus Conference on Intersex. *Pediatrics* 118: e488-500.
- 210 McNamara ER, Swartz JM, Diamond DA. 2017. Initial Management of Disorders of Sex
211 Development in Newborns. *Urology* 101: 1–8.
- 212 Naasse Y, Bakhchane A, Charoute H, Jennane F, Bignon-Topalovic J, Malki A, Bashamboo A,
213 Barakat A, Rouba H, McElreavey K. 2017. A Novel Homozygous Missense Mutation in the
214 FU-CRD2 Domain of the R-spondin1 Gene Associated with Familial 46,XX DSD. *Sex. Dev.*
215 11: 269–274.
- 216 Nistal M, Paniagua R, González-Peramato P, Reyes-Múgica M. 2015. Perspectives in Pediatric
217 Pathology, Chapter 7. Ovotesticular DSD (True Hermaphroditism). *Pediatr. Dev. Pathol. Off.
218 J. Soc. Pediatr. Pathol. Paediatr. Pathol. Soc.* 18: 345–352.
- 219 Nordenvall AS, Frisén L, Nordenström A, Lichtenstein P, Nordenskjöld A. 2014. Population based
220 nationwide study of hypospadias in Sweden, 1973 to 2009: incidence and risk factors. *J. Urol.*
221 191: 783–789.
- 222 Pang SY, Wallace MA, Hofman L, Thuline HC, Dorche C, Lyon IC, Dobbins RH, Kling S, Fujieda
223 K, Suwa S. 1988. Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal
224 hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Pediatrics* 81: 866–874.
- 225 Parma P, Radi O, Vidal V, Chaboissier MC, Dellambra E, Valentini S, Guerra L, Schedl A,
226 Camerino G. 2006. R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and
227 malignancy. *Nat. Genet.* 38: 1304–1309.

228 Simard J, Ricketts M-L, Gingras S, Soucy P, Feltus FA, Melner MH. 2005. Molecular biology of
 229 the 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family. *Endocr. Rev.*
 230 26: 525–582.

231 White PC, Speiser PW. 2000. Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency.
 232 *Endocr. Rev.* 21: 245–291.

233

234 **Table 1: Results of hormone test of patient 3**

Hormones	Values (V)		N. values
Inhibine	84	pg/ml	10-100
AMH	212*	pmol/l	0,7-61
Progesterone	2,20	nmol/l	0.16-10.18
Testosterone	41.4*	nmol/l	0.17-0.69
11-Deoxyprogesterone	22	nmol/l	3.5-23
17 α -Hydroxyprogesterone	36*	nmol/l	1,2-9,08
Androstenedione	18*	nmol/l	0.35-4.19
Dehydroepiandrosterone	98*	μ mol/l	1.3-4.5
Cortisol	38*	nmol/l	176-579
Renin	345.3*	mUI/l	2.8-39.9

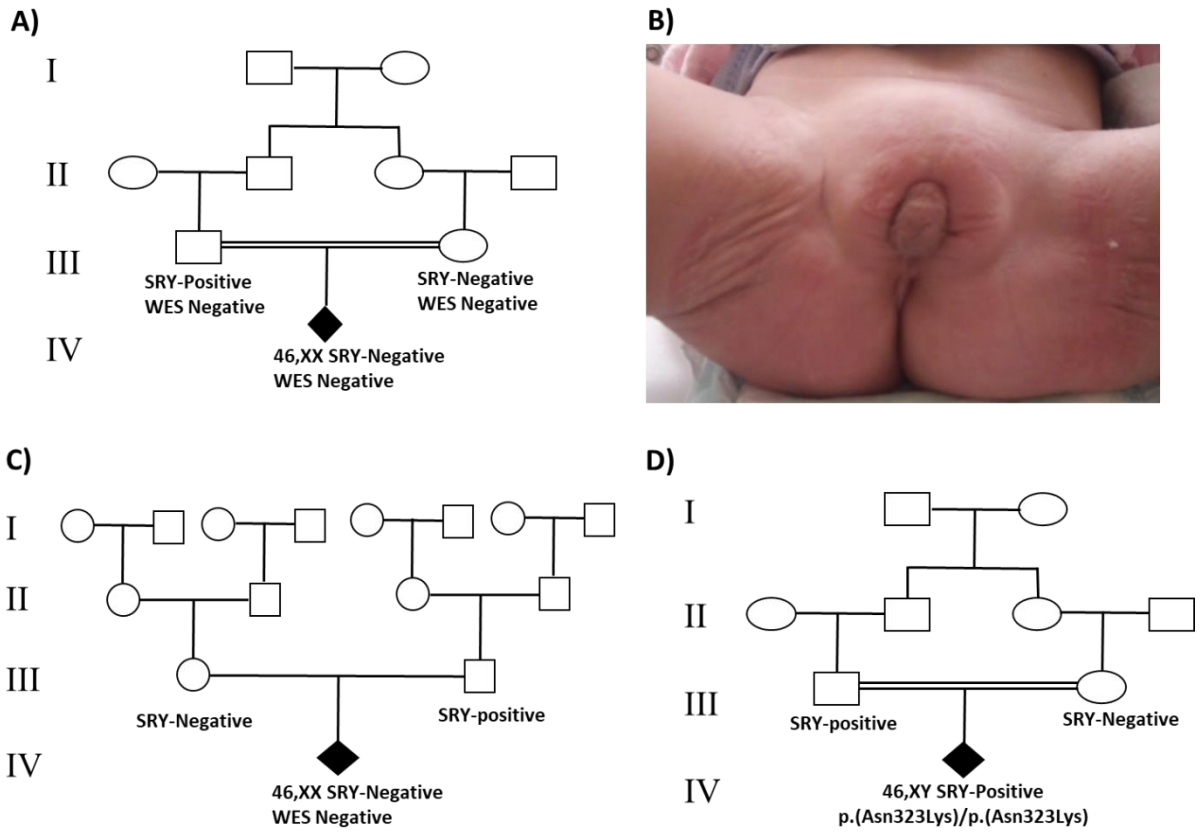
235

236

237 **Table 2: List of HSD3B2 gene mutation reported in the HGM (Human Genome**
 238 **Mutation database)**

Identifiant	Variant	Phenotype	Identifiant	Variant	Phenotype
CM000720	L6F	3 β -HSD deficiency	CM040433	S213T	Idiopathic hypospadias
CM152934	A10T	Hypospadias, non-syndromic	CM995305	S213G	3 β -HSD deficiency
CM001196	A10E	3 β -HSD deficiency	CM995306	K216E	3 β -HSD deficiency
CM993167	A10V	3 β -HSD deficiency	CM145626	S218P	3 β -HSD deficiency
CM157946	G11E	3 β -HSD deficiency	CM023090	P222T	3 β -HSD deficiency
CM952220	G15N	3 β -HSD deficiency	CM993169	P222Q	3 β -HSD deficiency
CM1414273	E25X	3 β -HSD deficiency	CM993170	L236S	3 β -HSD deficiency?
CM940954	A82T	DSD	CM930412	A245P	Adrenal hyperplasia
CM124707	A82P	3 β -HSD deficiency	CM950655	R249X	Adrenal hyperplasia
CM950653	N100S	DSD	CM1210438	G250V	Adrenal hyperplasia
CM940955	L108W	DSD	CM930413	Y253N	Adrenal hyperplasia
CM940956	G129R	Adrenal hyperplasia	CM940959	Y254D	Adrenal hyperplasia
CM970746	E135X	Adrenal hyperplasia	CM950656	T259R	Adrenal hyperplasia
CM930411	E142K	Adrenal hyperplasia	CM993171	T259M	3 β -HSD deficiency
CM993168	P155L	3 β -HSD deficiency	CM040434	S284R	Hypospadias idiopathiques
CM154062	A161P	Adrenal hyperplasia	CM993172	G294V	3 β -HSD deficiency
CM985528	A167V	3 β -HSD deficiency?	CM950657	Y308X	Adrenal hyperplasia
CM920363	W171Q	Adrenal hyperplasia	CM125506	Q334X	3 β -HSD deficiency
CM940957	L173R	DSD	CM081308	R335X	3 β -HSD deficiency
CM154063	Y180X	3 β -HSD deficiency	CM161101	Y339C	3 β -HSD deficiency, partial
CM940958	P186L	DSD	CM081307	P341L	3 β -HSD deficiency
CM145625	Y190C	3 β -HSD deficiency	CM081309	W355X	3 β -HSD deficiency
CM950654	L205P	Adrenal hyperplasia	CM021276	X373C	3 β -HSD deficiency

239



240

241

242

Figure 1: Pedigree and clinical presentation of DSD patients. A) Pedigree of patient 1, B) clinical presentation of patient 1, C) pedigree of patient 2, D) pedigree of patient 3.

3. Résultats et Discussion

Au Maroc, l'identification de la cause génétique des patients atteints d'une anomalie de développement sexuel reste à ce jour très difficile à réaliser, à cause de la faible corrélation génotype-phénotype des patients, et à cause de la difficulté de réaliser une analyse de l'exome, ce qui oblige les médecins à se limiter au résultat du caryotype. Dans cette étude, nous avons réalisé le séquençage haut débit d'exome pour 3 patients marocains atteints d'une anomalie de développement sexuel. Ainsi, nous avons identifié la présence d'une nouvelle mutation homozygote, jamais décrite dans aucune base de données génétique publique, au niveau de l'exon 4 du gène *HSD3B2*, chez un patient atteint d'une anomalie de développement sexuel. En effet, le patient présentait un hypospadias périnéal à la naissance avec un taux élevé de 17α -hydroxyprogestérone, déhydroépiandrostérone, AMH, testostérone, rénine et de l'androstènedione. L'analyse du caryotype sanguin du patient a révélé un caryotype masculin et l'analyse du gène SRY par PCR simplex a classé le patient dans la catégorie des patients 46,XY SRY-positive.

Le gène *HSD3B2* est situé au niveau du chromosome 1p11-13, et code pour une protéine de 372 acides aminés nommée 3β -HSD de type 2. Cette protéine est impliquée dans la production du cortisol, de l'aldostérone, des androgènes et des œstrogènes, en réalisant des réactions d'oxydation et d'isomérisation du prégnénolone, 17α -hydroxyprégnénolone et déhydroépiandrostèrone (DHEA) en progestérone, 17α -hydroxyprogestérone et androstènedione. Elle est exprimée au niveau des glandes surrénales et au niveau des gonades, contrairement au 3β -HSD de type 1 qui est codée par le gène *HSD3B1*, et qui est exprimée dans le placenta et les tissus périphériques [Baquedano et al., 2018].

À ce jour, 52 mutations du gène *HSD3B2* ont été rapportées dans la base de données HGM (Human genom mutation), dont 48 mutations faux-sens. L'étude fonctionnelle de plusieurs mutations a confirmé leurs implications dans les anomalies de développement sexuel.

Le déficit classique en 3β -HSD est un type rare de l'hyperplasie congénitale des surrénales (HCS) avec une prévalence de un par million d'habitants [Simard et al., 2005]. Il est causé par des mutations au niveau du gène *HSD3B2*. En plus de l'insuffisance surrénale, la fonction gonadique chez les patients atteints d'un déficit en 3β -HSD est aussi altérée, car l'enzyme a également un rôle clé dans la synthèse des stéroïdes sexuels. Les individus 46,XY affectés présentent une virilisation insuffisante allant de l'hypospadias à l'ambiguïté génitale, et les individus 46,XX atteints de 3β -HSD présentent également des signes modérés de virilisation des organes génitaux externes [Baquedano et al., 2018]. Cette ambiguïté des organes génitaux externes causée par un dysfonctionnement gonadique est un phénotype caractéristique des patients ayant un déficit en 3β -

HSD. Ce déficit nécessite une approche clinique différente du déficit en 21-hydroxylase (21-OHD), le principal type de CAH, car dans le 21-OHD, seuls les patients 46,XX présentent une ambiguïté génitale.

4. Conclusion

La présente étude repose sur l'identification de la cause génétique de l'apparition d'une anomalie de développement sexuel. En effet, nous avons réalisé l'analyse de séquençage de l'exome complet de 3 patients présentant différents phénotypes de DSD, et nous avons identifié une nouvelle mutation au niveau du gène HSD3B2 chez un patient 46,XY-SRY positive avec hypospadias périnéal à la naissance et un taux élevé de 17 α -hydroxyprogestérone, déhydroépiandrostérone, AMH, testostérone, rénine et androstènedione.

Chapitre 4 : Identification des nsSNPs les plus délétères du gène *PIWIL1* et leur impact sur la structure, la stabilité, la flexibilité et la dimension du domaine PAZ : Analyse in silico

1. Introduction

L'infertilité est définie comme l'incapacité d'un couple à concevoir après 12 mois de rapport sexuel régulier et non protégée. Elle affecte entre 8 et 12% des couples dans le monde entier [Vander Borcht and Wyns, 2018]. L'infertilité masculine est une maladie très complexe et son étiologie reste à ce jour inconnu chez environ 30% des cas. Mais grâce à l'introduction des nouvelles technologies dans le domaine de la Biologie Moléculaire, des centaines des gènes voir même des nouvelles voies impliquées dans la spermatogenèse ont été découvertes comme la voie des ARN interagissant avec PIWI (piARN) [Cooke and Saunders, 2002; O'Bryan and de Kretser, 2006; Yan, 2009].

Les piARN sont une nouvelle classe des petits ARN non codants spécifique à la lignée germinale. Leurs tailles varient entre 24 et 30 nucléotides et ils sont très répandus chez l'homme, la souris, le rat, le poisson, le ver et même chez les animaux plus simples, comme les éponges (*Amphimedon queenslandica*) et l'anémone de mer (*Nematostella vectensis*), mais pas dans les champignons ou les plantes [Grimson et al., 2008]. Les piARN interagissent avec les protéines effectrices PIWI afin de former un complexe ribonucléoprotéique qui va éliminer les éléments transposables et maintenir l'intégrité du génome. Les transposons sont capables de se multiplier dans le génome par transposition sur de nouveaux sites, ce qui provoque des effets néfastes sur les organismes, conduisant à des réarrangements structuraux au niveau du génome, tels que des délétions, des duplications et des inversions. Cependant, l'importance fonctionnelle de cette voie a été révélée par des études génétiques, montrant que les mutations au niveau des gènes *PIWILs* induisent une stérilité chez la souris, le poisson et les mouches [Carmell et al., 2007; Deng and Lin, 2002; Houwing et al., 2007; Kuramochi-Miyagawa et al., 2004; Lai et al., 2004; Schmidt et al., 1999]. En outre, plusieurs études cas-témoins ont confirmé l'associations de certains polymorphismes des gènes *PIWI* avec l'infertilité masculine chez différentes populations [Kamaliyan et al., 2018; Muñoz et al., 2014, 4].

Chez l'homme, on distingue quatre types des protéines PIWI qui forment une sous famille des protéines Argonautes : *PIWIL1*, *PIWIL2*, *PIWIL3* et *PIWIL4*. Ces protéines se caractérisent par quatre domaines : le domaine N-terminal, le domaine PAZ, le domaine MID et le domaine PIWI [Meister, 2013]. Les deux domaines PAZ et MID sont responsable à la fixation des piARN tandis que le domaine PIWI est semblable à la ribonucléase H (RNase H) [Cora et al., 2014; De Fazio et al., 2011; Reuter et al., 2011].

L'étude fonctionnelle de tous les variants du gène *PIWILI* est très couteuse et demande énormément de temps. Cependant, la bio-informatique est très utile pour ce genre d'étude. En effet, les méthodes *in silico* sont moins couteuse et peuvent prédire la pathogénicité des polymorphismes non synonymes avec une grande vitesse et les résultats sont reproductible si le même modèle est utilisé [Ali et al., 2017; George Priya Doss and Zayed, 2017; Zaki et al., 2017; Agrahari et al., 2018; Srinivasan and Rajasekaran, 2018]. Récemment, plusieurs outils bio-informatiques ont été développés et utilisés pour prédire l'impact des variants faux-sens (nsSNP) sur la structure, la stabilité, la flexibilité et la dimension des protéines [AbdulAzeez and Borgio, 2016; Arshad et al., 2018; Bhatnager and Dang, 2018; Chandrasekaran et al., 2017; Dakal et al., 2017; Hassan et al., 2019; Kelly and Barr, 2014; Seifi and Walter, 2018]. Ainsi, notre étude a pour objectif d'identifier les nsSNPs les plus délétères du gène *PIWILI* à l'aide d'un certain nombre d'outils de prédiction computationnelle et d'évaluer leur impact sur la structure et la fonction du domaine PAZ à l'aide de la simulation de la dynamique moléculaire.

2. Article 4

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'un article scientifique intitulé : Identification of deleterious missense variants of human Piwi like RNA-mediated gene silencing 1 gene and their impact on PAZ domain structure, stability, flexibility and dimension : *in silico* analysis.

L'article a été publié dans le journal : Journal of Biomolecular Structure and Dynamics / Taylor & Francis Online.

Identification of deleterious missense variants of human *Piwi like RNA-mediated gene silencing 1* gene and their impact on PAZ domain structure, stability, flexibility and dimension: *in silico* analysis

Zouhair Elkarhat^{a,b}, Lamiaa Elkhatabi^a, Hicham Charoute^a, Imane Morjane^a, Abdellatif Errouagui^a, Francis Carey^a, Boubker Nasser^b, Abdelhamid Barakat^a and Hassan Rouba^a

^aLaboratory of Genomics and Human Genetics, Institut Pasteur du Maroc, Casablanca, Morocco; ^bFaculty of Science and Technology, Laboratory of Neuroscience and Biochemistry, Settat, Morocco

Communicated by Ramaswamy H. Sarma

Abbreviations: NPT: constant number (N), pressure (P), and temperature (T); nsSNP: non-synonymous single nucleotide polymorphism; NVT: constant number (N), volume (V), and temperature (T); PIWIL1: Piwi-like protein 1; RMSD: Root Mean Square Deviation; RMSF: Root Mean Square Fluctuations; Rg: Radius of gyration; WT: Wild type

ARTICLE HISTORY

Received 10 July 2019
Accepted 4 October 2019

Introduction

Infertility is defined as the inability to have a clinical pregnancy after 12 months or more of regular, unprotected sexual intercourse. It is estimated to affect between 8 and 12% of couples worldwide (Vander Borcht & Wyns, 2018). Male infertility is a typical example of a complex disease with a substantial genetic basis. Its etiology and pathogenic mechanism remain unknown in about 30% of cases. Until today, hundreds of candidate genes related to spermatogenesis have been identified in animals through the introduction of genetic targeting techniques that disrupt specific genes in animal models. Thus, several studies have shown that the Piwi-piRNA pathway is a critical new pathway for spermatogenesis.

The Piwi-piRNA pathway is a germline-specific RNA silencing mechanism. The central effector complex, pi-RNA-induced silencing complex (pi-RISC), result from the association of one of the Argonaute family proteins with a pi-RNA. The piRNA are the most recently discovered class of small non-coding RNA. Their longer size varies between 24 and 30 nucleotides and they are widely found throughout the animal kingdom, in human, mouse, rat, fish, worm and even in simpler animals, like sponges (*Amphimedon queenslandica*) and sea anemone (*Nematostella vectensis*), but not in fungi or plants.

The Piwi clade of Argonaute proteins is comprised of Piwi, Aubergine and protein argonaute-3 in flies and Mili, Miwi and Miwi2 in mice (Parhad & Theurkauf, 2019). In human, Piwi protein family consists of four members: PIWIL1-4. They are characterized by four distinct domains: The N-terminal, PAZ, MID and PIWI domains. The PAZ and MID domains are responsible for the piRNA load while the PIWI domain

resembles the RNase H, but the functional significance of the N-terminal domain still until today not clear.

The role of Piwi-piRNA pathway is to restrict transposon element activity and to defend the genome integrity. As known, the transposons are able to multiply within the genome by transposition to new sites, which causes deleterious effect to the organisms, leading to genomic structural rearrangements, such as deletions, duplications and inversions. However, the functional importance of this pathway was revealed with genetic studies, showing that PIWI proteins mutants lead to fertility defects in mouse, fish and flies (Parhad & Theurkauf, 2019). In addition, several case control studies of PIWI protein family variants have confirmed their associations with human male infertility in different populations.

The study of the impact of all nsSNP of PIWIL1 gene by *in vitro* and *in vivo* analyses is lengthy task and very expensive. However, computational approach can give better substitution for the same. Indeed, *in silico* methods are very useful to predict the pathogenicity of a variant based on the change of an amino acid (Agrahari, Sneha, George Priya Doss, Siva, & Zayed, 2018; Ali, Sneha, Priyadharshini Christy, Zayed, & George Priya Doss, 2017; George Priya Doss & Zayed, 2017; Srinivasan & Rajasekaran, 2018; Zaki et al., 2017). They can make fast predictions for a large set of compounds in a high-throughput mode, they have higher reproducibility if the same model is used and all of that without using an animal. In addition, *in silico* methods are less expensive in comparison to *in vitro* and *in vivo* approaches. Quite recently, various bioinformatic tools have been extensively used for predicting most deleterious nsSNPs among the reported polymorphisms and understanding its effect on protein structure, stability, flexibility and dimension

(Hassan, Shaalan, Dessouky, Abdelnaïem, & ElHefnawi, 2019). Thus, the aim of the present study is to identify the most pathogenic nsSNPs of *PIWIL1* gene by means of a number of computational predictions tools, and evaluate their impact on PAZ domain structure and function by using molecular dynamics simulations.

Materials and methods

Sequence and variant datasets retrieval

The Piwi-like protein 1 (*PIWIL1*) gene sequence and variants data were obtained from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) website (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and Ensembl genome browser 96 (<https://www.ensembl.org>) in June 2019. The FASTA sequence of *PIWIL1* protein was retrieved from the UNIPROT database (<http://www.uniprot.org/>) [Q96J94].

Identifying the most damaging variants

Eight different bioinformatics tools were used to predict functional effects of nsSNPs. These algorithmic programs included: SIFT, PolyPhen-2, Mutation Assessor, Mutation Taster, PROVEAN, Condel, LRT and Fathmm.

Conservation analysis

The conservation analysis was performed using the ConSurf web server (<http://consurf.tau.ac.il/>), which predict the functionally important regions of *PIWIL1* protein by estimating the degree of conservation of amino acid sites based on homology (Ashkenazy et al., 2016).

After carries out a search for close homologous sequences using HMMER homologue search algorithm. A multiple sequence alignment of the homologous sequences was obtained using MAFFT. Position-specific conservation scores were computed using the empirical Bayesian. The continuous conservation scores were divided into a discrete scale of nine grades for visualization, from the most variable positions (grade 1) colored Green, through intermediately conserved positions (grade 5) colored white, to the most conserved positions (grade 9) colored purple.

Human *PIWI*-like one PAZ domain structure

The three-dimensional (3D) solution structure of the human *PIWI*-like 1 (*PIWIL1*) PAZ domain in its free form [PDB ID: 2L5C] was determined using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy method by Zeng, Zhang, Yan, and Zhou (2011). The 3D variant structures were generated using Pymol software and the energy minimization for all 3D structures were done using the GROMACS program (Pronk et al., 2013).

Analysis of local structures changes between native and variants *PIWIL1* PAZ domain

The local three-dimensional structures difference between wild type PAZ domain (wt-PAZ) and the variants PAZ domain

were determined using YASARA software, which present the hydrogen bonds and hydrophobic interaction between the amino acid in question and the amino acids that surround them (Krieger & Vriend, 2014).

Molecular dynamics simulation

The molecular dynamics (MD) simulations of the wild type and variants PAZ domain were performed using GROMACS 5.1.4 software package with the force field CHARMM 27. The protein atoms were placed in a cubic box, and further periodic boundary conditions were optimized to perform the simulations. The system was solvated and neutralized by adding sufficient number of sodium and chloride ions. The energy minimization was conducted using steepest descent method for 5000 steps to provide a stable conformation. After minimization, Canonical Ensembles (NVT) was executed, with constant temperature of 300 K for 100 ps, followed by Isoobaric-Isothermal Ensembles (NPT), with constant temperature of 300 K and constant pressure of 1 atm for 100 ps. The production simulations were performed at 300 K for 50 ns. *gmx rms*, *gmx rmsf* and *gmx gyrate* commands were used to calculate the Root-mean-square deviation (RMSD), Root-mean-square fluctuation (RMSF) and Radius of gyration (Rg), respectively. All graphs were created using the QtGrace software.

Results and discussion

Genetic polymorphisms are localized in well-defined positions in the genome and are responsible for individual phenotypic characteristics. To understand human variation and molecular genetics, genetic polymorphisms can be used for definition of population structure, gene mapping, and performance of functional studies. In human genome, the single nucleotide polymorphisms (SNPs) are the most common kind of variation, and the nonsynonymous polymorphisms (nsSNPs) also called missense variants are highly significant as they are responsible for amino acid residue substitution resulting in functional diversity of proteins. Missense variants can have neutral or deleterious effect of protein structure and function. Damaging effects may include destabilization of protein structure, modification of gene regulation, changes in charge, hydrophobicity, geometry, dynamics, stability, translation, and protein interactions, hence the structural integrity of the cells. Thus, it can be said that nsSNPs could be linked to many human diseases. Indeed, Gou et al have screened for potential mutations in the D-box element of *PIWIL1* in a cohort of 413 patients with idiopathic azoospermia and 300 fertile controls. By sequencing the D-box region spanning the sixth and seventh exons of the *PIWIL1* gene, the authors identified several heterozygous mutations in three patients, including R218A/L221A (Patient 1), L221G/N225H (Patient 2), and L221R (Patient 3), but none in controls. By full-length sequencing, the authors confirmed that these mutations are the only changes that cause amino acid substitutions in the *PIWIL1* gene in these patients. By modeling such mutations in *Piwi* (*Miwi*) knocking mice, the authors demonstrate that the

Table 1. List of potential pathogenic nsSNPs *PIWIL1* predicted by different SNP prediction algorithms. D: Deleterious; PD: Probably Damaging; H: High.

Variant ID	Amino acids substitution	Frequency	SIFT	<i>In silico</i> prediction tools						
				PolyPhen	LRT	Mutation Assessor	Mutation Taster	PROVEAN	Fathmm	Condel
rs773984472	R146C	T = 0.00001 (1/121370, ExAC)	D (0)	PD (0.998)	D (0)	H (3.67)	D (1)	D (-7.22)	D (0.91)	D (0.919)
rs76993556	L150P	None	D (0)	PD (0.999)	D (0)	H (3.645)	D (1)	D (-6.23)	D (0.97)	D (0.935)
rs755410536	T194M	T = 0.00003 (4/121266, ExAC)	D (0)	PD (0.995)	D (0)	H (3.51)	D (1)	D (-4.53)	D (0.97)	D (0.902)
rs562410961	K272N	T = 0.00001 (1/120720, ExAC)	D (0)	PD (0.962)	D (0)	H (3.69)	D (0.99)	D (-4.79)	D (0.85)	D (0.850)
rs750030305	G305S	A = 0.00001 (1/105448, ExAC)	D (0)	PD (0.94)	D (0)	H (3.64)	D (1)	D (-5.75)	D (0.99)	D (0.830)
rs988078255	Y317C	G = 0.00004 (5/125568, TOPMED)	D (0)	PD (1)	D (0)	H (3.65)	D (1)	D (-8.3)	D (0.98)	D (0.945)
rs764617250	Y346C	G = 0.00001 (1/120298, ExAC)	D (0)	PD (0.999)	D (0)	H (3.625)	D (1)	D (-8.44)	D (0.97)	D (0.935)
rs997741809	S583R	C = 0.00001 (1/125568, TOPMED)	D (0)	PD (1)	D (0)	H (3.61)	D (1)	D (-4.65)	D (0.98)	D (0.945)
rs763611366	R701C	T = 0.00001 (1/121408, ExAC)	D (0)	PD (0.994)	D (0)	H (4.285)	D (1)	D (-7.31)	D (0.96)	D (0.897)
rs1042108826	Y731C	G = 0.00002 (2/125568, TOPMED)	D (0.04)	PD (0.979)	D (0)	H (3.695)	D (1)	D (-5.35)	D (0.99)	D (0.771)
rs777002892	V740M	A = 0.00001 (1/121376, ExAC)	D (0)	PD (0.999)	D (0)	H (4.18)	D (1)	D (-2.74)	D (0.99)	D (0.935)
rs746294024	V740G	G = 0.00001 (1/121380, ExAC)	D (0.01)	PD (0.995)	D (0)	H (4.18)	D (1)	D (-6.4)	D (0.99)	D (0.863)
rs1413780216	P761H	A = 0.000004 (1/251408, GnomAD)	D (0.02)	PD (0.998)	D (0)	H (3.685)	D (1)	D (-6.67)	D (0.99)	D (0.857)
rs1405478150	Y794C	G = 0.000004 (1/251416, GnomAD)	D (0)	PD (1)	D (0)	H (4.255)	D (1)	D (-8.03)	D (0.98)	D (0.945)
rs1352248047	R827C	T = 0.00001 (1/125568, TOPMED)	D (0)	PD (1)	D (0)	H (3.83)	D (1)	D (-6.09)	D (0.84)	D (0.945)
rs752935018	R827H	A = 0.00001 (1/121406, ExAC)	D (0)	PD (1)	D (0)	H (3.83)	D (1)	D (-3.86)	D (0.96)	D (0.945)
rs745487305	A835T	T = 0.00001 (1/121408, ExAC)	D (0)	PD (1)	D (0)	H (3.93)	D (1)	D (-3.38)	D (0.98)	D (0.945)
rs779383303	V842L	A = 0.00004 (5/125568, TOPMED)	D (0)	PD (0.999)	D (0)	H (3.755)	D (1)	D (-2.58)	D (0.98)	D (0.935)

genetic defects are directly responsible for male infertility (Gou et al., 2017). This approach may not be practical to study the impact of all nsSNP on protein structure and function because it requires a lot of time and is very expensive. However, *in silico* analysis has now allowed us to identify the most deleterious nsSNPs in the candidate genes. In addition, this powerful method had the best correlation with experimental studies. Thus, the aims of the present study are to identify the most deleterious nsSNP in *PIWIL1* gene and evaluate their impact on protein stability, flexibility and dimension.

PIWIL1 is an 861 amino acid protein coded by the *PIWIL1* gene, which is located on chromosome 12q24.33. It's mainly expressed in germline cells and play an important role in piRNA biogenesis and function. In addition, it has been suggested that SNP in *PIWI* genes are associated with the risk of male infertility in different ethnic groups. After using dbSNP database to retrieve SNPs of interest, a total of 406 nonsynonymous polymorphism (nsSNP) were identified in the *PIWIL1* gene (ENST00000245255.7) among 9323 SNP in a total. We subjected all nsSNPs to eight different *in silico* nsSNP prediction algorithms to investigate whether these SNPs have any effect on *PIWIL1* protein structure or function. *In silico* tools used for this purpose were: SIFT, PolyPhen-2, Mutation Assessor, Mutation Taster, PROVEAN, Condel, LRT and Fathmm. Of the 406 nsSNPs in the *PIWIL1* gene, 18 nsSNPs were predicted to be deleterious by all bioinformatics tools used (Table 1), with 4 nsSNPs (R146C, L150P, T194M, K272N) were present in N-terminal domain, 3 nsSNPs (G305S, Y317C, Y346C) in PAZ domain, 1 nsSNP (S583R) in MID domain and 10 nsSNPs (R701C, Y731C, V740M, V740G, P761H, Y794C, R827C, R827H, A835T, V842L) were present in *PIWI* domain (Figure 1).

Conservation profile of deleterious nsSNPs

Evolutionary information is essential to recognize variations, which might affect human health. The ConSurf server is a bioinformatics tool for estimating the evolutionary conservation of amino acid positions in a protein (Ashkenazy et al.,

2016). Evolutionary rate is estimated based on the evolutionary relatedness between the protein and its homologues and considering the similarity between amino acids as reflected in the substitutions matrix. One of the advantages of ConSurf is the accurate computation of the evolutionary rate by using the empirical Bayesian method. Using this server, we analyzed the degree of conservations of *PIWIL1* residues and we identified R146, K272, G305, S583, R701 and R827 residues as highly conserved and exposed, Y317, Y346, V740 and A835 residues as highly conserved and buried, while T194, Y731, and P761 residues are exposed and L150, Y794, and V842 residues are buried (Figure 2). The results further confirmed that R146C, K272N, G305S, Y317C, Y346C, S583R, R701C, V740M, V740G, R827H, and A835T variants as being deleterious to the structure and/or function of *PIWIL1* protein.

Local structure change

PIWIL1 protein has a molecular weight of about 98 kDa and is defined by three protein motifs: the PAZ, the MID and the *PIWI* domains. The PAZ domain is accountable for binding the 3'-end of the guide strand RNA, the middle MID domain is responsible for binding the 5'-phosphate RNA; and the following C-terminal *PIWI* domain has an RNase H endonuclease fold that is responsible for the RNA cleavage (Zeng et al., 2011). The whole three-dimensional structure of Human *PIWIL1* protein remains until today not determined, except for its PAZ domain which was determined on its free form by Zeng et al. (2011). Using this three-dimensional structure of PAZ domain, we compared the local structure change of wild type and variants PAZ domain (G305S, Y317C, Y346C) with YASARA software. As results for the G305S variant (Figure 3), we found that the Glycine at position 305 has one hydrogen bond with Valine at position 319. When replaced by Serine, the hydrogen bond is lost.

The PAZ domain contains a cage formed by a positively charged Lys315, hydrophobic Ala380, Leu382 and aromatic Tyr312, Tyr317, Tyr346, and Tyr350 residues in order to

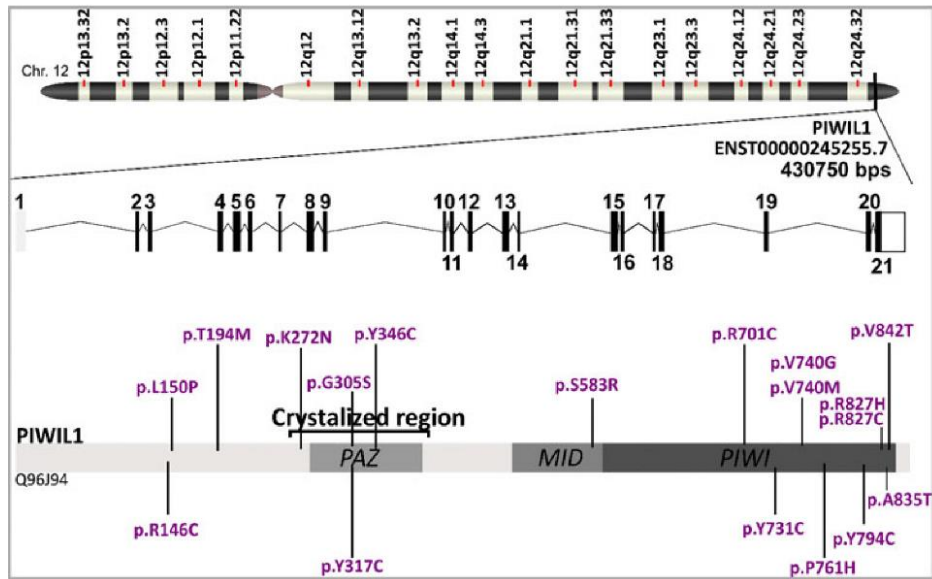


Figure 1. An illustration of the PIWIL1 gene location, gene structure and deleterious nsSNPs location in 2D protein structure.

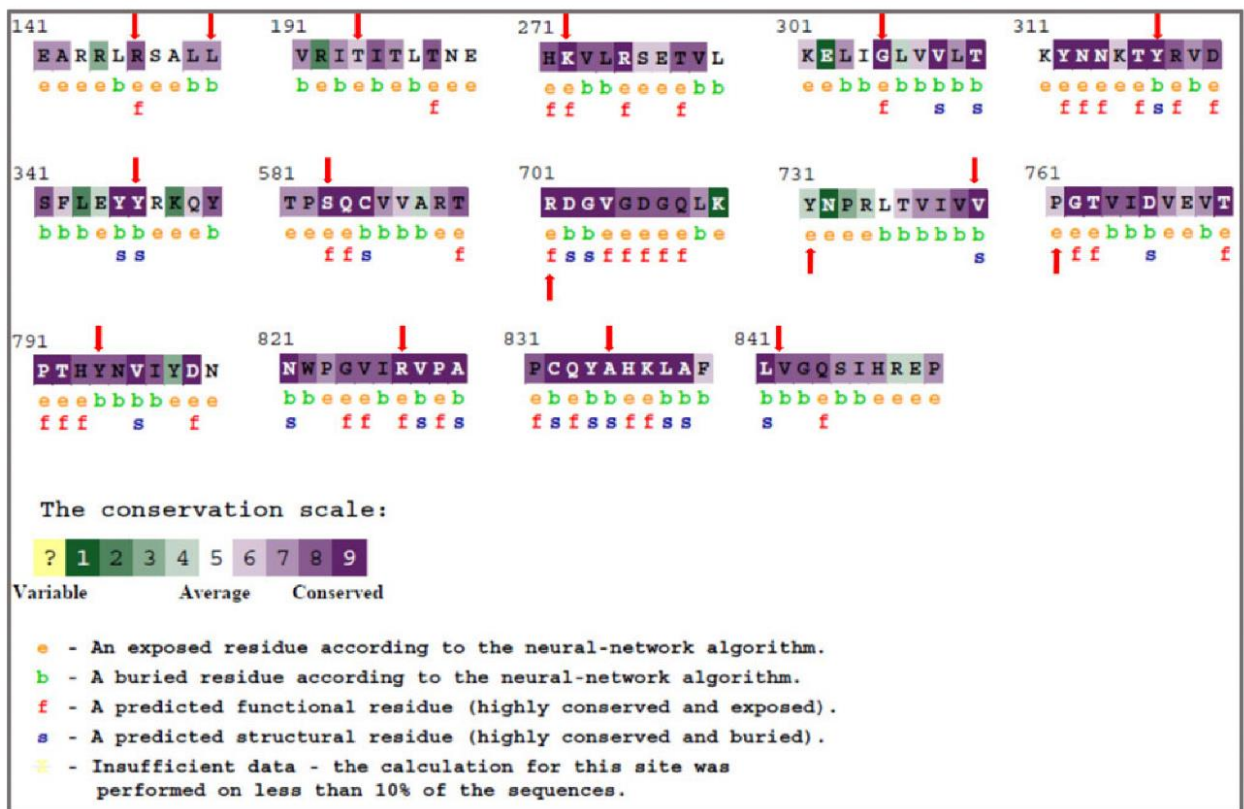


Figure 2. ConSurf profile of PIWIL1 gene. Value one indicates a high variability region. The value increases as the region becomes more conserved, up to value 9. Red arrows mark the position values of the 15 residues of interest.

bound the 3'-end of the RNA (Zeng et al., 2011). The substitution of one of these residues may change the cage conformation and impact the binding process of the 3'-end of the RNA. Indeed, the Tyrosine at position 317 has three hydrogen bonds (two with Valine at position 308 and one with Lysine at position 315) and six hydrophobic interactions (two with Alanine at position 380 and four with Threonine,

Lysine, Proline, Leucine at positions 310, 315, 366, and 386, respectively). When Cysteine took Tyrosine position, all interactions were lost except the hydrogen bonds with Valine at position 308. In addition, the Tyrosine at position 346 has two hydrogen bonds, with Tyrosine and Glutamine at position 350 and 352 respectively, and three hydrophobic interactions with tyrosine at position 245, tyrosine at position 312

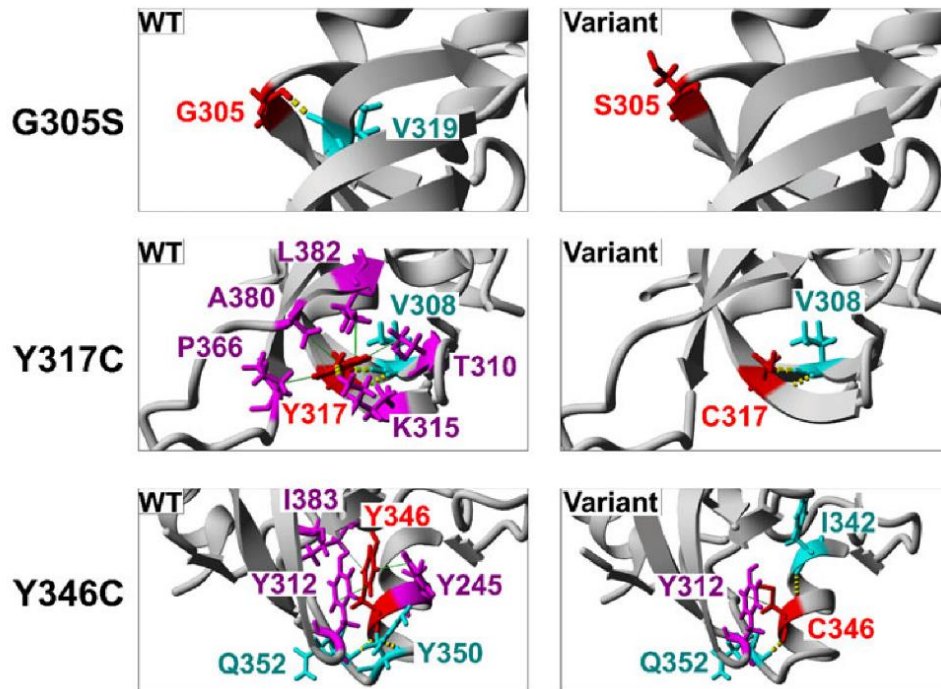


Figure 3. Structural model of wild type and variants PAZ domain of PIWIL1. Residues substituted are marked in red, residues participate in hydrogen bonds are shown in cyan, residues involved in hydrophobic interactions are indicated in magenta, hydrogen bonding.

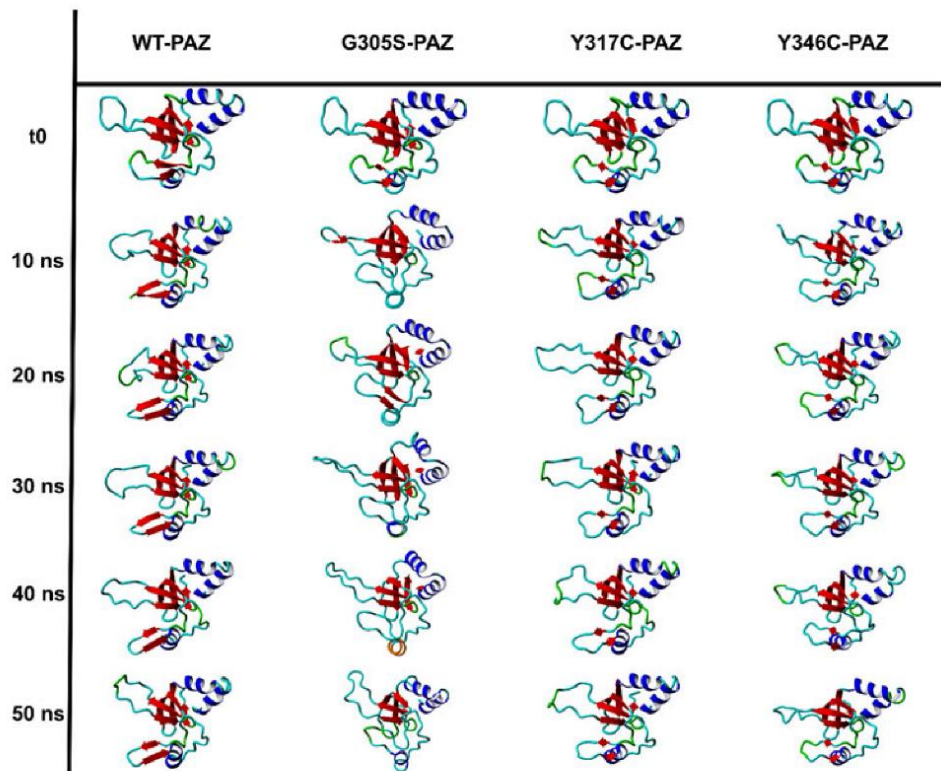


Figure 4. Snapshots of wild type and variants PAZ domain conformation at different simulation time steps.

and Isoleucine at position 383. When substituted with Cysteine, one hydrogen bond with Tyrosine at position 350, two hydrophobic interaction with Tyrosine and Isoleucine at position 245 and 383 respectively were lost and one hydrogen bond with Isoleucine at position 342 was gained.

These results show that the two variants Y317C and Y346C which have a strategic position in the PAZ domain have a negative impact on PAZ domain structure and consequently on the binding cage conformation with the 3' end of the RNA.

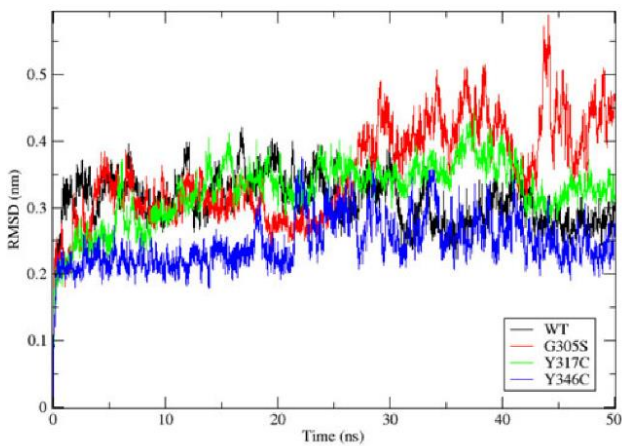


Figure 5. Backbone Root Mean Square Deviation (RMSD) of wild type and variants PAZ domain of PIWIL1.

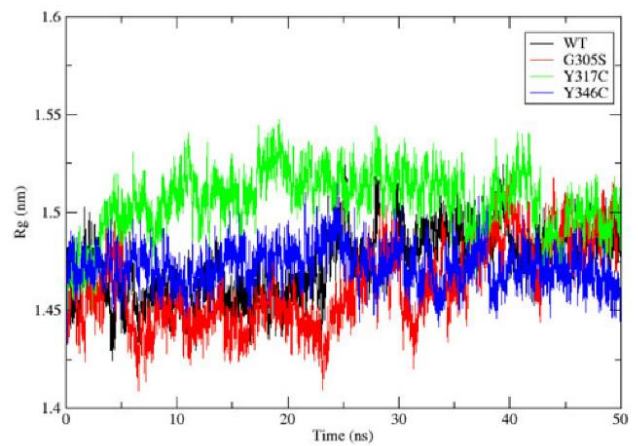


Figure 7. Radius of gyration (Rg) for wild type and variants PAZ domain of PIWIL1.

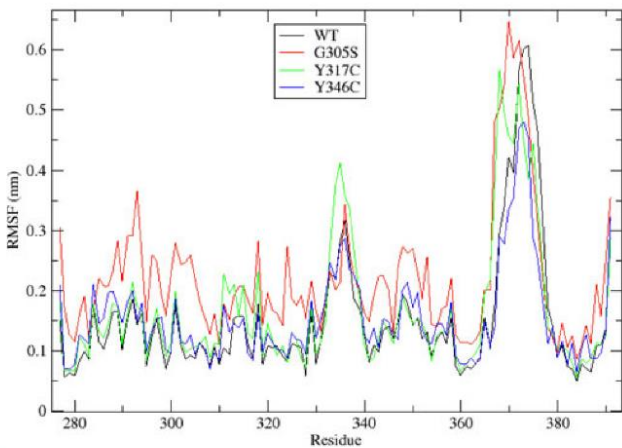


Figure 6. Root Mean Square Fluctuations (RMSF) of wild type and variants PAZ domain of PIWIL1.

Molecular dynamics simulation

To further analyze the impact of pathogenic nsSNP on protein stability, flexibility, and dimension, we performed molecular dynamic simulation for wild type and variants PIWIL1 PAZ domain using GROMACS 5.1.4 software to analyze RMSD (Stability), RMSF (Flexibility), and Rg (Dimension) parameters. However, after structural comparison between wild type and variants PAZ at different time scales, it was clearly observed that all variant PAZ had the same structure in beginning (t0) but during dynamic simulation, all variant PAZ structure had change comparing to the wild type PAZ structure (Figure 4).

Structural stability

The protein stability is an important property that must be considered when studying protein function. According to some studies, the alteration of protein stability can increase its degradation, misfolding and aggregation. Root mean square deviation (RMSD) is used to measure the difference between the protein backbones from its initial structural conformation to its final position (Aier, Varadwaj, & Raj, 2016). The protein stability relative to its conformation can be observed during its simulation. The protein is considered

stable when the deviations are very low and unstable when deviations are very high.

At the beginning of the dynamic simulations, the RMSD of the WT-PAZ domain increased from ~0 nm to ~0.34 nm and stabilized between 0.22 and 0.41 nm for all the simulation. However, each structure variant of PAZ domain showed a unique RMSD trajectory (Figure 5). Indeed, for G305S variant PAZ, the RMSD values increased for the first 5 ns from ~0 to ~0.38 nm and stabilized over the next 20 ns, after that, the RMSD values increased significantly compared to wt-PAZ. Concerning Y317C variant PAZ, the RMSD values increased for the first 5 ns from 0 to 0.27 nm, then, it stabilized between ~0.27 and ~0.41 nm for the next 25 ns, after that it increased and varied between ~0.27 and ~0.45 nm.

Regarding Y346C variant PAZ, the RMSD values were significantly lower compared to the native structure. In fact, it varied between ~0 and ~0.25 nm for the first 20 ns, after that it increased slightly and varied between ~0.19 and ~0.39 nm for the next 30 ns.

The results showed that G305S and Y317C variants decrease the stability of PAZ domain, whereas, Y346C variant increase the stability of PAZ domain.

Amino acid flexibility

The RMSF analysis had been used as a tool in order to describe local flexibility differences among residues throughout the MD simulation. However, the wt-PIWIL1 protein showed generally a lower flexibility degree when compared to the variants (Figure 6). The G305S PAZ variant showed a higher flexibility degree compared to the native structure followed by Y317C and Y346C PAZ variants. These results confirmed that all these variants affect the flexibility of PAZ domain. This general tendency of flexibility gain in variants may affect protein function, especially regarding the ability of PIWIL1 protein to form RISC complex.

Structural compactness

The radius of gyration analysis (Rg) was used to evaluate the level of compaction of each molecule and the overall

dimensions of the structure. Thus, we determined that WT-PAZ structure dimension varies between 1.42 and 1.52 nm, G305S-PAZ structure dimension varies between 1.40 and 1.51 nm, Y317C-PAZ structure dimension varies between 1.44 and 1.54 nm, and Y346C-PAZ structure dimension varies between 1.44 and 1.51 nm (Figure 7). The results showed that Y317C variant increase significantly the overall dimension of PAZ domain, whereas, the G305S and Y346C variants increase compaction level of PAZ domain.

Summing up the results, after using different bioinformatic tools, we identified 18 nsSNP of the *PIWIL1* gene predicted as deleterious. These nsSNPs affect different domains of *PIWIL1* protein, with 4 nsSNPs in N-terminal domain, 3 nsSNPs in PAZ domain, 1 nsSNP in MID domain and 10 nsSNPs in PIWI domain. Conservation analysis determined 11 nsSNPs out of 18 affect highly conserved amino acids. The comparison of three-dimensional structure change between native and variants PAZ domain confirmed the impact of these variants on the PAZ domain structure. Moreover, the molecular dynamics simulation demonstrated that all variants located in PAZ domain affect their stability, flexibility and dimension.

Conclusion

This study suggests that *PIWIL1* Proteins structure and function can be affected by non-synonymous single nucleotide polymorphisms (nsSNP) which is located in the exon regions. These variants are generally rare, but they have a considerable effect on the protein. The identification of these variants and the study of their pathogenicity are now necessary to determine their associations with spermatogenesis impairment. Thus, we identified 18 non-synonymous single nucleotide polymorphisms as damaging SNPs. The presence of these deleterious variants might alter the PIWI-piRNA pathway, which is essential to restrict transposal element activity and to defend the germline genome integrity.

Acknowledgements

We acknowledge and greatly appreciate the excellent technical assistance of all the staff at the Genomics and Human Genetics laboratory.

Disclosure statement

The authors declare that they have no competing interest.

References

- Agrahari, A. K., Sneha, P., George Priya Doss, C., Siva, R., & Zayed, H. (2018). A profound computational study to prioritize the disease-causing mutations in PRPS1 gene. *Metabolic Brain Disease*, 33(2), 589–600. doi:10.1007/s11011-017-0121-2
- Aier, I., Varadwaj, P. K., & Raj, U. (2016). Structural insights into conformational stability of both wild-type and mutant EZH2 receptor. *Scientific Reports*, 6, 34984. doi:10.1038/srep34984
- Ali, S. K., Sneha, P., Priyadharshini Christy, J., Zayed, H., & George Priya Doss, C. (2017). Molecular dynamics-based analyses of the structural instability and secondary structure of the fibrinogen gamma chain protein with the D356V mutation. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 35(12), 2714–2724. doi:10.1080/07391102.2016.1229634
- Ashkenazy, H., Abadi, S., Martz, E., Chay, O., Mayrose, I., Pupko, T., & Ben-Tal, N. (2016). ConSurf 2016: An improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W344–W350. doi:10.1093/nar/gkw408
- George Priya Doss, C., & Zayed, H. (2017). Comparative computational assessment of the pathogenicity of mutations in the Aspartoacylase enzyme. *Metabolic Brain Disease*, 32(6), 2105–2118. doi:10.1007/s11011-017-0090-5
- Gou, L.-T., Kang, J.-Y., Dai, P., Wang, X., Li, F., Zhao, S., ... Liu, M.-F. (2017). Ubiquitination-deficient mutations in human Piwi cause male infertility by impairing histone-to-protamine exchange during spermiogenesis. *Cell*, 169(6), 1090–1104.e13. doi:10.1016/j.cell.2017.04.034
- Hassan, M. S., Shaalan, A. A., Dessouky, M. I., Abdelnaïem, A. E., & ElHefnawi, M. (2019). A review study: Computational techniques for expecting the impact of non-synonymous single nucleotide variants in human diseases. *Gene*, 680, 20–33. doi:10.1016/j.gene.2018.09.028
- Krieger, E., & Vriend, G. (2014). YASARA View—Molecular graphics for all devices—From smartphones to workstations. *Bioinformatics*, 30(20), 2981–2982. doi:10.1093/bioinformatics/btu426
- Parhad, S. S., & Theurkauf, W. E. (2019). Rapid evolution and conserved function of the piRNA pathway. *Open Biology*, 9(1), 180181. doi:10.1098/rsob.180181
- Pronk, S., Páll, S., Schulz, R., Larsson, P., Bjelkmar, P., Apostolov, R., ... Lindahl, E. (2013). GROMACS 4.5: A high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics*, 29(7), 845–854. doi:10.1093/bioinformatics/btt055
- Srinivasan, E., & Rajasekaran, R. (2018). Deciphering the loss of metal binding due to mutation D83G of human SOD1 protein causing FALS disease. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107(Pt A), 521–529. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.09.019
- Vander Borgh, M., & Wyns, C. (2018). Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical Biochemistry*, 62, 2–10. doi:10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012
- Zaki, O. K., Priya Doss, C. G., Ali, S. A., Murad, G. G., Elashi, S. A., Ebnou, M. S. A., ... Zayed, H. (2017). Genotype-phenotype correlation in patients with isovaleric acidemia: Comparative structural modelling and computational analysis of novel variants. *Human Molecular Genetics*, 26(16), 3105–3115. doi:10.1093/hmg/ddx195
- Zeng, L., Zhang, Q., Yan, K., & Zhou, M.-M. (2011). Structural insights into piRNA recognition by the human PIWI-like 1 PAZ domain. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 79(6), 2004–2009. doi:10.1002/prot.23003

3. Résultats et Discussion

Les polymorphismes génétiques sont localisés dans des positions bien définies dans le génome et sont responsables des caractéristiques phénotypiques individuelles. Pour comprendre la diversité humaine et la génétique moléculaire, les polymorphismes génétiques peuvent être utilisés pour la définition de la structure de la population, la cartographie des gènes et la réalisation des études fonctionnelles. Dans le génome humain, les polymorphismes mononucléotidiques (SNP) sont le type de variant le plus courant, et les polymorphismes non synonymes (nsSNP), également appelés variants faux-sens, sont hautement significatifs car ils sont responsables de la substitution des acides aminés, ce qui entraîne la diversité fonctionnelle des protéines. Les variants faux-sens peuvent avoir un effet neutre ou délétère sur la structure et la fonction des protéines. En effet, Gou et al. ont recherché des variants faux sens dans l'élément D-box de la protéine *PIWIL1* dans une cohorte de 413 patients atteints d'azoospermie idiopathique et de 300 témoins fertiles [Gou et al., 2017]. En séquençant l'exon 6 et 7 du gène *PIWIL1*, Gou et al. ont identifié plusieurs variants hétérozygotes chez trois patients, mais aucun variant n'a été identifié dans les témoins. Après séquençage de tous les exons du gène *PIWIL1* de ces patients, les auteurs ont confirmé que ces variants sont les seuls qui entraînent des substitutions d'acides aminés de la protéine *PIWIL1*. En modélisant de tels variants chez des souris, les auteurs ont conclu que des mutations génétiques au niveau des gènes *PIWI* sont directement responsables de l'infertilité masculine [Gou et al., 2017]. Cette approche n'est peut-être pas faisable pour étudier l'impact de tous les nsSNP sur la structure et la fonction des protéines. Cependant, l'analyse *in silico* nous a maintenant permis d'identifier les nsSNP les plus délétères dans plusieurs gènes candidats. De plus, cette puissante méthode présente une meilleure corrélation avec les études expérimentales [Benz et al., 2005; Asamitsu et al., 2015; Sudhakar et al., 2016].

PIWIL1 est une protéine de 861 acides aminés codée par le gène *PIWIL1*, situé sur le chromosome 12q24.33. Elle est exprimée principalement dans les cellules germinales et joue un rôle important dans la biogenèse et la fonction des piARN. En outre, il a été suggéré que les variants au niveau des gènes *PIWI* sont associés à l'infertilité masculine dans différents groupes ethniques [Muñoz et al., 2014, 4; Kamaliyan et al., 2018].

En utilisant la base de données dbSNP, nous avons trouvé que 9323 variants ont été rapportés à ce jour au niveau du gène *PIWIL1* (ENST00000245255.7), dont 406 variants sont des nsSNP. Nous avons utilisé huit algorithmes de prédiction *in silico* (SIFT, PolyPhen-2, Mutation Assessor, Mutation Taster, PROVEAN, Condel, LRT et Fathmm) afin de déterminer si ces nsSNP ont un effet délétère sur la structure ou la fonction de la protéine *PIWIL1*. Ainsi, nous avons trouvé que 18 nsSNP ont été prédits comme délétère par tous les algorithmes de prédiction utilisés, avec quatre

nsSNP (R146C, L150P, T194M, K272N) localisé dans la région qui code pour le domaine N-terminal, trois nsSNP (G305, Y317C, Y346C) localisé dans la région qui code pour le domaine PAZ, un nsSNP (S583R) localisé dans la région qui code pour le domaine MID et 10 nsSNP (R701C, Y731C, V740M, V740G, P761H, Y794C, R827C, R827H, R827H, A835T, V842) localisé dans la région qui code pour le domaine PIWI.

L'analyse de conservation des acides aminés est très essentielle pour identifier les variants susceptible d'affecter la santé humaine. Le serveur ConSurf est un très bon outil bio-informatique qui est capable d'estimer le niveau de conservation des acides aminés dans une protéine [Glaser et al., 2003; Landau et al., 2005; Ashkenazy et al., 2016; Celniker et al., 2013; Ashkenazy et al., 2016]. En utilisant ce serveur, nous avons analysé le degré de conservation des acides aminés de la protéine PIWIL1 et nous avons identifié que les résidus R146, K272, G305, S583, R701 et R827 sont hautement conservés et situés à la surface de la protéine, les résidus Y317, Y346, V740 et A835 sont hautement conservés et situés à l'intérieur de la protéine, tandis que les résidus T194, Y731 et P761 sont situés à la surface de la protéine et les résidus L150, Y794 et V842 sont situés à l'intérieur de la protéine. En se basant sur ces résultats, on a pu affirmer que les variants R146C, K272N, G305S, Y317C, Y346C, S583R, R701C, V740M, V740G, R827H et A835T touchent des résidus hautement conservés ce qui pourrait affecter le bon fonctionnement de la protéine PIWIL1.

La protéine PIWIL1 a un poids moléculaire d'environ 98 kDa et est définie par quatre domaines : le domaine N-terminal, le domaine PAZ, le domaine MID et le domaine PIWI. Le domaine PAZ est responsable de la liaison de l'extrémité 3' de l'ARN du brin guide, le domaine MID est responsable de la liaison de l'extrémité 5' de l'ARN et le domaine PIWI possède une activité RNase H qui est responsable du clivage de l'ARN [Zeng et al., 2011]. À ce jour, la protéine PIWIL1 n'est pas encore cristallisée, à l'exception du domaine PAZ, qui a été déterminé sous sa forme libre [Zeng et al., 2011]. En utilisant le logiciel YASARA, nous avons comparé le changement local de la structure du domaine PAZ induit par les variants G305S, Y317C, Y346C. Ainsi, nous avons constaté que, pour le variant G305S, la glycine en position 305 fait une liaison hydrogène avec la valine en position 319. Mais, lorsqu'elle est remplacée par la sérine, cette liaison hydrogène est perdue.

Zeng et al. ont identifié une cage au niveau du domaine PAZ qui est responsable à la liaison de l'extrémité 3' de l'ARN. Cette cage est formée par les acides aminés aromatiques Lys315, Ala380, Leu382 et Tyr312, Tyr317, Tyr346 et Tyr350 [Zeng et al., 2011]. La substitution de l'un de ces résidus peut modifier la conformation de la cage et affecter le processus de liaison de l'extrémité 3' de l'ARN. En effet, nous avons trouvé que les deux variants Y317C et Y346C, qui occupent une

position stratégique dans le domaine PAZ, ont un impact négatif sur la structure du domaine PAZ et par conséquent sur la conformation de la cage de liaison avec l'extrémité 3' de l'ARN.

Pour analyser plus en détail l'impact des nsSNP pathogènes sur la stabilité, la flexibilité et la dimension du domaine PAZ, nous avons effectué une simulation de la dynamique moléculaire à l'aide du logiciel GROMACS 5.1.4. Ce dernier nous a permis d'analyser et de comparer les paramètres RMSD, RMSF et Rg entre la structure native du domaine PAZ et sa structure mutée. Ainsi, on a pu constater qu'au début de la simulation (t_0), la structure native et les trois structures mutées ayant la sérine en position 305 (G305S-PAZ), la cystéine en position 317 (Y317C-PAZ) et la cystéine en position 346 (Y346C-PAZ) avaient toutes la même structure. Mais lors de la simulation, toutes les structures mutées ont changé de conformation. En effet, nous avons trouvé que le variant G305S diminue la stabilité du domaine PAZ, augmente la flexibilité de ses acides aminés et diminue sa dimension globale. En revanche, le variant Y317C diminue la stabilité du domaine PAZ, augmente la flexibilité de ses acides aminés et augmente sa dimension globale. En ce qui concerne le variant Y346C, il augmente la stabilité du domaine PAZ, la flexibilité de ses acides aminés et diminue sa dimension globale.

4. Conclusion

Cette étude suggère que la structure et la fonction de la protéine *PIWIL1* peuvent être affectées par des polymorphismes nucléotidiques non synonymes (nsSNP) situés dans les régions exoniques du gène. Ces variants sont généralement rares mais ils ont un effet considérable sur la protéine. L'identification de ces variants et l'étude de leur pouvoir pathogène sont maintenant nécessaires pour déterminer leurs associations avec l'altération de la spermatogenèse. Ainsi, nous avons identifié 18 nsSNP comme délétères par huit logiciels de prédiction dont 11 nsSNP affectent des acides aminés hautement conservés. La présence de ces variants peut affecter la voie de répression des éléments transposables, et par conséquent, affecter l'intégrité du génome de la lignée germinale.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La présente étude consiste à déterminer, d'abord, la nature et la fréquence des anomalies chromosomiques chez les couples qui ont subi plusieurs fausses couches spontanées à répétition. Ensuite, de déterminer la nature et la fréquence des anomalies chromosomiques chez les patients présentant une ambiguïté génitale, une aménorrhée, et un phénotype de Turner. Après, d'identifier un nouveau gène et/ou mutation génétique impliquée dans les anomalies de développement sexuel. Et enfin, d'identifier les variants les plus délétères du gène *PIWIL1* et de déterminer leurs impacts sur la structure, la stabilité, la flexibilité et la dimension du domaine PAZ.

De manière intéressante, nous avons déterminé que la fréquence des anomalies chromosomiques chez les couples Marocains présentant des FCSR est de 11%. Ces anomalies chromosomiques sont distribuées comme suit : 4,30% des couples avec une inversion, 2,71% des couples avec une translocation réciproque, 1,43% des couples avec une translocation robertsonienne, 1,27% des couples avec un variant polymorphique, 0,64% des couples avec un caryotype en mosaïque, 0,60% des couples avec d'autres types d'anomalies chromosomiques

En regroupant les résultats de tous les pays qui ont suivi la même méthode, nous avons identifié que la fréquence mondiale est de l'ordre de 5,16%, avec 2,50% des translocations réciproques, 0,83% des translocations robertsoniennes, 0,77% des inversions, 0,99% d'autres types d'anomalies chromosomiques

Dans un deuxième temps, nous avons identifié que 7,13% des patients marocains présentant une ambiguïté génitale ont une anomalie chromosomique, 17,39% des patients ayant une aménorrhée ont une anomalie chromosomique, 23,20% des patients présentant un phénotype de Turner ont une anomalie chromosomique

L'analyse de l'exome de 3 patients atteints d'une anomalie de développement sexuel a révélé la présence d'une nouvelle mutation du gène *HSD3B2* chez un patient avec un hypospadias périnéal et un taux élevé de 17α -Hydroxyprogestérone, déhydroépiandrostérone, AMH, testostérone, rénine et de l'androstènedione. Le caryotype sanguin du patient a révélé un caryotype masculin et l'analyse du gène *SRY* par PCR simplex a classé le patient dans la catégorie des 46,XY *SRY*-positive. En effet, la protéine 3β -HSD de type 2 catalyse la réaction de conversion des stéroïdes $\Delta 5$ en $\Delta 4$ et un déficit au niveau de cette protéine peut se traduire par des organes génitaux externes atypiques. Cependant, dans l'avenir, il sera très intéressant d'étudier l'impact de cette mutation sur la fonction de la protéine.

L'étude *in silico* des polymorphismes du gène *PIWIL1* a permis d'identifier 18 nsSNP comme délétères par huit logiciels de prédiction, dont 11 nsSNP affectaient des acides aminés hautement

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

conservés. L'impact des variants localisés dans la région qui code pour le domaine PAZ sur la stabilité, la flexibilité et la dimension de ce dernier a révélé que le variant G305S diminue la stabilité du domaine PAZ, augmente la flexibilité de ses acides aminés et diminue sa dimension globale. Le variant Y317C diminue la stabilité du domaine PAZ, augmente la flexibilité de ses acides aminés et augmente sa dimension globale. Et le variant Y346C, augmente la stabilité du domaine PAZ, la flexibilité de ses acides aminés et diminue sa dimension globale. Il sera très intéressant d'étudier dans l'avenir, l'association de ces variants avec l'infertilité masculine et féminine et de prendre en considération cet impact pathogène lors de l'analyse des données de l'exome ou du génome des patients.

RÉFÉRENCES

- AbdulAzeez S, Borgio JF. 2016. In-Silico Computing of the Most Deleterious nsSNPs in HBA1 Gene. PLOS ONE 11: e0147702.
- Achermann JC, Hughes IA. 2016. Chapter 23 - Pediatric Disorders of Sex Development. In: Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg HM, editors. Williams Textbook of Endocrinology (Thirteenth Edition). Philadelphia: Content Repository Only!, p 893–963.
- Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. 2013. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. Curr. Protoc. Hum. Genet. Chapter 7: Unit7.20.
- Agrahari AK, Sneha P, George Priya Doss C, Siva R, Zayed H. 2018. A profound computational study to prioritize the disease-causing mutations in PRPS1 gene. Metab. Brain Dis. 33: 589–600.
- Ahmed SF, Bashamboo A, Lucas-Herald A, McElreavey K. 2013. Understanding the genetic aetiology in patients with XY DSD. Br. Med. Bull. 106: 67–89.
- Al-Alawi I, Goud TM, Al-Harasi S, Rajab A. 2016. Cytogenetic studies of 1232 patients with different sexual development abnormalities from the Sultanate of Oman. Reprod. Biomed. Online 32: 162–169.
- AlAsiri S, Basit S, Wood-Trageser MA, Yatsenko SA, Jeffries EP, Surti U, Ketterer DM, Afzal S, Ramzan K, Faiyaz-Ul Haque M, Jiang H, Trakselis MA, Rajkovic A. 2015. Exome sequencing reveals MCM8 mutation underlies ovarian failure and chromosomal instability. J. Clin. Invest. 125: 258–262.
- Al-Hussain M, Al-Nuaim L, Abu ZT, Zaki OK. 2000. Cytogenetic study in cases with recurrent abortion in Saudi Arabia. Ann. Saudi Med. 20: 233–236.
- Ali SK, Sneha P, Priyadharshini Christy J, Zayed H, George Priya Doss C. 2017. Molecular dynamics-based analyses of the structural instability and secondary structure of the fibrinogen gamma chain protein with the D356V mutation. J. Biomol. Struct. Dyn. 35: 2714–2724.
- Amiel A, Sardos-Albertini F, Fejgin MD, Sharony R, Diukman R, Bartoov B. 2001. Interchromosomal effect leading to an increase in aneuploidy in sperm nuclei in a man heterozygous for pericentric inversion (inv 9) and C-heterochromatin. J. Hum. Genet. 46: 245–250.
- Anglani F, Baccichetti C, Artifoni L, Lenzini E, Tenconi R. 1984. Frequency of abnormal karyotypes in relation to the ascertainment method in females referred for suspected sex chromosome abnormality. Clin. Genet. 25: 242–247.
- Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S, Lagos-Quintana M, Landgraf P, Iovino N, Morris P, Brownstein MJ, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Chien M, Russo JJ, Ju J, Sheridan R, Sander C, Zavolan M, Tuschl T. 2006. A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. Nature 442: 203–207.
- Arboleda VA, Quigley CA, Vilain E. 2016. Chapter 118 - Genetic Basis of Gonadal and Genital Development. In: Jameson JL, De Groot LJ, de Kretser DM, Giudice LC, Grossman AB, Melmed S, Potts JT, Weir GC, editors. Endocrinology: Adult and Pediatric (Seventh Edition). Philadelphia: W.B. Saunders, p 2051-2085.e7.
- Arshad M, Bhatti A, John P. 2018. Identification and in silico analysis of functional SNPs of human TAGAP protein: A comprehensive study. PLOS ONE 13: e0188143.
- Asamitsu K, Hirokawa T, Hibi Y, Okamoto T. 2015. Molecular dynamics simulation and experimental verification of the interaction between cyclin T1 and HIV-1 Tat proteins. PloS One 10: e0119451.
- Ashkenazy H, Abadi S, Martz E, Chay O, Mayrose I, Pupko T, Ben-Tal N. 2016. ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. Nucleic Acids Res. 44: W344–W350.
- Auchus RJ, Miller WL. 2012. Defects in androgen biosynthesis causing 46,XY disorders of sexual development. Semin. Reprod. Med. 30: 417–426.

RÉFÉRENCES

- Ayatollahi H, Safaei A, Vasei M. 2010. Cytogenetic Analysis of Patients with Primary Amenorrhea in Southwest of Iran. *Iran. J. Pathol.* 5: 121–126.
- Ayers KL, Cutting AD, Roeszler KN, Sinclair AH, Smith CA. 2015. DMRT1 is required for Müllerian duct formation in the chicken embryo. *Dev. Biol.* 400: 224–236.
- Baillie HS, Pacey AA, Warren MA, Scudamore IW, Barratt CL. 1997. Greater numbers of human spermatozoa associate with endosalpingeal cells derived from the isthmus compared with those from the ampulla. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 12: 1985–1992.
- Baker J, Hardy MP, Zhou J, Bondy C, Lupu F, Bellvé AR, Efstratiadis A. 1996. Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 10: 903–918.
- Baker TG. 1963. A QUANTITATIVE AND CYTOLOGICAL STUDY OF GERM CELLS IN HUMAN OVARIES. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 158: 417–433.
- Balkan M, Akbas H, Isi H, Oral D, Turkyilmaz A, Kalkanli S, Simsek S, Fidanboy M, Alp MN, Gedik A, Budak T. 2010. Cytogenetic analysis of 4216 patients referred for suspected chromosomal abnormalities in Southeast Turkey. *Genet. Mol. Res. GMR* 9: 1094–1103.
- Baquedano MS, Guercio G, Costanzo M, Marino R, Rivarola MA, Belgorosky A. 2018. Mutation of HSD3B2 Gene and Fate of Dehydroepiandrosterone. *Vitam. Horm.* 108: 75–123.
- Barlow C, Liyanage M, Moens PB, Tarsounas M, Nagashima K, Brown K, Rottinghaus S, Jackson SP, Tagle D, Ried T, Wynshaw-Boris A. 1998. Atm deficiency results in severe meiotic disruption as early as leptotema of prophase I. *Dev. Camb. Engl.* 125: 4007–4017.
- Bashamboo A, Brauner R, Bignon-Topalovic J, Lortat-Jacob S, Karageorgou V, Lourenco D, Guffanti A, McElreavey K. 2014. Mutations in the FOG2/ZFPM2 gene are associated with anomalies of human testis determination. *Hum. Mol. Genet.* 23: 3657–3665.
- Baskin LS, Ebbers MB. 2006. Hypospadias: anatomy, etiology, and technique. *J. Pediatr. Surg.* 41: 463–472.
- Behringer RR, Finegold MJ, Cate RL. 1994. Müllerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell* 79: 415–425.
- Belgorosky A, Guercio G, Pepe C, Saraco N, Rivarola MA. 2009. Genetic and Clinical Spectrum of Aromatase Deficiency in Infancy, Childhood and Adolescence. *Horm. Res. Paediatr.* 72: 321–330.
- Benedict JC, Lin TM, Loeffler IK, Peterson RE, Flaws JA. 2000. Physiological role of the aryl hydrocarbon receptor in mouse ovary development. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 56: 382–388.
- Benkert AR, Young M, Robinson D, Hendrickson C, Lee PA, Strauss KA. 2015. Severe Salt-Losing 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Deficiency: Treatment and Outcomes of HSD3B2 c.35G>A Homozygotes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100: E1105–1115.
- Benko S, Gordon CT, Mallet D, Sreenivasan R, Thauvin-Robinet C, Brendehaug A, Thomas S, Bruland O, David M, Nicolino M, Labalme A, Sanlaville D, Callier P, Malan V, Huet F, Molven A, Dijoud F, Munnich A, Faivre L, Amiel J, Harley V, Houge G, Morel Y, Lyonnet S. 2011. Disruption of a long distance regulatory region upstream of *SOX9* in isolated disorders of sex development. *J. Med. Genet.* 48: 825–830.
- Benz RW, Castro-Román F, Tobias DJ, White SH. 2005. Experimental validation of molecular dynamics simulations of lipid bilayers: a new approach. *Biophys. J.* 88: 805–817.
- Berry CW, Brambati B, Eskes TK, Exalto N, Fox H, Geraedts JP, Gerhard I, Gonzales Gomes F, Grudzinskas JG, Hustin J. 1995. The Euro-Team Early Pregnancy (ETEP) protocol for recurrent miscarriage. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 10: 1516–1520.
- Bhatnager R, Dang AS. 2018. Comprehensive in-silico prediction of damage associated SNPs in Human Prolidase gene. *Sci. Rep.* 8: 9430.
- Biason-Lauber A. 2012. WNT4, RSPO1, and FOXL2 in sex development. *Semin. Reprod. Med.* 30: 387–395.

RÉFÉRENCES

- Biason-Lauber A, Miller WL, Pandey AV, Flück CE. 2013. Of marsupials and men: “Backdoor” dihydrotestosterone synthesis in male sexual differentiation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 371: 124–132.
- Bogani D, Siggers P, Brixey R, Warr N, Beddow S, Edwards J, Williams D, Wilhelm D, Koopman P, Flavell RA, Chi H, Ostrer H, Wells S, Cheeseman M, Greenfield A. 2009. Loss of mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 (MAP3K4) reveals a requirement for MAPK signalling in mouse sex determination. *PLoS Biol.* 7: e1000196.
- Boisen KA, Chellakooty M, Schmidt IM, Kai CM, Damgaard IN, Suomi A-M, Toppari J, Skakkebaek NE, Main KM. 2005. Hypospadias in a cohort of 1072 Danish newborn boys: prevalence and relationship to placental weight, anthropometrical measurements at birth, and reproductive hormone levels at three months of age. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90: 4041–4046.
- Bondy CA. 2007. Care of girls and women with Turner syndrome: a guideline of the Turner Syndrome Study Group. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92: 10–25.
- Boué J, Bou A null, Lazar P. 1975. Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous human abortions. *Teratology* 12: 11–26.
- Bouma GJ, Washburn LL, Albrecht KH, Eicher EM. 2007. Correct dosage of *Fog2* and *Gata4* transcription factors is critical for fetal testis development in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 14994–14999.
- Brennan J, Tilmann C, Capel B. 2003. *Pdgfr- α* mediates testis cord organization and fetal Leydig cell development in the XY gonad. *Genes Dev.* 17: 800–810.
- Butnariu L, Covic M, Ivanov I, Bujoran C, Gramescu M, Gorduza E. 2011. Clinical and cytogenetic correlation in primary and secondary amenorrhea: Retrospective study on 531 patients. *Rev. Romana Med. Lab.* 19: 149–160.
- Byskov AG. 1986. Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiol. Rev.* 66: 71–117.
- Canto P, Söderlund D, Reyes E, Méndez JP. 2004. Mutations in the desert hedgehog (DHH) gene in patients with 46,XY complete pure gonadal dysgenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89: 4480–4483.
- Carlson BM. 2019. Chapter 14 - The Reproductive System. In: Carlson BM, editor. *The Human Body*. Academic Press, p 373–396.
- Carlson BM. 2014. Chapter 16 - Urogenital System. In: Carlson BM, editor. *Human Embryology and Developmental Biology (Fifth Edition)*. Philadelphia: W.B. Saunders, p 376–407.
- Carmell MA, Girard A, van de Kant HJG, Bourc’his D, Bestor TH, de Rooij DG, Hannon GJ. 2007. *MIWI2* is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Dev. Cell* 12: 503–514.
- Catlin EA, Tonnu VC, Ebb RG, Pacheco BA, Manganaro TF, Ezzell RM, Donahoe PK, Teixeira J. 1997. Müllerian inhibiting substance inhibits branching morphogenesis and induces apoptosis in fetal rat lung. *Endocrinology* 138: 790–796.
- Celniker G, Nimrod G, Ashkenazy H, Glaser F, Martz E, Mayrose I, Pupko T, Ben-Tal N. 2013. ConSurf: Using Evolutionary Data to Raise Testable Hypotheses about Protein Function. *Isr. J. Chem.* 53: 199–206.
- Chandrasekaran G, Hwang EC, Kang TW, Kwon DD, Park K, Lee J-J, Lakshmanan V-K. 2017. Computational Modeling of complete HOXB13 protein for predicting the functional effect of SNPs and the associated role in hereditary prostate cancer. *Sci. Rep.* 7: 43830.
- Chard T. 1991. Frequency of implantation and early pregnancy loss in natural cycles. *Baillieres Clin. Obstet. Gynaecol.* 5: 179–189.
- Chassot AA, Gregoire EP, Magliano M, Lavery R, Chaboissier MC. 2008a. Genetics of ovarian differentiation: *Rspo1*, a major player. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determ. Differ.* 2: 219–227.

RÉFÉRENCES

- Chassot A-A, Ranc F, Gregoire EP, Roepers-Gajadien HL, Taketo MM, Camerino G, de Rooij DG, Schedl A, Chaboissier M-C. 2008b. Activation of beta-catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum. Mol. Genet.* 17: 1264–1277.
- Chocu S. 2014. Découverte de nouvelles protéines impliquées dans la spermatogenèse chez le rat.
- Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. 2012. Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. *PLOS ONE* 7: e46688.
- Chun S, Fay JC. 2009. Identification of deleterious mutations within three human genomes. *Genome Res.* 19: 1553–1561.
- Clark AM, Garland KK, Russell LD. 2000. Desert hedgehog (Dhh) Gene Is Required in the Mouse Testis for Formation of Adult-Type Leydig Cells and Normal Development of Peritubular Cells and Seminiferous Tubules. *Biol. Reprod.* 63: 1825–1838.
- Clermont Y. 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol. Rev.* 52: 198–236.
- Clermont Y. 1963. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am. J. Anat.* 112: 35–51.
- Cnattingius S, Signorello LB, Annerén G, Clausson B, Ekbohm A, Ljunger E, Blot WJ, McLaughlin JK, Petersson G, Rane A, Granath F. 2000. Caffeine intake and the risk of first-trimester spontaneous abortion. *N. Engl. J. Med.* 343: 1839–1845.
- Connell M, Owen C, Segars J. 2013. Genetic Syndromes and Genes Involved in the Development of the Female Reproductive Tract: A Possible Role for Gene Therapy. *J. Genet. Syndr. Gene Ther.* 4.
- Conte FA, Grumbach MM, Ito Y, Fisher CR, Simpson ER. 1994. A syndrome of female pseudohermaphroditism, hypergonadotropic hypogonadism, and multicystic ovaries associated with missense mutations in the gene encoding aromatase (P450arom). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78: 1287–1292.
- Conti M, Chang RJ. 2016. Chapter 125 - Folliculogenesis, Ovulation, and Luteogenesis. In: Jameson JL, De Groot LJ, de Kretser DM, Giudice LC, Grossman AB, Melmed S, Potts JT, Weir GC, editors. *Endocrinology: Adult and Pediatric (Seventh Edition)*. Philadelphia: W.B. Saunders, p 2179-2191.e3.
- Cooke HJ, Saunders PTK. 2002. Mouse models of male infertility. *Nat. Rev. Genet.* 3: 790–801.
- Cora E, Pandey RR, Xiol J, Taylor J, Sachidanandam R, McCarthy AA, Pillai RS. 2014. The MID-PIWI module of Piwi proteins specifies nucleotide- and strand-biases of piRNAs. *RNA N. Y.* N 20: 773–781.
- Cox DN, Chao A, Baker J, Chang L, Qiao D, Lin H. 1998. A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev.* 12: 3715–3727.
- Cox JJ, Willatt L, Homfray T, Woods CG. 2011. A SOX9 Duplication and Familial 46,XX Developmental Testicular Disorder. *N. Engl. J. Med.* 364: 91–93.
- Dacheux J-L, Castella S, Gatti JL, Dacheux F. 2005. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology* 63: 319–341.
- Dakal TC, Kala D, Dhiman G, Yadav V, Krokhotin A, Dokholyan NV. 2017. Predicting the functional consequences of non-synonymous single nucleotide polymorphisms in IL8 gene. *Sci. Rep.* 7: 6525.
- Davis BK. 1980. Interaction of lipids with the plasma membrane of sperm cells. I. The antifertilization action of cholesterol. *Arch. Androl.* 5: 249–254.
- De Fazio S, Bartonicek N, Di Giacomo M, Abreu-Goodger C, Sankar A, Funaya C, Antony C, Moreira PN, Enright AJ, O’Carroll D. 2011. The endonuclease activity of Mili fuels piRNA amplification that silences LINE1 elements. *Nature* 480: 259–263.
- De Felici M. 2013. Origin, Migration, and Proliferation of Human Primordial Germ Cells. In: Coticchio G, Albertini DF, De Santis L, editors. *Oogenesis*. London: Springer, p 19–37.

RÉFÉRENCES

- DeFalco T, Takahashi S, Capel B. 2011. Two distinct origins for Leydig cell progenitors in the fetal testis. *Dev. Biol.* 352: 14–26.
- Délot EC, Vilain E. 2019. Chapter 16 - Disorders of Sex Development. In: Strauss JF, Barbieri RL, editors. *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology (Eighth Edition)*. Philadelphia: Content Repository Only!, p 365-393.e5.
- Deng W, Lin H. 2002. miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Dev. Cell* 2: 819–830.
- Desai N, Ludgin J, Sharma R, Anirudh RK, Agarwal A. 2017a. Female and Male Gametogenesis. In: Falcone T, Hurd WW, editors. *Clinical Reproductive Medicine and Surgery: A Practical Guide*. Cham: Springer International Publishing, p 19–45.
- Desai N, Ludgin J, Sharma R, Anirudh RK, Agarwal A. 2017b. Female and Male Gametogenesis. In: Falcone T, Hurd WW, editors. *Clinical Reproductive Medicine and Surgery: A Practical Guide*. Cham: Springer International Publishing, p 19–45.
- Di Giacomo M, Barchi M, Baudat F, Edelmann W, Keeney S, Jasin M. 2005. Distinct DNA-damage-dependent and -independent responses drive the loss of oocytes in recombination-defective mouse mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 737–742.
- Diejomaoh MFE. 2015. Recurrent Spontaneous Miscarriage Is Still a Challenging Diagnostic and Therapeutic Quagmire. *Med. Princ. Pract.* 24: 38–55.
- Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. 1996. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 383: 531–535.
- Donohoue PA. 2018. 23 - Disorders of Sex Development. In: Kliegman RM, Lye PS, Bordini BJ, Toth H, Basel D, editors. *Nelson Pediatric Symptom-Based Diagnosis*. Elsevier, p 348-366.e2.
- Duckitt K, Qureshi A. 2011. Recurrent miscarriage. *BMJ Clin. Evid.* 2011.
- Elsheikh M, Dunger DB, Conway GS, Wass J a. H. 2002. Turner's syndrome in adulthood. *Endocr. Rev.* 23: 120–140.
- Encha-Razavi F, Escudier E. 2008. *Embryologie humaine* | Elsevier Masson.
- Etcheverry M. 2013. Etude du contrôle des éléments transposables par la méthylation de l'ADN chez *Arabidopsis thaliana*.
- Falcone T, Hurd WW eds. 2013. *Clinical Reproductive Medicine and Surgery: A Practical Guide, 2e*. New York: Springer-Verlag.
- Farrugia MK, Sebire NJ, Achermann JC, Eisawi A, Duffy PG, Mushtaq I. 2013. Clinical and gonadal features and early surgical management of 45,X/46,XY and 45,X/47,XYY chromosomal mosaicism presenting with genital anomalies. *J. Pediatr. Urol.* 9: 139–144.
- Feher J. 2012. 9.9 - Female Reproductive Physiology. In: Feher J, editor. *Quantitative Human Physiology*. Boston: Academic Press, p 846–855.
- Fekih SE. 2018. Impact des facteurs maternels et paternels sur les résultats de FIV / ICSI et investigations génétiques des spermatozoïdes d'hommes infertiles.
- Florman HM, Jungnickel MK, Sutton KA. 2008. Regulating the acrosome reaction. *Int. J. Dev. Biol.* 52: 503–510.
- Flück CE, Meyer-Böni M, Pandey AV, Kempná P, Miller WL, Schoenle EJ, Biason-Lauber A. 2011. Why Boys Will Be Boys: Two Pathways of Fetal Testicular Androgen Biosynthesis Are Needed for Male Sexual Differentiation. *Am. J. Hum. Genet.* 89: 201–218.
- Fuente-Cortés BED la, Cerda-Flores RM, Dávila-Rodríguez MI, García-Vielma C, Alvarado RMD la R, Cortés-Gutiérrez EI. 2009. Chromosomal abnormalities and polymorphic variants in couples with repeated miscarriage in Mexico. *Reprod. Biomed. Online* 18: 543–548.
- Fujimoto T, Miyayama Y, Fuyuta M. 1977. The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells. *Anat. Rec.* 188: 315–330.

RÉFÉRENCES

- Fukami M, Nishimura G, Homma K, Nagai T, Hanaki K, Uematsu A, Ishii T, Numakura C, Sawada H, Nakacho M, Kowase T, Motomura K, Haruna H, Nakamura M, Ohishi A, Adachi M, Tajima T, Hasegawa Y, Hasegawa T, Horikawa R, Fujieda K, Ogata T. 2009. Cytochrome P450 Oxidoreductase Deficiency: Identification and Characterization of Biallelic Mutations and Genotype-Phenotype Correlations in 35 Japanese Patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94: 1723–1731.
- Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MP, Juengel JL, Jokiranta TS, McLaren RJ, Luro K, Dodds KG, Montgomery GW, Beattie AE, Davis GH, Ritvos O. 2000. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat. Genet.* 25: 279–283.
- Geckinli BB, Toksoy G, Sayar C, Soylemez MA, Yesil G, Aydın H, Karaman A, Devranoglu B. 2014. Prevalence of X-aneuploidies, X-structural abnormalities and 46,XY sex reversal in Turkish women with primary amenorrhea or premature ovarian insufficiency. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 182: 211–215.
- Geller F, Feenstra B, Carstensen L, Pers TH, van Rooij IALM, Körberg IB, Choudhry S, Karjalainen JM, Schnack TH, Hollegaard MV, Feitz WFJ, Roeleveld N, Hougaard DM, Hirschhorn JN, Franke L, Baskin LS, Nordenskjöld A, van der Zanden LFM, Melbye M. 2014. Genome-wide association analyses identify variants in developmental genes associated with hypospadias. *Nat. Genet.* 46: 957–963.
- George L, Granath F, Johansson ALV, Olander B, Cnattingius S. 2006. Risks of repeated miscarriage. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* 20: 119–126.
- George M, Schneuer FJ, Jamieson SE, Holland AJA. 2015. Genetic and environmental factors in the aetiology of hypospadias. *Pediatr. Surg. Int.* 31: 519–527.
- George Priya Doss C, Zayed H. 2017. Comparative computational assessment of the pathogenicity of mutations in the Aspartoacylase enzyme. *Metab. Brain Dis.* 32: 2105–2118.
- Glaser F, Pupko T, Paz I, Bell RE, Bechor-Shental D, Martz E, Ben-Tal N. 2003. ConSurf: identification of functional regions in proteins by surface-mapping of phylogenetic information. *Bioinform. Oxf. Engl.* 19: 163–164.
- Gnessi L, Basciani S, Mariani S, Arizzi M, Spera G, Wang C, Bondjers C, Karlsson L, Betsholtz C. 2000. Leydig Cell Loss and Spermatogenic Arrest in Platelet-Derived Growth Factor (Pdgf)-a-Deficient Mice. *J. Cell Biol.* 149: 1019–1026.
- Gondos B, Westergaard L, Byskov AG. 1986. Initiation of oogenesis in the human fetal ovary: ultrastructural and squash preparation study. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 155: 189–195.
- González-Pérez A, López-Bigas N. 2011. Improving the Assessment of the Outcome of Nonsynonymous SNVs with a Consensus Deleteriousness Score, *Condel*. *Am. J. Hum. Genet.* 88: 440–449.
- Goto T, Adjaye J, Rodeck CH, Monk M. 1999. Identification of genes expressed in human primordial germ cells at the time of entry of the female germ line into meiosis. *Mol. Hum. Reprod.* 5: 851–860.
- Gou L-T, Kang J-Y, Dai P, Wang X, Li F, Zhao S, Zhang M, Hua M-M, Lu Y, Zhu Y, Li Z, Chen H, Wu L-G, Li D, Fu X-D, Li J, Shi H-J, Liu M-F. 2017. Ubiquitination-Deficient Mutations in Human Piwi Cause Male Infertility by Impairing Histone-to-Protamine Exchange during Spermiogenesis. *Cell* 169: 1090-1104.e13.
- Goud TM, Mohammed Al Harassi S, Khalfan Al Salmani K, Mohammed Al Busaidy S, Rajab A. 2009. Cytogenetic studies in couples with recurrent miscarriage in the Sultanate of Oman. *Reprod. Biomed. Online* 18: 424–429.
- Gravholt CH. 2005. Epidemiological, endocrine and metabolic features in Turner syndrome. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 49: 145–156.
- Green-top Guideline No.17. 2011. Recurrent Miscarriage, Investigation and Treatment of Couples (Green-top Guideline No. 17). *R. Coll. Obstet. Amp Gynaecol.*
- Greenwold N, Jauniaux E. 2002. Collection of villous tissue under ultrasound guidance to improve the cytogenetic study of early pregnancy failure. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 17: 452–456.

RÉFÉRENCES

- Grimson A, Srivastava M, Fahey B, Woodcroft BJ, Chiang HR, King N, Degnan BM, Rokhsar DS, Bartel DP. 2008. Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. *Nature* 455: 1193–1197.
- Grinspon RP, Rey RA. 2020. Chapter 48 - Disorders of Sex Development. In: Kovacs CS, Deal CL, editors. *Maternal-Fetal and Neonatal Endocrinology*. Academic Press, p 841–867.
- Grivna ST, Pyhtila B, Lin H. 2006. MIWI associates with translational machinery and PIWI-interacting RNAs (piRNAs) in regulating spermatogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 13415–13420.
- Groth KA, Skakkebaek A, Høst C, Gravholt CH, Bojesen A. 2013. Clinical review: Klinefelter syndrome - a clinical update. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98: 20–30.
- Guérin J-F. 2016. Chapitre 8 - La spermatogenèse. In: Frydman R, editor. *Infertilité*. Paris: Elsevier Masson, p 59–64.
- Guglielmo MC, Albertini DF. 2013. The Structural Basis for Coordinating Oogenesis and Folliculogenesis. In: Coticchio G, Albertini DF, De Santis L, editors. *Oogenesis*. London: Springer, p 63–73.
- Gurney JK, McGlynn KA, Stanley J, Merriman T, Signal V, Shaw C, Edwards R, Richiardi L, Hutson J, Sarfati D. 2017. Risk factors for cryptorchidism. *Nat. Rev. Urol.* 14: 534–548.
- Haoud K. 2014. Etude de la prévalence des aneuploïdies dans les produits d'avortements spontanés : intérêt des techniques FISH et MLFA pour la détection des remaniements chromosomiques.
- Hassan MS, Shaalan AA, Dessouky MI, Abdelnaiem AE, ElHefnawi M. 2019. A review study: Computational techniques for expecting the impact of non-synonymous single nucleotide variants in human diseases. *Gene* 680: 20–33.
- Heffner L, Schust D. 2014. *The Reproductive System at a Glance*, 4th Edition | Wiley. Wiley.com.
- Heller CH, Clermont Y. 1964. KINETICS OF THE GERMINAL EPITHELIUM IN MAN. *Recent Prog. Horm. Res.* 20: 545–575.
- Hiort O, Holterhus P-M, Werner R, Marschke C, Hoppe U, Partsch C-J, Riepe FG, Achermann JC, Struve D. 2005. Homozygous disruption of P450 side-chain cleavage (CYP11A1) is associated with prematurity, complete 46,XY sex reversal, and severe adrenal failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90: 538–541.
- Holdcraft RW, Braun RE. 2004. Hormonal regulation of spermatogenesis. *Int. J. Androl.* 27: 335–342.
- Horwich MD, Li C, Matranga C, Vagin V, Farley G, Wang P, Zamore PD. 2007. The *Drosophila* RNA methyltransferase, DmHen1, modifies germline piRNAs and single-stranded siRNAs in RISC. *Curr. Biol. CB* 17: 1265–1272.
- Houwing S, Kamminga LM, Berezikov E, Cronembold D, Girard A, van den Elst H, Filippov DV, Blaser H, Raz E, Moens CB, Plasterk RHA, Hannon GJ, Draper BW, Ketting RF. 2007. A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish. *Cell* 129: 69–82.
- Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb AN, Bartley J. 1999. Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *Am. J. Med. Genet.* 87: 349–353.
- Hughes IA, Davies JD, Bunch TI, Pasterski V, Mastroyannopoulou K, MacDougall J. 2012. Androgen insensitivity syndrome. *Lancet Lond. Engl.* 380: 1419–1428.
- Hughes IA, Houk C, Ahmed SF, Lee PA, Group LC. 2006. Consensus statement on management of intersex disorders. *Arch. Dis. Child.* 91: 554–563.
- Hughes IA, Nihoul-Fékété C, Thomas B, Cohen-Kettenis PT. 2007. Consequences of the ESPE/LWPES guidelines for diagnosis and treatment of disorders of sex development. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 21: 351–365.
- Hugues J-N. 2016. Chapitre 2 - La folliculogenèse : le B.A.-BA pour le médecin de la reproduction. In: Frydman R, editor. *Infertilité*. Paris: Elsevier Masson, p 7–12.
- Husain MA, Zaki OK. 1999. A Survey of 1,000 Cases Referred for Cytogenetic Study to King Khalid University Hospital, Saudi Arabia. *Hum. Hered.* 49: 208–214.

RÉFÉRENCES

- Hyon C. 2016. Etude des gènes impliqués dans le déterminisme gonadique chez l'homme.
- Hyon C, Rouen A. 2013. Entre déterminisme génétique et théorie du genre. *Médecine Thérapeutique Médecine Reprod. Gynécologie Endocrinol.* 15: 96–105.
- Idkowiak J, Randell T, Dhir V, Patel P, Shackleton CHL, Taylor NF, Krone N, Arlt W. 2012. A missense mutation in the human cytochrome b5 gene causes 46,XY disorder of sex development due to true isolated 17,20 lyase deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97: E465-475.
- Ipsaro JJ, Haase AD, Knott SR, Joshua-Tor L, Hannon GJ. 2012. The structural biochemistry of Zucchini implicates it as a nuclease in piRNA biogenesis. *Nature* 491: 279–283.
- Iwasaki YW, Siomi MC, Siomi H. 2015. PIWI-Interacting RNA: Its Biogenesis and Functions. *Annu. Rev. Biochem.* 84: 405–433.
- Iyer P, Wani L, Joshi S, Lakshmi J, Dalvi R, Chavan D, Das BR, Mandava S. 2007. Cytogenetic investigations in couples with repeated miscarriages and malformed children: report of a novel insertion. *Reprod. Biomed. Online* 14: 314–321.
- Jacob M, Konrad K, Jacob HJ. 1999. Early development of the müllerian duct in avian embryos with reference to the human. An ultrastructural and immunohistochemical study. *Cells Tissues Organs* 164: 63–81.
- Jacobs PA. 1981. Mutation rates of structural chromosome rearrangements in man. *Am. J. Hum. Genet.* 33: 44–54.
- Jacobs PA. 1992. The chromosome complement of human gametes. *Oxf. Rev. Reprod. Biol.* 14: 47–72.
- Jauniaux E, Farquharson RG, Christiansen OB, Exalto N. 2006. Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 21: 2216–2222.
- Johannsen TH, Mallet D, Dige-Petersen H, Müller J, Main KM, Morel Y, Forest MG. 2005. Delayed Diagnosis of Congenital Adrenal Hyperplasia with Salt Wasting Due to Type II β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90: 2076–2080.
- Jones RE, Lopez KH. 2006. CHAPTER FOUR - The Male Reproductive System. In: Jones RE, Lopez KH, editors. *Human Reproductive Biology (Third Edition)*. San Diego: Academic Press, p 97–123.
- Kalavathi V, Chandra N, Renjini Nambiar G, Shanker J, Sugunashankari P, Meena J, Jegatheesan T, Sathiyavedu S, Ramesh A, P M G, M Marimuthu K. 2009. Chromosomal Abnormalities in 979 Cases of Amenorrhea: A Review. *Int J Hum Genet* 10.
- Kamaliyan Z, Pouriamanesh S, Soosanabadi M, Gholami M, Mirfakhraie R. 2018. Investigation of piwi-interacting RNA pathway genes role in idiopathic non-obstructive azoospermia. *Sci. Rep.* 8.
- Karl J, Capel B. 1998. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev. Biol.* 203: 323–333.
- Kasak L, Rull K, Laan M. 2019. Chapter 21 - Genetics and Genomics of Recurrent Pregnancy Loss. In: Leung PCK, Qiao J, editors. *Human Reproductive and Prenatal Genetics*. Academic Press, p 463–494.
- Kashimada K, Pelosi E, Chen H, Schlessinger D, Wilhelm D, Koopman P. 2011. FOXL2 and BMP2 act cooperatively to regulate follistatin gene expression during ovarian development. *Endocrinology* 152: 272–280.
- Kelly JN, Barr SD. 2014. In Silico Analysis of Functional Single Nucleotide Polymorphisms in the Human TRIM22 Gene. *PLOS ONE* 9: e101436.
- Khalid JM, Oerton JM, Dezateux C, Hindmarsh PC, Kelnar CJ, Knowles RL. 2012. Incidence and clinical features of congenital adrenal hyperplasia in Great Britain. *Arch. Dis. Child.* 97: 101–106.
- Kim CJ, Lin L, Huang N, Quigley CA, AvRuskin TW, Achermann JC, Miller WL. 2008. Severe Combined Adrenal and Gonadal Deficiency Caused by Novel Mutations in the Cholesterol Side Chain Cleavage Enzyme, P450scc. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93: 696–702.

RÉFÉRENCES

- Kim KS, Liu W, Cunha GR, Russell DW, Huang H, Shapiro E, Baskin LS. 2002. Expression of the androgen receptor and 5 alpha-reductase type 2 in the developing human fetal penis and urethra. *Cell Tissue Res.* 307: 145–153.
- Kline JK, Stein Z, Susser M. 1990. *From Conception to Birth: Epidemiology of Prenatal Development.* New York: Oxford University Press Inc. 450 p.
- Kobayashi A, Behringer RR. 2003. Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. *Nat. Rev. Genet.* 4: 969–980.
- Kobayashi A, Shawlot W, Kania A, Behringer RR. 2004. Requirement of *Lim1* for female reproductive tract development. *Dev. Camb. Engl.* 131: 539–549.
- Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R. 1993. *WT-1* is required for early kidney development. *Cell* 74: 679–691.
- de Kretser DM, Loveland K, O'Bryan M. 2016. Chapter 136 - Spermatogenesis. In: Jameson JL, De Groot LJ, de Kretser DM, Giudice LC, Grossman AB, Melmed S, Potts JT, Weir GC, editors. *Endocrinology: Adult and Pediatric (Seventh Edition).* Philadelphia: W.B. Saunders, p 2325–2353.e9.
- Krieger E, Vriend G. 2014. YASARA View—molecular graphics for all devices—from smartphones to workstations. *Bioinformatics* 30: 2981–2982.
- Kumar A, Shekhar S, Dhole B. 2014. Thyroid and male reproduction. *Indian J. Endocrinol. Metab.* 18: 23–31.
- Kuramochi-Miyagawa S, Kimura T, Ijiri TW, Isobe T, Asada N, Fujita Y, Ikawa M, Iwai N, Okabe M, Deng W, Lin H, Matsuda Y, Nakano T. 2004. *Mili*, a mammalian member of *piwi* family gene, is essential for spermatogenesis. *Dev. Camb. Engl.* 131: 839–849.
- Kuramochi-Miyagawa S, Kimura T, Yomogida K, Kuroiwa A, Tadokoro Y, Fujita Y, Sato M, Matsuda Y, Nakano T. 2001. Two mouse *piwi*-related genes: *miwi* and *mili*. *Mech. Dev.* 108: 121–133.
- Kyriakou A, Lucas-Herald AK, McGowan R, Tobias ES, Ahmed SF. 2015. Disorders of sex development: advances in genetic diagnosis and challenges in management. *Adv. Genomics Genet.* 5: 165–177.
- Lacombe A, Lee H, Zahed L, Choucair M, Muller J-M, Nelson SF, Salameh W, Vilain E. 2006. Disruption of *POF1B* binding to nonmuscle actin filaments is associated with premature ovarian failure. *Am. J. Hum. Genet.* 79: 113–119.
- Lai EC, Wiel C, Rubin GM. 2004. Complementary miRNA pairs suggest a regulatory role for miRNA:miRNA duplexes. *RNA N. Y. N* 10: 171–175.
- Lakhal B, Braham R, Berguigua R, Bouali N, Zaouali M, Chaieb M, Veitia RA, Saad A, Elghezal H. 2010. Cytogenetic analyses of premature ovarian failure using karyotyping and interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) in a group of 1000 patients. *Clin. Genet.* 78: 181–185.
- Landau M, Mayrose I, Rosenberg Y, Glaser F, Martz E, Pupko T, Ben-Tal N. 2005. ConSurf 2005: the projection of evolutionary conservation scores of residues on protein structures. *Nucleic Acids Res.* 33: W299-302.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann Y, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860–921.

RÉFÉRENCES

- Langlais J, Kan FW, Granger L, Raymond L, Bleau G, Roberts KD. 1988. Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during in vitro capacitation. *Gamete Res.* 20: 185–201.
- Lau NC, Seto AG, Kim J, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Bartel DP, Kingston RE. 2006. Characterization of the piRNA complex from rat testes. *Science* 313: 363–367.
- Lee PA, Houk CP, Ahmed SF, Hughes IA, International Consensus Conference on Intersex organized by the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society and the European Society for Paediatric Endocrinology. 2006. Consensus statement on management of intersex disorders. *International Consensus Conference on Intersex. Pediatrics* 118: e488-500.
- Li C, Vagin VV, Lee S, Xu J, Ma S, Xi H, Seitz H, Horwich MD, Syrzycka M, Honda BM, Kittler ELW, Zapp ML, Klattenhoff C, Schulz N, Theurkauf WE, Weng Z, Zamore PD. 2009. Without Argonaute3, Aubergine-bound piRNAs collapse but Piwi-bound piRNAs persist. *Cell* 137: 509–521.
- Lin H, Spradling AC. 1997. A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Dev. Camb. Engl.* 124: 2463–2476.
- Lourenço D, Brauner R, Rybczynska M, Nihoul-Fékété C, McElreavey K, Bashamboo A. 2011. Loss-of-function mutation in GATA4 causes anomalies of human testicular development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108: 1597–1602.
- Luangpraseuth-Prosper A. 2015. Topaz1, un gène indispensable à la spermatogénèse. <http://www.theses.fr>.
- Maatouk DM, DiNapoli L, Alvers A, Parker KL, Taketo MM, Capel B. 2008. Stabilization of beta-catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. *Hum. Mol. Genet.* 17: 2949–2955.
- Malone CD, Brennecke J, Dus M, Stark A, McCombie WR, Sachidanandam R, Hannon GJ. 2009. Specialized piRNA pathways act in germline and somatic tissues of the *Drosophila* ovary. *Cell* 137: 522–535.
- Malone CD, Hannon GJ. 2009. Small RNAs as Guardians of the Genome. *Cell* 136: 656–668.
- Maneschi F, Zupi E, Marconi D, Valli E, Romanini C, Mancuso S. 1995. Hysteroscopically detected asymptomatic müllerian anomalies. Prevalence and reproductive implications. *J. Reprod. Med.* 40: 684–688.
- Martineau J, Nordqvist K, Tilmann C, Lovell-Badge R, Capel B. 1997. Male-specific cell migration into the developing gonad. *Curr. Biol. CB* 7: 958–968.
- Martinerie L, Morel Y, Gay C-L, Pienkowski C, de Kerdanet M, Cabrol S, Lecointre C, Coutant R, Baron S, Colle M, Brauner R, Thibaud E, Leger J, Nihoul-Fekete C, Bouvattier C. 2012. Impaired puberty, fertility, and final stature in 45,X/46,XY mixed gonadal dysgenetic patients raised as boys. *Eur. J. Endocrinol.* 166: 687–694.
- Matsumoto AM, Bremner WJ. 2016. Chapter 19 - Testicular Disorders. In: Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg HM, editors. *Williams Textbook of Endocrinology (Thirteenth Edition)*. Philadelphia: Content Repository Only!, p 694–784.
- Matzuk MM, Dionne L, Guo Q, Kumar TR, Lebovitz RM. 1998. Ovarian function in superoxide dismutase 1 and 2 knockout mice. *Endocrinology* 139: 4008–4011.
- McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, de Kretser DM, Pratis K, Robertson DM. 2002. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Prog. Horm. Res.* 57: 149–179.
- McNamara ER, Swartz JM, Diamond DA. 2017. Initial Management of Disorders of Sex Development in Newborns. *Urology* 101: 1–8.
- Mehlmann LM. 2005. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reprod. Camb. Engl.* 130: 791–799.
- Meister G. 2013. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat. Rev. Genet.* 14: 447–459.

RÉFÉRENCES

- Mierla D, Malageanu M, Tulin R, Albu D. 2015. Prevalence of chromosomal abnormalities in infertile couples in Romania. *Balk. J. Med. Genet. BJMG* 18: 23–30.
- Miller WL. 2011. Role of mitochondria in steroidogenesis. *Endocr. Dev.* 20: 1–19.
- Moniot B, Berta P, Scherer G, Südbek P, Poulat F. 2000. Male specific expression suggests role of DMRT1 in human sex determination. *Mech. Dev.* 91: 323–325.
- Moniruzzaman M, Miyano T. 2010. Growth of primordial oocytes in neonatal and adult mammals. *J. Reprod. Dev.* 56: 559–566.
- Moore K, Persaud TVN, Torchia M. 2015. *The Developing Human - 10th Edition.*
- Morin SJ, Eccles J, Iturriaga A, Zimmerman RS. 2017. Translocations, inversions and other chromosome rearrangements. *Fertil. Steril.* 107: 19–26.
- Moriya K, Morita K, Mitsui T, Kitta T, Nakamura M, Kon M, Nonomura K. 2014. Impact of laparoscopy for diagnosis and treatment in patients with disorders of sex development. *J. Pediatr. Urol.* 10: 955–961.
- Mouka A. 2017. Analyse des variations du nombre de copies d'ADN dans une cohorte d'hommes infertiles et génération de modèles génétiques d'étude de la méiose à partir de cellules iPS de patients infertiles. <http://www.theses.fr>.
- Moussaif NE, Haddad NE, Iraqi N, Gaouzi A. 2011. 45,X/46,XY mosaicism: Report of five cases and clinical review. [/data/revues/00034266/v72i3/S0003426611000849/](http://data.revues/00034266/v72i3/S0003426611000849/).
- Mullen RD, Behringer RR. 2014. Molecular genetics of Müllerian duct formation, regression and differentiation. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determ. Differ.* 8: 281–296.
- Muñoz X, Navarro M, Mata A, Bassas L, Larriba S. 2014. Association of PIWIL4 genetic variants with germ cell maturation arrest in infertile Spanish men. *Asian J. Androl.* 16: 931–933.
- Naasse Y, Bakhchane A, Charoute H, Jennane F, Bignon-Topalovic J, Malki A, Bashamboo A, Barakat A, Rouba H, McElreavey K. 2017. A Novel Homozygous Missense Mutation in the FU-CRD2 Domain of the R-spondin1 Gene Associated with Familial 46,XX DSD. *Sex. Dev.* 11: 269–274.
- Nagano R, Tabata S, Nakanishi Y, Ohsako S, Kurohmaru M, Hayashi Y. 2000. Reproliferation and relocation of mouse male germ cells (gonocytes) during prespermatogenesis. *Anat. Rec.* 258: 210–220.
- Nakaya Y, Sukowati EW, Wu Y, Sheng G. 2008. RhoA and microtubule dynamics control cell-basement membrane interaction in EMT during gastrulation. *Nat. Cell Biol.* 10: 765–775.
- Narang K, Cope ZS, Teixeira JM. 2019. Chapter 6 - Developmental Genetics of the Female Reproductive Tract. In: Leung PCK, Qiao J, editors. *Human Reproductive and Prenatal Genetics.* Academic Press, p 129–153.
- Ness RB, Grisso JA, Hirschinger N, Markovic N, Shaw LM, Day NL, Kline J. 1999. Cocaine and tobacco use and the risk of spontaneous abortion. *N. Engl. J. Med.* 340: 333–339.
- New MI. 1970. Male pseudohermaphroditism due to 17 alpha-hydroxylase deficiency. *J. Clin. Invest.* 49: 1930–1941.
- Nimkarn S, New MI. 2008. Steroid 11beta-hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 19: 96–99.
- Nishimasu H, Ishizu H, Saito K, Fukuhara S, Kamatani MK, Bonnefond L, Matsumoto N, Nishizawa T, Nakanaga K, Aoki J, Ishitani R, Siomi H, Siomi MC, Nureki O. 2012. Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis. *Nature* 491: 284–287.
- Nistal M, Paniagua R, González-Peramato P, Reyes-Múgica M. 2015. Perspectives in Pediatric Pathology, Chapter 7. Ovotesticular DSD (True Hermaphroditism). *Pediatr. Dev. Pathol. Off. J. Soc. Pediatr. Pathol. Paediatr. Pathol. Soc.* 18: 345–352.

RÉFÉRENCES

- Nordenvall AS, Frisé L, Nordenström A, Lichtenstein P, Nordenskjöld A. 2014. Population based nationwide study of hypospadias in Sweden, 1973 to 2009: incidence and risk factors. *J. Urol.* 191: 783–789.
- Norris RP, Freudzon M, Nikolaev VO, Jaffe LA. 2010. Epidermal growth factor receptor kinase activity is required for gap junction closure and for part of the decrease in ovarian follicle cGMP in response to LH. *Reprod. Camb. Engl.* 140: 655–662.
- O’Byrne MK, de Kretser D. 2006. Mouse models for genes involved in impaired spermatogenesis. *Int. J. Androl.* 29: 76–89; discussion 105–108.
- Ogasawara M, Aoki K, Okada S, Suzumori K. 2000. Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. *Fertil. Steril.* 73: 300–304.
- Oktay K, Bedoschi G, Berkowitz K, Bronson R, Kashani B, McGovern P, Pal L, Quinn G, Rubin K. 2016. Fertility Preservation in Females with Turner Syndrome: A Comprehensive Review and Practical Guidelines. *J. Pediatr. Adolesc. Gynecol.* 29: 409–416.
- Olivieri D, Sykora MM, Sachidanandam R, Mechtler K, Brennecke J. 2010. An in vivo RNAi assay identifies major genetic and cellular requirements for primary piRNA biogenesis in *Drosophila*. *EMBO J.* 29: 3301–3317.
- O’Neill M, Zhelyazkova B, White JT, Thirumavalavan N, Lamb DJ. 2019. Chapter 1 - Developmental Genetics of the Male Reproductive System. In: Leung PCK, Qiao J, editors. *Human Reproductive and Prenatal Genetics*. Academic Press, p 3–25.
- OrganCh13C1120.
- Orvis GD, Behringer RR. 2007. Cellular mechanisms of Müllerian duct formation in the mouse. *Dev. Biol.* 306: 493–504.
- Pagnamenta AT, Taanman J-W, Wilson CJ, Anderson NE, Marotta R, Duncan AJ, Bitner-Glindzicz M, Taylor RW, Laskowski A, Thorburn DR, Rahman S. 2006. Dominant inheritance of premature ovarian failure associated with mutant mitochondrial DNA polymerase gamma. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 21: 2467–2473.
- Pandey RR, Homolka D, Chen K-M, Sachidanandam R, Fauvarque M-O, Pillai RS. 2017. Recruitment of Armitage and Yb to a transcript triggers its phased processing into primary piRNAs in *Drosophila* ovaries. *PLoS Genet.* 13: e1006956.
- Pang SY, Wallace MA, Hofman L, Thuline HC, Dorche C, Lyon IC, Dobbins RH, Kling S, Fujieda K, Suwa S. 1988. Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Pediatrics* 81: 866–874.
- Parajes S, Kamrath C, Rose IT, Taylor AE, Mooij CF, Dhir V, Grötzinger J, Arlt W, Krone N. 2011. A novel entity of clinically isolated adrenal insufficiency caused by a partially inactivating mutation of the gene encoding for P450 side chain cleavage enzyme (CYP11A1). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96: E1798-1806.
- Parma P, Radi O, Vidal V, Chaboissier MC, Dellambra E, Valentini S, Guerra L, Schedl A, Camerino G. 2006. R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat. Genet.* 38: 1304–1309.
- Pasquino AM, Passeri F, Pucarelli I, Segni M, Municchi G. 1997. Spontaneous pubertal development in Turner’s syndrome. Italian Study Group for Turner’s Syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82: 1810–1813.
- Perriton CL, Powles N, Chiang C, Maconochie MK, Cohn MJ. 2002. Sonic hedgehog signaling from the urethral epithelium controls external genital development. *Dev. Biol.* 247: 26–46.
- Petiot A, Perriton CL, Dickson C, Cohn MJ. 2005. Development of the mammalian urethra is controlled by Fgfr2-IIIb. *Development* 132: 2441–2450.
- Pitetti J-L, Calvel P, Romero Y, Conne B, Truong V, Papaioannou MD, Schaad O, Docquier M, Herrera PL, Wilhelm D, Nef S. 2013. Insulin and IGF1 Receptors Are Essential for XX and XY Gonadal Differentiation and Adrenal Development in Mice. *PLOS Genet.* 9: e1003160.

RÉFÉRENCES

- Plant TM, Marshall GR. 2001. The functional significance of FSH in spermatogenesis and the control of its secretion in male primates. *Endocr. Rev.* 22: 764–786.
- Porter FD. 2008. Smith-Lemli-Opitz syndrome: pathogenesis, diagnosis and management. *Eur. J. Hum. Genet.* EJHG 16: 535–541.
- Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. 2013. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil. Steril.* 99: 63.
- Pronk S, Páll S, Schulz R, Larsson P, Bjelkmar P, Apostolov R, Shirts MR, Smith JC, Kasson PM, van der Spoel D, Hess B, Lindahl E. 2013. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 29: 845–854.
- Rajkovic A, Pangas SA, Ballow D, Suzumori N, Matzuk MM. 2004. NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science* 305: 1157–1159.
- Rao L, Murthy K, Babu A, Venkata P, Deenadayal M, Singh L. 2005. Chromosome inversions and a novel chromosome insertion associated with recurrent miscarriages in South India. *Arch. Gynecol. Obstet.* 272: 273–277.
- Rasch V. 2003. Cigarette, alcohol, and caffeine consumption: risk factors for spontaneous abortion. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 82: 182–188.
- Raymond CS, Murphy MW, O’Sullivan MG, Bardwell VJ, Zarkower D. 2000. Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev.* 14: 2587–2595.
- Reisch N, Högl W, Parajes S, Rose IT, Dhir V, Götzinger J, Arlt W, Krone N. 2013. A diagnosis not to be missed: nonclassic steroid 11 β -hydroxylase deficiency presenting with premature adrenarche and hirsutism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98: E1620-1625.
- Reuter M, Berninger P, Chuma S, Shah H, Hosokawa M, Funaya C, Antony C, Sachidanandam R, Pillai RS. 2011. Miwi catalysis is required for piRNA amplification-independent LINE1 transposon silencing. *Nature* 480: 264–267.
- Reva B, Antipin Y, Sander C. 2011. Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics. *Nucleic Acids Res.* 39: e118–e118.
- Robinson JW, Zhang M, Shuhaibar LC, Norris RP, Geerts A, Wunder F, Eppig JJ, Potter LR, Jaffe LA. 2012. Luteinizing hormone reduces the activity of the NPR2 guanylyl cyclase in mouse ovarian follicles, contributing to the cyclic GMP decrease that promotes resumption of meiosis in oocytes. *Dev. Biol.* 366: 308–316.
- Rosenberg LE, Rosenberg DD. 2012. Chapter 11 - Chromosome Abnormalities. In: Rosenberg LE, Rosenberg DD, editors. *Human Genes and Genomes*. San Diego: Academic Press, p 141–167.
- Ross JL, Roeltgen DP, Kushner H, Zinn AR, Reiss A, Bardsley MZ, McCauley E, Tartaglia N. 2012. Behavioral and social phenotypes in boys with 47,XYY syndrome or 47,XXY Klinefelter syndrome. *Pediatrics* 129: 769–778.
- Ross JL, Roeltgen DP, Stefanatos G, Benecke R, Zeger MPD, Kushner H, Ramos P, Elder FF, Zinn AR. 2008. Cognitive and motor development during childhood in boys with Klinefelter syndrome. *Am. J. Med. Genet. A.* 146A: 708–719.
- Rubtsov P, Karmanov M, Sverdlova P, Spirin P, Tiulpakov A. 2009. A novel homozygous mutation in CYP11A1 gene is associated with late-onset adrenal insufficiency and hypospadias in a 46,XY patient. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94: 936–939.
- Saint leandre B. 2016. Transposable element under piRNA genes regulation in *Drosophila*: male and female germline differences and their consequences for transposition dynamic.
- Sajjad Y, Quenby S, Nickson P, Lewis-Jones DI, Vince G. 2004. Immunohistochemical localization of androgen receptors in the urogenital tracts of human embryos. *Reprod. Camb. Engl.* 128: 331–339.
- Santen RJ, Brodie H, Simpson ER, Siiteri PK, Brodie A. 2009. History of aromatase: saga of an important biological mediator and therapeutic target. *Endocr. Rev.* 30: 343–375.

RÉFÉRENCES

- Sasiadek M, Haus O, Lukasik-Majchrowska M, Slezak R, Paprocka-Borowicz M, Busza H, Plewa R, Bułło A, Jagielski J. 1997. [Cytogenetic analysis in couples with spontaneous abortions]. *Ginekol. Pol.* 68: 248–252.
- Saxena SG, Desai K, Shewale L, Ranjan P, Saranath D. 2012. Chromosomal aberrations in 2000 couples of Indian ethnicity with reproductive failure. *Reprod. Biomed. Online* 25: 209–218.
- Schmidt A, Palumbo G, Bozzetti MP, Tritto P, Pimpinelli S, Schäfer U. 1999. Genetic and molecular characterization of *sting*, a gene involved in crystal formation and meiotic drive in the male germ line of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 151: 749–760.
- Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K, Fehsenfeld S, Gredsted L, Treier A-C, Treier M. 2004. The murine winged-helix transcription factor *Foxl2* is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Dev. Camb. Engl.* 131: 933–942.
- Schoenwolf G, Bleyl S, Brauer P, Francis-West P. 2009a. *Larsen's Human Embryology - 5th Edition*.
- Schoenwolf G, Bleyl S, Brauer P, Francis-West P. 2009b. *Larsen's Human Embryology - 5th Edition*.
- Schupbach T, Wieschaus E. 1991. Female Sterile Mutations on the Second Chromosome of *Drosophila Melanogaster*. II. Mutations Blocking Oogenesis or Altering Egg Morphology. *Genetics* 129: 1119–1136.
- Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. 2014. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat. Methods* 11: 361–362.
- Seifert AW, Bouldin CM, Choi K-S, Harfe BD, Cohn MJ. 2009. Multiphasic and tissue-specific roles of sonic hedgehog in cloacal septation and external genitalia development. *Development* 136: 3949–3957.
- Seifi M, Walter MA. 2018. Accurate prediction of functional, structural, and stability changes in PITX2 mutations using in silico bioinformatics algorithms. *PLOS ONE* 13: e0195971.
- Senti K-A, Jurczak D, Sachidanandam R, Brennecke J. 2015. piRNA-guided slicing of transposon transcripts enforces their transcriptional silencing via specifying the nuclear piRNA repertoire. *Genes Dev.* 29: 1747–1762.
- Shihab HA, Rogers MF, Gough J, Mort M, Cooper DN, Day INM, Gaunt TR, Campbell C. 2015. An integrative approach to predicting the functional effects of non-coding and coding sequence variation. *Bioinformatics* 31: 1536–1543.
- Shiverick KT, Salafia C. 1999. Cigarette smoking and pregnancy I: ovarian, uterine and placental effects. *Placenta* 20: 265–272.
- Shozu M, Akasofu K, Harada T, Kubota Y. 1991. A new cause of female pseudohermaphroditism: placental aromatase deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 72: 560–566.
- Sim N-L, Kumar P, Hu J, Henikoff S, Schneider G, Ng PC. 2012. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res.* 40: W452–457.
- Simard J, Ricketts M-L, Gingras S, Soucy P, Feltus FA, Melner MH. 2005. Molecular biology of the 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family. *Endocr. Rev.* 26: 525–582.
- Siomi MC, Sato K, Pezic D, Aravin AA. 2011. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 246–258.
- Šípek A, Panczak A, Mihalová R, Hřčková L, Suttrová E, Sobotka V, Lonský P, Kaspříková N, Gregor V. 2015. Pericentric Inversion of Human Chromosome 9 Epidemiology Study in Czech Males and Females. *Folia Biol. (Praha)* 61: 140–146.
- Skuse D, Printzlau F, Wolstencroft J. 2018. Sex chromosome aneuploidies. *Handb. Clin. Neurol.* 147: 355–376.
- Soardi FC, Penachioni JY, Justo GZ, Bachega TASS, Inácio M, Mendonça BB, de Castro M, de Mello MP. 2009. Novel mutations in CYP11B1 gene leading to 11 beta-hydroxylase deficiency in Brazilian patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94: 3481–3485.

RÉFÉRENCES

- Spitz F, Gonzalez F, Duboule D. 2003. A Global Control Region Defines a Chromosomal Regulatory Landscape Containing the HoxD Cluster. *Cell* 113: 405–417.
- Srinivasan E, Rajasekaran R. 2018. Deciphering the loss of metal binding due to mutation D83G of human SOD1 protein causing FALS disease. *Int. J. Biol. Macromol.* 107: 521–529.
- Stochholm K, Juul S, Juel K, Naeraa RW, Gravholt CH. 2006. Prevalence, incidence, diagnostic delay, and mortality in Turner syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91: 3897–3902.
- Sudhakar N, Priya Doss CG, Thirumal Kumar D, Chakraborty C, Anand K, Suresh M. 2016. Deciphering the impact of somatic mutations in exon 20 and exon 9 of PIK3CA gene in breast tumors among Indian women through molecular dynamics approach. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 34: 29–41.
- Sutton E, Hughes J, White S, Sekido R, Tan J, Arboleda V, Rogers N, Knowler K, Rowley L, Eyre H, Rizzoti K, McAninch D, Goncalves J, Slee J, Turbitt E, Bruno D, Bengtsson H, Harley V, Vilain E, Sinclair A, Lovell-Badge R, Thomas P. 2011. Identification of SOX3 as an XX male sex reversal gene in mice and humans. *J. Clin. Invest.* 121: 328–341.
- Suzuki R, Honda S, Kirino Y. 2012. PIWI Expression and Function in Cancer. *Front. Genet.* 3.
- Tang H, Brennan J, Karl J, Hamada Y, Raetzman L, Capel B. 2008. Notch signaling maintains Leydig progenitor cells in the mouse testis. *Dev. Camb. Engl.* 135: 3745–3753.
- Tee MK, Abramsohn M, Loewenthal N, Harris M, Siwach S, Kaplinsky A, Markus B, Birk O, Sheffield VC, Parvari R, Pavari R, HersHKovitz E, Miller WL. 2013. Varied clinical presentations of seven patients with mutations in CYP11A1 encoding the cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450_{scC}. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98: 713–720.
- Ten SK, Chin YM, Noor PJ, Hassan K. 1990. Cytogenetic studies in women with primary amenorrhea. *Singapore Med. J.* 31: 355–359.
- Tevosian SG, Albrecht KH, Crispino JD, Fujiwara Y, Eicher EM, Orkin SH. 2002. Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. *Dev. Camb. Engl.* 129: 4627–4634.
- Thomas NS, Hassold TJ. 2003. Aberrant recombination and the origin of Klinefelter syndrome. *Hum. Reprod. Update* 9: 309–317.
- Tomaselli S, Megiorni F, De Bernardo C, Felici A, Marrocco G, Maggiulli G, Grammatico B, Remotti D, Saccucci P, Valentini F, Mazzilli MC, Majore S, Grammatico P. 2008. Syndromic true hermaphroditism due to an R-spondin1 (RSPO1) homozygous mutation. *Hum. Mutat.* 29: 220–226.
- Tortora G, Grabowski S. 1994. *Principes d'anatomie et de physiologie*.
- Tunç E, Tanrıverdi N, Demirhan O, Süleymanova D, Çetinel N. 2016. Chromosomal analyses of 1510 couples who have experienced recurrent spontaneous abortions. *Reprod. Biomed. Online* 32: 414–419.
- Tur-Torres MH, Garrido-Gimenez C, Alijotas-Reig J. 2017. Genetics of recurrent miscarriage and fetal loss. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 42: 11–25.
- Vainio S, Heikkilä M, Kispert A, Chin N, McMahon AP. 1999. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 397: 405–409.
- Vander Borgh M, Wyns C. 2018. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin. Biochem.* 62: 2–10.
- Vanorny DA, Prasasya RD, Chalpe AJ, Kilen SM, Mayo KE. 2014. Notch signaling regulates ovarian follicle formation and coordinates follicular growth. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 28: 499–511.
- Warot X, Fromental-Ramain C, Fraulob V, Chambon P, Dollé P. 1997. Gene dosage-dependent effects of the Hoxa-13 and Hoxd-13 mutations on morphogenesis of the terminal parts of the digestive and urogenital tracts. *Dev. Camb. Engl.* 124: 4781–4791.
- Waterham HR, Hennekam RCM. 2012. Mutational spectrum of Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* 160C: 263–284.

RÉFÉRENCES

- Waterston RH, Lander ES, Sulston JE. 2002. On the sequencing of the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 3712–3716.
- Wear HM, McPike MJ, Watanabe KH. 2016. From primordial germ cells to primordial follicles: a review and visual representation of early ovarian development in mice. *J. Ovarian Res.* 9.
- White PC, Bachega TASS. 2012. Congenital adrenal hyperplasia due to 21 hydroxylase deficiency: from birth to adulthood. *Semin. Reprod. Med.* 30: 400–409.
- White PC, Speiser PW. 2000. Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency. *Endocr. Rev.* 21: 245–291.
- Wilhelm D, Palmer S, Koopman P. 2007. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol. Rev.* 87: 1–28.
- Winter JS, Couch RM, Muller J, Perry YS, Ferreira P, Baydala L, Shackleton CH. 1989. Combined 17-hydroxylase and 17,20-desmolase deficiencies: evidence for synthesis of a defective cytochrome P450c17. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 68: 309–316.
- WITCHI E. 1948. Migration of the germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal folds. *Contrib Embryol Carnegie Inst* 32: 67–80.
- Wong MSF, Lam STS. 2005. Cytogenetic analysis of patients with primary and secondary amenorrhoea in Hong Kong: retrospective study. *Hong Kong Med. J. Xianggang Yi Xue Za Zhi* 11: 267–272.
- Xiol J. 2011. Etudes fonctionnelles sur les composants de la voie des piRNAs MOV10L1 et FKBP6.
- Xu J, Gridley T. 2013. Notch2 is required in somatic cells for breakdown of ovarian germ-cell nests and formation of primordial follicles. *BMC Biol.* 11: 13.
- Yamada G, Satoh Y, Baskin LS, Cunha GR. 2003. Cellular and molecular mechanisms of development of the external genitalia. *Differ. Res. Biol. Divers.* 71: 445–460.
- Yan W. 2009. Male infertility caused by spermiogenic defects: lessons from gene knockouts. *Mol. Cell. Endocrinol.* 306: 24–32.
- Yeh S, Tsai M-Y, Xu Q, Mu X-M, Lardy H, Huang K-E, Lin H, Yeh S-D, Altuwaijri S, Zhou X, Xing L, Boyce BF, Hung M-C, Zhang S, Gan L, Chang C. 2002. Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: An in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 13498–13503.
- Yin Y, Lin C, Ma L. 2006. MSX2 promotes vaginal epithelial differentiation and wolffian duct regression and dampens the vaginal response to diethylstilbestrol. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 20: 1535–1546.
- Zaiat ME. 2015. Cibles et voies de signalisation régulées par FOXL2 au cours de la morphogénèse ovarienne.
- Zaki OK, Priya Doss C G, Ali SA, Murad GG, Elashi SA, Ebnou MSA, Kumar D T, Khalifa O, Gamal R, El Abd HSA, Nasr BN, Zayed H. 2017. Genotype-phenotype correlation in patients with isovaleric acidemia: comparative structural modelling and computational analysis of novel variants. *Hum. Mol. Genet.* 26: 3105–3115.
- Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, van der Poel S, International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology, World Health Organization. 2009. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 24: 2683–2687.
- Zeleznik AJ. 2004. The physiology of follicle selection. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 2: 31.
- Zeng L, Zhang Q, Yan K, Zhou M-M. 2011. Structural insights into piRNA recognition by the human PIWI-like 1 PAZ domain. *Proteins* 79: 2004–2009.
- Zhang M, Su Y-Q, Sugiura K, Xia G, Eppig JJ. 2010. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science* 330: 366–369.

RÉFÉRENCES

- Zhao F, Franco HL, Rodriguez KF, Brown PR, Tsai M-J, Tsai SY, Yao HH-C. 2017. Elimination of the male reproductive tract in the female embryo is promoted by COUP-TFII in mice. *Science* 357: 717–720.
- Zhou J, Kumar TR, Matzuk MM, Bondy C. 1997. Insulin-like growth factor I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 11: 1924–1933.