

UNIVERSITÉ DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Faculté Supérieure et de la Recherche Scientifique  
Université de Blida I  
Faculté des sciences de la nature et la vie  
Département de Biologie et physiologie cellulaire



Mémoire de projet de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme de Master  
Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie  
Spécialité : Génétique et physiologie

Thème

## Apport de la cytogénétique classique et moléculaire dans le diagnostic des Ambiguïtés sexuelles

Mémoire Présentée et soutenue publiquement le 16/10/2014 par  
Melle YACEF.Sihem

Mots clés :

Ambiguïté sexuelle, hermaphrodisme vrais, pseudohermaphrodisme, cytogénétique,  
caryotype, FISH

**Jury**

Présidente :	M me HERKAT.S.	Maître assistante A	(UB1)
Promoteur :	Pr AIT ABDELKADER B.	Maître de Conférences A	(CPMC)
Co-Promoteur:	Mr. BESSAAD M.A.	Maître de Conférences B	(UB1)
Examinatrice :	Melle SAYAD. M	Maître assistante A	(UB1)
Examinatrice:	Mme AMOUKRANE. A	Maitre assistante A	(UB1)

Promotion 2013/2014



Your complimentary  
use period has ended.  
Thank you for using  
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to  
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

La différenciation sexuelle dépend d'une succession d'événements dont chaque étape peut être le siège de dysfonctionnements aboutissant à une ambiguïté sexuelle. Les troubles du développement sexuel peuvent être causés par des anomalies génétiques (chromosomiques) ou hormonales. Ces anomalies, qui sont représentées essentiellement par : Les pseudohermaphrodismes masculin révèle une insuffisance de virilisation d'un patient XY, les pseudohermaphrodismes féminins qui présentent un excès de virilisation d'un patient XX, et les hermaphrodismes vrais exceptionnellement avec une présence d'ovotestis.

L'objectif de notre travail est la mise en évidence des anomalies chromosomiques spécifiques chez les patients atteints d'une ambiguïté sexuelle par la familiarisation des techniques de cytogénétique, le caryotype et l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH).

Les résultats obtenus montrent que le caryotype offre l'avantage d'analyser les anomalies cytogénétiques qui affectent chacun de nos chromosomes avec un pouvoir réolutif limité, soulignant la nécessité d'utiliser des techniques plus résolutive, telles que la FISH, pour mettre en évidence des microremaniements chromosomiques en cause dans l'étiologie de certaines pathologies humaines.

**Mots clés :** ambiguïté sexuelle, pseudohermaphrodisme masculin, pseudohermaphrodisme féminin, hermaphrodisme vrais, cytogénétique, caryotype, FISH.









**PDF Complete**

*Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

## e des tableaux

- Tableau I** : Caractéristiques des chromosomes dans le caryotype humain í í í í í í .3
- Tableau II** : les différents gènes impliqués dans la différenciation sexuelleí í í í í í ..5
- Tableau III** : les différentes anomalies chromosomiques de structureí í í í í í í ...í 7
- Tableau IV** : les différents syndromes liés aux ADSí í í í í í í í í í í í í í í í í .10
- Tableau V** : Caractéristiques des bandes R et Gí í í í í í í í í í í í í í í í í 10

**ADN** : Acide Desoxy Ribonucleique.  
**ADS** : Anomalie du Développement Sexuel.  
**AMH** : Anti Müllerian Hormone.  
**Bandes G** : Bandes colorées par le Giemsa.  
**Bandes R** : Bandes Reverses.  
**BER** : recombinaison des bases endommagées.  
**°C** : degré Celsius.  
**CGH** : Comparative Genomic Hybridization.  
**CO<sub>2</sub>** : dioxyde de carbone.  
**DAPI** : 4,6-diamidino-2-phenylindole.  
**DHT** : dihydrotestostérone.  
**EARL** : Earls balanced Salt solution.  
**FISH** : fluorescence in situ hybridization.  
**FrdU** : 5-fluoro-2-déoxyuridine.  
**h** : heure.  
**ins** : Insertions.  
**inv** : Inversions.  
**(i)** : Isochromosome.  
**HMG** : high mobility group protein.  
**Kb** : kilo base.  
**Mb** : Méga base.  
**min** : minute.  
**ml** : milli litre.  
**n** : nombre de jeu chromosomique.  
**NHEJ** : non-homologous end joining, NHEJ.  
**MMR** : Mésappariement et modification des bases.  
**OGE** : organes génitaux externes.  
**OGI** : organes génitaux internes.  
**p** : bras court.  
**PAR** : Région Pseudo Autosomique.  
**pH** : potentiel hydrogène.  
**PHM** : pseudohermaphrodisme masculin.  
**PHF** : pseudohermaphrodisme féminin.  
**q** : bras long.  
**RH** : recombinaison homologue.  
**(rob)** : translocation Robertsonienne.  
**RPMI** : Roswell Park Memorial Institute medium.  
**SRY** : Sex determining Region Y.  
**SSC** : Saline Sodium citrate.  
**SVF** : Sérum de Vò u Fò tal.  
**(t)** : translocation réciproque.  
**T°** : Température.  
**T/M** : tours par minutes.  
**µl** : micro litre.



**PDF**  
Complete

*Your complimentary  
use period has ended.  
Thank you for using  
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to  
Unlimited Pages and Expanded Features](#)





Your complimentary  
use period has ended.  
Thank you for using  
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to  
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

# *Introduction*

# *Générale*

[Click Here to upgrade to  
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

on sexuelle correspondent aux atypies congénitales gonadiques du développement sexuel. Elles constituent l'un des plus grands défis de l'endocrinologue pédiatre, du généticien, du psychologue, et du chirurgien. Leurs causes sont très variées. Ainsi, le problème du diagnostic d'une anomalie de différenciation sexuelle va se poser, à la naissance, devant tout nouveau-né dont l'aspect des organes génitaux externes n'est pas conforme à la norme. Ces aspects vont de l'hypospadias pénien postérieur à l'hypertrophie clitoridienne. Entre ces extrêmes, les organes génitaux sont franchement ambigus (Alaoui, 2011).

La cytogénétique humaine (ou génétique chromosomique) est une discipline récente dont l'essor date de 1956 avec la détermination du nombre exact de chromosomes chez l'homme (Tijo et Levan, 1956). Ce dénombrement a été rendu possible par l'introduction d'un choc hypotonique parmi les différentes étapes des techniques de préparation, qui a permis d'obtenir un étalement correct des chromosomes. En 1970, l'introduction des techniques de marquage en bandes des chromosomes a grandement amélioré la résolution et la sensibilité de l'analyse cytogénétique classique qui offre une vue d'ensemble du génome, permettant l'étude du nombre et de la structure des chromosomes. Enfin, l'apparition de l'hybridation in situ fluorescente en 1986 et son développement rapide offre aujourd'hui toute une panoplie d'outils permettant une étude de plus en plus fine et précise des chromosomes et de leur structure.

Grâce à ces techniques, de nombreuses pathologies autosomiques et gonosomiques ont pu être identifiées. Parmi les anomalies gonosomiques détectées par ces techniques, les ambiguïtés sexuelle ou anomalies du déterminisme du sexe (ADS).

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence le rôle de l'étude cytogénétique dans la pathologie du déterminisme du sexe, essentiellement dans l'hermaphrodisme vrai et le pseudohermaphrodisme masculin et féminin. Dans ce but, l'ensemble des cas d'ambiguïtés sexuelles colligés au service de cytogénétique du CPMC. Une revue de la littérature concernant les mécanismes du déterminisme du sexe a été faite et plus particulièrement la place du gène SRY dont le rôle dans la différenciation masculine. L'action d'autres gènes impliqués dans la cascade du déterminisme du sexe a été précisée.



Your complimentary  
use period has ended.  
Thank you for using  
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to  
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

# *Revue Bibliographique*

## 1.1 Organisation du génome humain

L'étude du génome humain a été initiée en 1988, après la création de l'organisation du génome humain (HUGO : Human Genome organization) aux États-Unis (Sfar et al., 1983).

Le génome humain, représente l'ensemble de l'information génétique qui caractérise un individu, contenu dans l'ADN des cellules. Une copie du génome humain comprend environ 3 milliards de paires de bases, dont moins de 20% ont un rôle fonctionnel clairement établi : codage des protéines, séquences déterminantes pour la structure chromosomique ou la réplication de l'ADN. En effet, le génome contient environ 25000 à 30 000 gènes codant des protéines. Dans l'espèce humaine, on distingue le génome nucléaire contenu dans le noyau cellulaire (porteur de la majeure partie de l'information génétique) et le génome mitochondriale (Grilliat et al., 2011).

## 1.2 Structure et organisation du chromosome

Il est connu depuis les années 1860 que les chromosomes sont le support du matériel génétique, de l'hérédité et de l'organisation de la vie cellulaire (Albert et al., 2002).

Les chromosomes eucaryotes sont des structures intranucléaires en bâtonnet. Ils ont une taille de l'ordre du micromètre (Beaudry, 1985). Leur aspect varie au cours du cycle cellulaire, en effet ils sont moins condensés en interphase et donc non visible individuellement au microscope. En revanche, durant la division cellulaire, ils se condensent et s'individualisent. Leur identification est alors plus aisée en métaphase de la mitose (Albert et al., 2002).

Les chromosomes sont constitués de deux chromatides sœurs réunies par un centromère dont la position définit les bras courts p et les bras longs q (Jeanpierre et al., 2004).

En fonction de la taille des chromosomes, de la position du centromère et des bandes les chromosomes sont classés en : chromosome *métacentrique*, centromère dans la région médiane, chromosome *submétacentrique*, centromère dans une région submédiane, chromosome *acrocentrique*, centromères dans une région terminale et le chromosome *Télocentrique* (Beaudry, 1985)

La classification des chromosomes du caryotype humain est fondée sur la taille et la position du centromère permet d'isoler 7 groupes de chromosomes (Tableau II).

## 1.3 Nomenclature des chromosomes

Le caryotype humain normal comporte 46 chromosomes (2n), soit 22 paires d'autosomes et une paire de gonosomes : deux chromosomes XX dans le sexe féminin et un X et un Y dans le sexe masculin. Le caryotype normal s'écrit : 46,XX ou 46,XY.

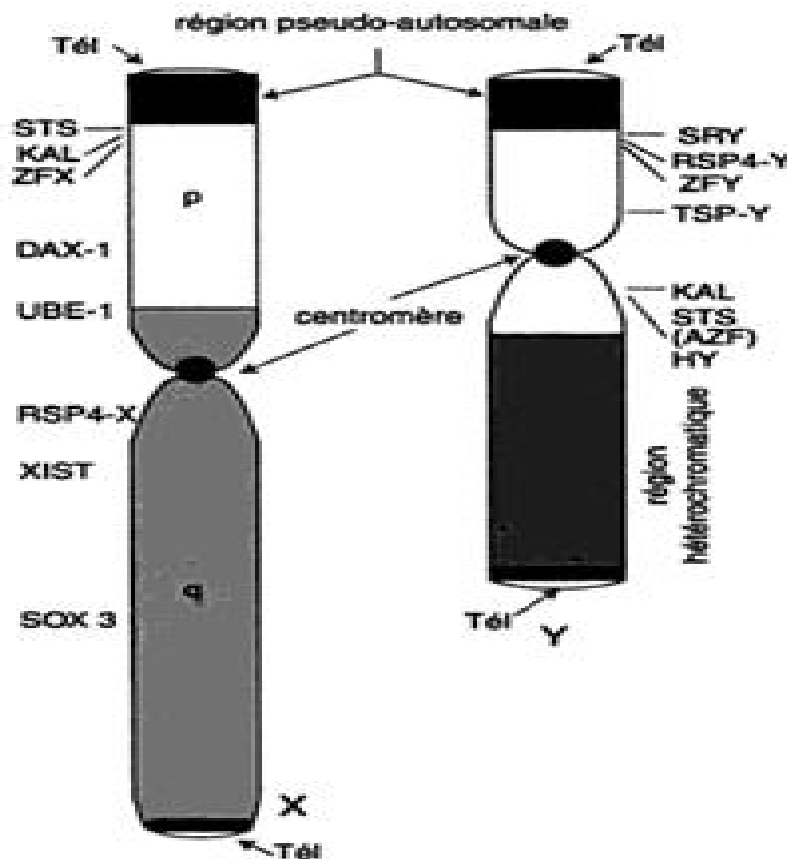
Chaque bras chromosomique est divisé, selon la taille, en une à quatre régions. Chaque région en bandes et sous-bandes numérotées du centromère au télomère. Par exemple, la dénomination Yp11.2 désigne la deuxième sous-bande de la première bande de la région 1 des bras courts du chromosome Y et se prononce: Y-p-un-un-point-2 (Jeanpierre et al., 2004).

## 1.4 Comparaison entre les deux gonosomes X et Y

Les chromosomes X et Y humains sont morphologiquement et génétiquement distincts.

osomes dans le caryotype humain (Eduardo, 1983).

Groupes	Chromosome	Description
<b>A</b>	1, 2 et 3	Chromosomes longs et à peu près métacentriques.
<b>B</b>	4 et 5	Chromosomes longs et submétacentrique.
<b>C</b>	6,7,8,9,10,11,12 et X	Chromosomes submétacentrique de longueur moyenne.
<b>D</b>	13, 14 et 15	Chromosomes acrocentriques long avec satellites.
<b>E</b>	16, 17 et 18	16 chromosomes métacentriques, 17-18 petits chromosomes métacentriques.
<b>F</b>	19 et 20	Chromosomes métacentriques courts.
<b>G</b>	21, 22 et Y	Chromosomes acrocentriques courts avec satellites (le chromosome Y appartient à ce groupe mais il ne possède pas de satellite.



**Figure I :** Représentation schématique du chromosome Y et sa comparaison avec le chromosome X (Annik, 2001).

chromatique. Il représente environ 5 % du génome entre 3 000 et 4 000 gènes. Les gènes du chromosome X sont un mélange à la fois des traditionnels « gènes de ménage » (housekeeping genes) et de gènes dont les produits ont des fonctions plus spécifiques, comme ceux de la pigmentation visuelle par exemple. Il est intéressant de noter que ce chromosome ne comporte pas plus de gènes impliqués dans la détermination et la différenciation sexuelles que n'importe quel autre autosome de taille comparable.

Contrairement au chromosome X, le chromosome Y est l'un des plus petits chromosomes du génome humain (~ 60 Mb) et représente seulement 2 à 3 % du génome haploïde. Il présente, au niveau de la partie distale de son bras long, une région hétérochromatique, qui est essentiellement composée de séquences hautement répétées. La présence de ces séquences rend cette région polymorphe en taille dans les différentes populations mâles. La région euchromatique du chromosome Y est également composée d'un grand nombre de séquences répétées et contient 32 gènes identifiés et étudiés. Le gène le plus caractéristique du chromosome Y reste le gène *SRY* (Sex-Determining Region Y) qui est essentiel pour la détermination testiculaire. En outre, le chromosome Y humain est également impliqué dans le développement et le maintien des cellules germinales mâles.

En dépit des différences importantes entre les deux chromosomes en termes de contenu en gènes et de fonction, il existe deux régions limitées, localisées aux extrémités terminales des deux chromosomes sexuels et dont les séquences sont homologues. Ces régions, nommées régions pseudoautosomales (PAR), s'apparient lors des méioses mâles et recombinent entre elles, contrairement aux autres régions des chromosomes sexuels (Quintana-Murci et al., 2001) (Figure I).

### 1.5 Le gène *SRY* (Sex-determining région Y):

L'organogénèse testiculaire est sous le contrôle du gène *SRY*. Ce gène long de 2100 bases, est localisé sur le bras court du chromosome Y à proximité de la région pseudoautosomique (PAR 1). Il est composé d'un seul exon (Veitia et al., 1997) dont le tiers central code pour une protéine de 204 acides aminés, contenant une région conservée de 79 acides aminés appelée HMG (*high mobility group protein*) ou *HMG-box*. La liaison de cette dernière à l'ADN favorise une structure particulière dont la stabilité est un facteur de régulation transcriptionnelle. La quasi-totalité des mutations actuellement décrites dans le cadre de lecture du gène *SRY* est localisée dans cette *HMG-box*, chez des individus à caryotype 46,XY conduit à l'apparition d'un phénotype féminin correspondant à une inversion sexuelle (Kutten et al., 2003).

### 1.6 Déterminismes du sexe :

La différenciation sexuelle est le processus qui garantit le développement du tractus génital et des organes génitaux externes appropriés sous en réponse à des signaux hormonaux (Ravel et al., 2004). Le déterminisme du sexe est sous contrôle génétique d'une part (Tableau II) et sous contrôle hormonal d'une autre part. En effet, La différenciation de la gonade primitive au cours de la vie fœtale est un processus qui débute vers la septième semaine de vie. Chez le fœtus mâle, elle implique deux hormones testiculaires, la testostérone et l'hormone anti-Müllérienne AMH (Anti Mullerian Hormone) encore appelée MIS (Mullerian inhibiting substance).

liqués dans la différenciation sexuelle (Fellous et *al.*,

Gènes	Localisation	Fonction	Lieu d'expression
SRY (Sex Region determining Y)	Bras court du chromosome Y	Facteur de transcription	cellules de Sertoli, cellules germinales mâles.
SOX-9 (SRY-related transcription factor 9)	Chromosome 17q24	Facteur de transcription	Crêtes génitales des deux sexes, cellule de Sertoli.
SF-1 (Steroidogenic Factor 1)	Chromosome 9q33	Facteur de transcription	Cellules de Leydig, ébauches des gonades des deux sexes.
DAX-1 (DSS-AHC critical region on human X chromosome gene 1)	Bras court du chromosome Xp21	Facteur de transcription	Crêtes génitales et autres tissus.
WT-1 (Wilms Tumor 1)	Chromosome 11p1	Facteur de transcription	Crêtes génitales des deux sexes, cellules de Sertoli.
AMH (hormone anti-müllérienne)	Bras court du chromosome 19 (19p13.3)	Facteur de croissance Hormone	Cellules de Sertoli, cellule de la granulosa
WNT4 (Wingless-Type MMTV integrationsitefamily, member 4)	chromosome 1p35	Molécule de signalisation	Précocement dans la gonade bipotentielle, puis limitée à l'ovaire.
DMRT1	Chromosome 9p24.3	Facteur de transcription	Dans les deux gonades des deux sexes.
InsL3 (Insuline-like hormone 3)	Bras court du chromosome 19	Molécule de signalisation	Cellules de Leydig du testicule fœtal.
XH2/ATR-X (X-linked helicase 2/alpha-thalassémie et retard mental liés à l'X)	Chromosome (Xq13.3)	Hélicase	/
DHH (Desert hedgehog)	Chromosome 12q13.1	Molécule de signalisation	Cellules de Sertoli.
FGF9	Chromosome 13q11-13	Facteurs de croissance	Crêtes génitales et cordon séminifère.



oïdienne synthétisée par les cellules de Leydig qui agit en tant que androgène. Elle induit chez le fœtus la différenciation des canaux de Wolff (épididymes, vésicules séminales et canaux déférents) et celle des organes génitaux externes (OGE : verge et testicules) après transformation en dihydrotestostérone (DHT). L'AMH est une glycoprotéine synthétisée par les cellules de Sertoli. Elle appartient à la famille du TGFβ et induit via un récepteur membranaire, la régression des canaux de Müller empêchant ainsi la formation de l'utérus, des trompes et de la portion supérieure du vagin. (Noel et al., 2003).

## 1.7 Les anomalies chromosomiques

On appelle anomalie chromosomique, tout remaniement du nombre ou de la structure des chromosomes.

### 1.7.1. Anomalies du nombre

Il s'agit d'anomalies du nombre des chromosomes par excès ou par défaut. Elles résultent d'une non disjonction des chromosomes homologues. Elles concernent : les polyploïdies contenant (les tétraploïdies et les triploïdies) et les aneuploïdies contenant (les monosomies, les trisomies et les marqueurs chromosomiques surnuméraires).

### 1.7.2. Anomalies de structure

Elles sont la conséquence de cassures chromosomiques suivies par un ou plusieurs recollements anormaux. Elles peuvent affecter un ou deux chromosome. (Jeanpierre et al., 2004) (Robert et al., 1970) (Tableau III).

### 1.7.3. Les microdélétions

L'ADN, support de notre information génétique soumis à différents types de dommages par des facteurs endogènes ou exogènes qui peuvent être une source d'instabilité génétique, elle peut générer de nombreux réarrangements avec les conséquences physiologiques potentielles qui en découlent (la progression tumorale, et les malformations congénitales) Parmi les mécanismes entrent en compétition pour la réparation des cassures: la recombinaison homologue non allélique RHNA, et la ligature d'extrémités non homologues (non-homologous end joining, NHEJ). (Rass et al., 2012)

- La recombinaison homologue non allélique : utilise une séquence homologue intacte pour réparer la cassure double-brin et est initiée par une résection d'ADN simple-brin, joue un rôle crucial dans le redémarrage des fourches de réplication et la réparation des pontages de l'ADN (Jacques, 2011).
- La religature d'extrémités non-homologues (NHEJ) : permet la jonction de deux extrémités d'ADN possédant très peu ou aucune homologie de séquence (Jacqueline., 2009).

Ces deux mécanismes, peuvent être couplés dans la réparation d'une même cassure et agir de manière séquentielle au cours du processus de la réparation (figure II).

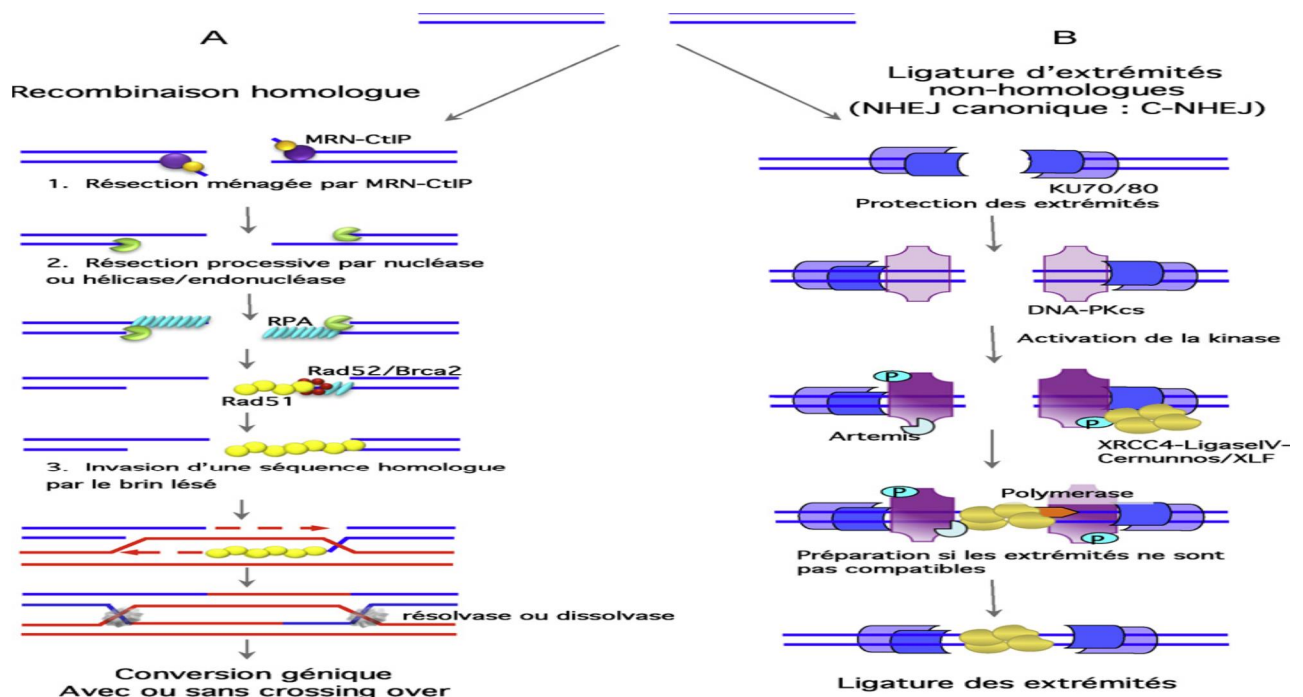
Il y a aussi d'autres mécanismes de réparation telle que (RH-BER-MMR).

Des défauts de la réparation des cassures associés à des mutations dans les gènes de réponse aux dommages (DDR:DNA damage response) causent une variété de syndromes associés à une instabilité génétique parmi lesquelles



ies chromosomiques de structure (Jeanpierre et al.,

Aberrations portant sur un chromosome	Aberrations portant sur deux chromosomes
<b>Délétions :</b> Résultent d'une cassure chromosomique avec perte du segment distal (délétion terminale) ou de deux cassures sur un même bras chromosomique avec perte du segment intercalaire (délétion intercalaire).	<b>Translocation :</b> Elle est caractérisée par deux cassures sur deux chromosomes différents, le plus souvent non homologues et recollement après échange des segments distaux. On distingue deux formes de translocations les translocations Robertsoniennes (rob) et les translocations réciproques (t).
<b>Inversions (inv.) :</b> Elles sont dues à deux cassures sur le même chromosome, suivies de recollement après inversion du segment intermédiaire.	<b>Insertions (ins) :</b> Elles se traduisent par le transfert d'un segment intercalaire à l'intérieur d'un autre bras chromosomique.
<b>Isochromosome (i) :</b> Est un chromosome anormal formé de deux bras longs ou de deux bras courts d'un même chromosome avec perte de l'autre bras. Contenant : les isochromosomes monocentriques et les isochromosomes dicentriques.	
<b>Duplications intrachromosomiques</b> Ce sont des remaniements purs. Les duplications chromosomiques peuvent se produire, soit en tandem, soit en miroir	



**Figure II :** Réparation des cassures double-brin de l'ADN. (A) La recombinaison homologue utilise une séquence homologue intacte, (B) La ligature des extrémités non-homologues (NHEJ) ne nécessite pas d'homologie de séquence (Élodie et al., 2003)

mi lesquelles les microdélétions péracentromériques occupent une place tout à fait essentielle, sont localisés dans des régions proches de centromère. Elles contiennent des gènes et des pseudogènes.

- Les microdélétions subtélomériques : présentent une grande variabilité de taille et de distribution des points de cassure, elles résultent de la malségrégation d'une translocation cryptique et ont, de ce fait, une récurrence non négligeable. (Stankiewicz P. et *al.*, 2002) (Jeanpierre et *al.*, 2004)

## 1.8 Les formes cliniques des ambiguïtés sexuelles :

L'anomalie du développement sexuel (ADS), parfois nommée à tort « ambiguïté sexuelle », est le résultat d'une anomalie de la différenciation sexuelle qui correspond à une malformation des organes génitaux internes et externes (Gueniche et *al.*, 2008) ; (Bargy et *al.*, 2000).

La naissance d'un enfant porteur de ce type d'anomalie est une urgence médicale et sociale. L'impossibilité de donner un sexe à un enfant qui vient de naître est très éprouvante, et le choix du sexe doit être le plus rapide possible. En attendant les résultats des examens, l'enfant doit être nommé (votre bébé) ou (votre enfant), et ses parents lui choisissent un surnom. Ces anomalies nécessitent une prise en charge multidisciplinaire, dans un centre spécialisé de l'endocrinologue pédiatre, le psychologue, le chirurgien, le biologiste, le radiologue, et les parents, vont tenter de prendre la meilleure décision possible pour l'enfant, son avenir en termes d'aspect physique, d'identité de genre, de vie sexuelle et de fertilité. (Bouvattier et *al.*, 2009).

On distingue différents types d'hermaphrodisme (les formes cliniques des ambiguïtés sexuelles) : l'hermaphrodisme vrai, le pseudohermaphrodisme féminin et le pseudohermaphrodisme masculin.

### 1.8.1 L'hermaphrodisme vrai

Les hermaphrodites sont connus comme ayant à la fois les « attribus sexuels » féminins et masculins. Ils sont porteurs à la fois d'ovaire et de testicule. Cette gonade, présentant un aspect bipolaire avec juxtaposition des structures ovarienne et testiculaire, est appelée « ovotestis ». Ces gonades sont à la fois des dérivés wolffiens et mullériens. À la puberté, les hermaphrodites développent des organes génitaux externes de type masculin, et des seins.

Le caryotype peut être XX ou XY, le plus habituel est XX. Comme chez le male XX, il existe donc un paradoxe entre la présence de tissu testiculaire et l'absence de chromosome Y. Le gène SRY a aussi été retrouvé chez certains hermaphrodites (Kuttann et *al.*, 2003).

### 1.8.2 Pseudohermaphrodisme masculin (PHM)

Les PHM sont des anomalies de la différenciation testiculaire proprement dite. Ils sont dus à une masculinisation insuffisante d'un fœtus de sexe masculin 46, XY ayant une détermination normale du testicule. En fonction du niveau de déficit, les PHM peuvent être répartis en deux catégories : les déficits de la fonction testiculaire dû à une insuffisance de sécrétion de testostérone secondaire à un déficit de sa biosynthèse et aussi l'insensibilité aux androgènes au niveau des tissus cibles résulte d'une délétion complète ou partielle du gène du récepteur aux androgènes. Toutes les anomalies enzymatiques responsables de PHM sont des maladies récessives liées au chromosome X. (Jeanpierre et *al.*, 2004)

1 (PHF) :

Le PHF réalise un état dans lequel des sujets avec un caryotype 46,XX normal et des ovaires normaux présentent certains éléments du phénotype masculin, avec notamment une virilisation des organes génitaux externes. Dans le PHF, la virilisation est due à une imprégnation anormale du fœtus du sexe féminin par des androgènes pendant la vie embryonnaire. Ces androgènes sont soit d'origine fœtale par hyperplasie congénitale des surrénales due à un bloc enzymatique sur la voie de la biosynthèse du cortisol ou déficit en aromatasase, soit d'origine maternelle : endogène, lors de tumeur virilisante ovarienne ou surrénaliennes, ou exogènes lors d'administration au cours de la grossesse et à une période critique de la différenciation sexuelle de drogues potentiellement virilisantes (Kuttann et *al.*, 2003).

### 1.9 Les différents syndromes liés aux ADS

Les anomalies chromosomiques constitutionnelles déséquilibrées des gonosomes, qu'elles soient de nombre ou de structure, n'ont pas toujours de retentissement phénotypique grave. (Tableau IV)

#### 1.9.1 Quelques maladies génétiques avec anomalies des OGE.

Beaucoup de maladies génétiques sont associées à des anomalies des organes génitaux externes entraînant des ambiguïtés sexuelles chez le garçon. :

**Le syndrome de Prader-Willi** peut présenter une cryptorchidie et un micropénis accompagnant une hypotonie néonatale. L'origine de cette pathologie est le plus souvent une délétion interstitielle du bras long du chromosome 15 paternel ou, moins fréquemment, une disomie maternelle du chromosome 15.

**Le G-Syndrome** est une pathologie de la ligne médiane associant un syndrome malformatif à un hypospadias chez les garçons. Deux gènes ont été identifiés, l'un en Xp22 et l'autre en 22q11.2.

**Le syndrome de Wolff- Hirshorn** (4p-) présente également un hypospadias. (Kassis et *al.*, 2002).

### 2. techniques d'études des anomalies chromosomiques :

La cytogénétique humaine est devenue en 1988 une discipline importante parmi les différentes branches de la génétique moderne (Paul et *al.*, 1989).

L'objet de la cytogénétique est l'étude de la physiologie et de la physiopathologie des chromosomes. (Malan et *al.*, 2008)

chromosomes liés aux ADS. (Jeanpierre et *al.*, 2004).

Syndrome	Formule chromosomique	caractéristique
Syndrome de Turner	45,X0, Mosaïque et/ou anomalie de structure de l'un des deux chromosomes X.	Phénotype féminin avec dysgénésie gonadique, aménorrhée primaire et stérilité
Syndrome de Klinefelter	47,XXY	Des garçons phénotypiquement normaux. A la puberté, ils présentent un hypogonadisme hypergonadotrophique avec de petits testicules
Trisomie X	47,XXX	Des femmes plutôt grandes, avec une puberté normale et une fertilité souvent normale.
Double Y	47,XYY	Homme phénotypiquement normal sans anomalies somatiques particulières, absence de dysgénésie gonadique ou d'une infertilité

**Tableau V** : Caractéristiques des bandes R et des bandes G (Bickmore, 1989).

	Bandes R	Bandes G
<b>Marquage</b>	Marqués par la coloration de Giemsa met en évidence les bandes R	Marqués faiblement par le colorant Giemsa qui révèle les bandes G
<b>Réplication</b>	Précoce	Tardive
<b>Localisation</b>	Euchromatine	Hétérochromatine
<b>Bases</b>	Bases majoritaires : Cytosine /guanine	Bases majoritaires : Adénine /thymine
<b>Séquences répétées</b>	Riche en séquences répétées SINEs (short nuclear interspersed element)	Riche en séquences répétées LINEs (long nuclear interspersed element)
<b>Gènes</b>	Riches en gènes	Pauvres en gènes

elle :

Tijo et Leven ont été permis de dresser, en 1956, l'inventaire exact du caryotype humain (Pienkowski et al., 2009), c'est le classement par paires des chromosomes à la fin de la première phase de la division cellulaire (prophase) et au début de la (métaphase) d'un sujet (Colombiès et al., 1985), en fonction de leur taille, de leur indice centromérique et de leur marquage en bande. Il peut être réalisé à partir de divers prélèvements biologique comme le sang, le liquide amniotique ou les villosités chorales en diagnostic prénatal, mais également sur des prélèvements tissulaires comme la peau. Son obtention nécessite dans la majorité des cas une culture cellulaire dont la durée varie de 72 heures pour le sang à une à deux semaines pour les prélèvements réalisés en prénatal et les prélèvements cutanés (Goumy, 2007)

Au début des années 1970, l'utilisation des techniques de marquages a permis de révéler le long des chromosomes une alternance de bandes transversales. Parmi les techniques couramment utilisées, on peut citer le marquage en bandes G (Giemsa) et le marquage en bandes R (Réverse). (Tableau V).

## 2.2 cytogénétique moléculaire

La détermination des anomalies chromosomiques de petites tailles est actuellement identifiée par les techniques de cytogénétiques moléculaires, en particulier l'Hybridation *in situ* (FISH) et l'Hybridation Génomique comparative (CGH) dotées d'une plus grande sensibilité. Qui sont apparues respectivement au début des années 1980 et au début des années 1990.

### 2.2.1 L'Hybridation fluorescente *in situ* (FISH)

La FISH consiste à hybrider une sonde fluorescente (un fragment d'ADN dans lequel a été introduit de façon chimique un fluorochrome) sur l'ADN des chromosomes en métaphase ou des noyaux en interphase. c'est une étude ciblée du génome.

En effet, elle ne renseigne que sur des régions chromosomiques ciblées (détection d'un microremaniement dont on connaît le phénotype), soit en fonction d'un tableau clinique évocateur d'un syndrome clinique, soit pour vérifier la présence ou l'absence d'une anomalie chromosomique suspectée après l'étude du caryotype en bandes, Sans orientation clinique ou cytogénétique préalable, la FISH est peu informative. (Malan et al., 2008).

### 2.2.2 LA CGHarray (Hybridation Génomique Comparative)

Consiste à cohybrider la même quantité d'ADN provenant d'un malade et d'un témoin, marqué chacun par un fluorochrome différent, sur les chromosomes d'un sujet normal. Les signaux générés par les deux fluorochromes sont numérisés et un rapport de leurs intensités respectives est établi au niveau des bandes de chacune des paires chromosomiques. Il ne s'agit donc plus d'une analyse morphologique des chromosomes d'une métaphase d'un patient, mais de celle du contenu global en ADN de ce patient. Cependant, sa résolution reste celle de la bande chromosomique (5-10 Mb) du fait ration d'intensité des fluorochromes établi au niveau de bandes chromosomiques.

la CGH est une technique permet l'étude globale du génome la plus performante pour le diagnostic des déséquilibres génomiques. (Romana et al., 2008).



Your complimentary  
use period has ended.  
Thank you for using  
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to  
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



Your complimentary  
use period has ended.  
Thank you for using  
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to  
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

# *Matériel et Méthodes*



Il s'agit d'une étude rétrospective et prospective des cas d'anomalies de différenciation sexuelle, prises en charge par le service de cytogénétique du CPMC entre 2009 et 2014. Le travail est fondé sur l'exploitation des dossiers cliniques des patients orientés vers ce laboratoire par différents services (endocrinologie, pédiatrie, gynécologie). Durant cette période, 125 cas d'anomalies de différenciation sexuelle sont colligés. Parmi les patients analysés au niveau de ce service 04 ont été choisis.

## 2. prélèvement

Une consultation est assurée par les médecins du service pour compléter les renseignements fournis par les spécialistes et orienter leurs thérapeutiques. Une prise de photo des patients est faite.

Un prélèvement sanguin est effectué dans des conditions stériles au niveau du pli du coude du patient après pose d'un garrot. Le sang est récupéré dans des tubes héparinés de 5ml. Si la culture cellulaire est lancée le jour même, les tubes sont maintenus à température ambiante, sinon ils sont conservés au réfrigérateur à (+4°C) pendant 10 jours au maximum. Les tubes sont ensuite remis à température ambiante deux heures avant le lancement des cultures. La quantité de sang prélevé est de 10 ml par patient.

### 3.1. Etapes communes entre la cytogénétique conventionnelle et moléculaire

#### 3.1.1. Mise en culture (0h)

Le travail se fait sous une hotte stérile à flux laminaire vertical (Jouan®) avec du matériel stérile (stérilisation aux Ultraviolets pendant 15 min) afin d'éviter toute contamination qui pourrait altérer la culture.

#### Protocole

Deux tubes coniques sont préparés pour chaque patient contenant 8 ml de milieu de culture RPMI complet (Roswell Park Memorial Institute medium complet). Les tubes du sang sont homogénéisés par retournement avant d'ajouter 700 µl de sang dans chaque tube. Ensuite, ces derniers sont homogénéisés par retournement. Puis ils sont inclinés sur un plateau et ce dernier sera placé dans l'étuve à 37°C. sous 0.5% de CO<sub>2</sub> pendant 72h.

#### Solutions utilisées:

\*Le sang 1400µl (700µl dans chaque tube).

\*Le milieu de culture (RPMI complet) :

RPMI Roswell Park Memorial Institute medium 50ml.

SVF sérum de vò u fò tal 10ml.

Pénicilline streptomycine 100µl.

L-glutamine 1000µl.

PHA P Phytohémagglutinine P 0.125ml.

PHA M Phytohémagglutinine M 0.300ml.

Héparine 0.100ml.



### **5-fluoro-2-déoxy Uridine) (50h d'incubation)**

Cette étape consiste à bloquer les cellules arrivées dans leur croissance au milieu de la phase S, ainsi toutes les cellules n'ayant pas encore atteint ce stade rejoindront les autres cellules.

#### **Protocole**

Sous la hotte à flux laminaire, 500 µl de FrdU sont ajoutés dans chaque tube de culture. Les tubes sont homogénéisés par retournement et ils sont remis à l'incubation à 37° C sous 0.5% de CO<sub>2</sub> et pendant 16 h.

### **3.1.3. Levée du blocage par la thymidine (66 h d'incubation)**

Cette étape consiste à relancer la division cellulaire pour que toutes les cellules en culture puissent atteindre le stade Métaphase.

#### **Protocole**

Les tubes de culture sont homogénéisés par retournement avant d'ajouter 100 µl de thymidine dans chaque tube. Ces derniers sont ensuite homogénéisés par retournement aussi et ils sont remis à l'incubation à 37° C sous 0.5% de CO<sub>2</sub> pendant 5 h.

### **3.1.4. Arrêt des cultures par la colchicine (72h d'incubation)**

Cette étape consiste à stopper la progression des chromosomes dans la cellule en métaphase.

#### **Protocole**

Les tubes de cultures sont homogénéisés par retournement puis, 65 µl diluée à 20 mg/l de colchicine sont ajoutés dans chaque tube. Ils sont ensuite homogénéisés aussi par retournement et ils sont remis à l'incubation à 37°C sous 0.5% de CO<sub>2</sub> pendant 55 minutes.

### **3.1.5. Choc hypotonique**

Cette étape consiste à éclater les membranes cytoplasmiques des cellules en culture.

#### **Protocole**

Les tubes sont agités puis, ils sont centrifugés à 1200 t/min pendant 8 min à température ambiante. Ensuite, le surnageant est aspiré avec une pipette pasteur liée à une pompe à vide. Ensuite, le culot est remis en suspension avec 8 ml de sérum de choc (sérum de vò u fò tal dilué à 1/6eme). Finalement, les tubes sont agités rigoureusement pendant 2 min et ils sont remis à l'incubation sans bouchons sous 0.5% de CO<sub>2</sub> pendant 15 min.

### **3.1.6. Préfixation**

Cette étape consiste à un arrêt de choc hypotonique par acidification du milieu.

#### **Protocole**

Un volume de 2 ml du fixateur carnoy (1/4 acide acétique + 3/4 méthanol) est ajouté dans chaque tube de culture. Ensuite les tubes sont agités par retournement et centrifugés pendant 4 min à 1200 t/min à +4 °C.

Cette étape consiste à maintenir définitivement dans un état stable les chromosomes obtenus.

### **Protocole**

Le surnageant est aspiré par une pipette pasteur branchée à une pompe à vide et 8 ml de fixateur carnoy sont ajoutés dans chaque tube de culture. Puis, les tubes sont agités au vortex. Après cela, les tubes sont centrifugés pendant 4 min à 1200t/min à +4°C. Cette étape est répétée une deuxième fois.

Le surnageant est aspiré à l'aide d'une pipette pasteur liée à une pompe à vide et 5 ml du fixateur carnoy sont ajoutés dans chaque tube. Enfin, les tubes sont placés au congélateur à -20°C jusqu'à l'étalement.

### **3.1.8. Etalement**

Cette étape permet la répartition des métaphases sur une lame.

### **Protocole**

D'abord, les tubes sont centrifugés à 1200 trs/min pendant 4 min à +4°C. Le surnageant de chaque tube est aspiré par une pipette pasteur liée à une pompe à vide en laissant un peu de fixateur carnoy au-dessus des culots. Ensuite, les culots sont suspendus délicatement sans faire remonter le milieu au-delà de la partie effilée de la pipette pasteur.

L'étalement se fait patient par patient. Le nom complet du patient est mentionné obligatoirement sur la lame. Deux gouttes (côte à côte) sont déposées sur chaque lame (les lames sont placées dans de l'eau distillée à + 4°C au moins 24h avant l'étalement). Le surplus du liquide est supprimé en essuyant avec du papier absorbant vers l'extérieur de la lame avec le doigt. Puis, les lames sont laissées sécher sur un plateau recouvert de papier filtre pendant 24h. Finalement, les lames sont observées au microscope à fluorescence (Gr X10) afin de s'assurer du nombre et de la qualité des mitoses.

## **3.2. Etapes spécifiques à la cytogénétique conventionnelle**

### **3.2.1. Traitement des lames en bandes R**

Il s'agit d'une dénaturation thermique ménagée en milieu ionique (Earl : Earls balanced salt solution.) à pH 6.5) à 87°C, en un temps défini dépendant des conditions thermiques et d'hygrométrie de l'étalement et de la dénaturation.

### **Protocole**

Tout d'abord, un pot de porcelaine est rempli d'EARL est déposé dans un bain marie préchauffé à 87°C. Ensuite, les lames sont trempées dans l'eau distillée pendant 30 secondes pour les hydrater. Puis, elles sont transférées dans le pot d'EARL et laissées dans le bain marie de 20 à 25min (dénaturation thermique). Après, elles sont transférées dans un pot de porcelaine contenant de l'eau distillée. Puis, les lames sont plongées dans un bain de Giemsa (3ml de Giemsa + 3ml du tampon phosphate à pH 6.7 avec une quantité d'eau distillée suffisante pour 100ml) contenu dans un pot de porcelaine pendant 15min. Enfin les lames sont rincées à l'eau du robinet et laissées sécher à l'air libre.

Le marquage des chromosomes est observé au microscope à fluorescence à faible grossissement (x10) afin de repérer les mitoses. Puis, l'huile à immersion est ajoutée avant de passer au fort grossissement (x100).

La capture se fait par un logiciel d'acquisition d'image **MetaSystem IKAROS** qui aide à acquérir des images, les traiter et à classer les chromosomes.

### **3.3. Etapes spécifiques à la cytogénétique moléculaire la FISH (fluorescence *in situ*. hybridization)**

#### **3.3.1. Préparation des lames échantillons**

##### **Protocole**

Après l'étalé, les lames ont été laissées sécher. Puis, elles sont prolongées dans du 2xSSC (20 ml 20xSSC + 180 ml d'eau distillée) pendant 2min à température ambiante sans agitation. Ensuite, elles sont déshydratées dans une série de bain d'éthanol (70%, 85% et 100%), 2 min chaque bain à température ambiante.

#### **3.3.2. Prè-dénaturation**

##### **Protocole**

Les sondes sont retirées du congélateur à -20°C et laissées préchauffer à température ambiante. 10 µl de sonde sont déposés sur l'échantillon et couvrir avec une lamelle. Sceller avec du rubber ciment et laisser sécher.

La dénaturation de l'échantillon et de la sonde se fait dans le thermobrite à 75°C pendant 2min.

#### **3.3.3. Dénaturation et Hybridation**

##### **Protocole**

La dénaturation de l'échantillon et de la sonde se fait dans le thermobrite à 75°C pendant 2min.

Les lames sont incubées dans le thermobrite pendant 18 h à 37°C pour l'hybridation.

#### **3.3.4. Lavage post hybridation et validation**

##### **Protocole**

La lamelle est retirée et les traces de colles restantes sont éliminées. La lame est plongée dans le tampon (0,45\*SSC (pH 7,0)) à 72°C pendant 2 min, puis plongée la dans du tampon 2xSSC, 0,05% tween 20 (pH 7,0) à température ambiante pendant 30secondes sans agitation. 10µl du DAPI (4,6-diamidino-2-phénylindole antifading.) sont déposés sur la lamelle après l'avoir égoutté. Et cette dernière sera déposée et collée sur la lame qui porte l'échantillon. Laisser la coloration apparaitre à l'abri de la lumière pendant 10 min. Les préparations sont visualisées au microscope à fluorescence.

La capture se fait par un logiciel d'acquisition d'image **MetaSystem ISIS**.

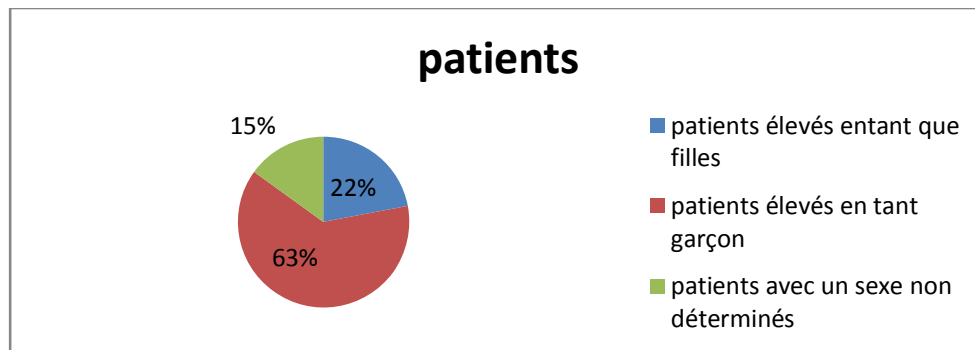


Your complimentary  
use period has ended.  
Thank you for using  
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to  
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

# *Résultats et Discussion*

Depuis l'année 2009, le laboratoire de cytogénétique du CPMC a fait un recrutement national des patients orientés vers ce dernier pour suspicion d'une ambiguïté sexuelle, soit un effectif de 125 patients. La majorité des ambiguïtés concerne les patients élevés en tant que garçon qui représente 63% des cas (79 patients), suivie des patients élevés en tant que filles avec 22% des cas (28 patients) et enfin les enfants avec un sexe non déterminé avec une proportion de 15% des cas (18 patients) (Figure III).

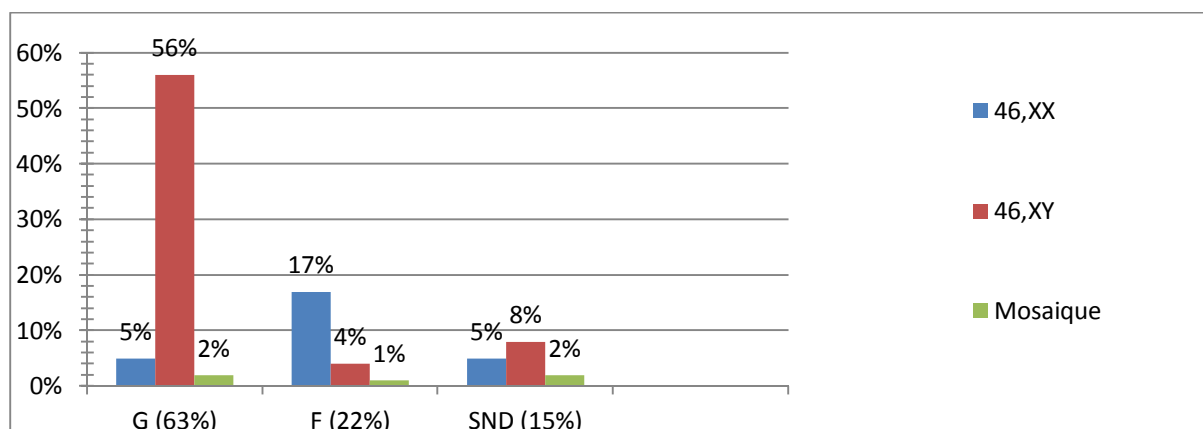


**Figure III :** Répartition des ambiguïtés sexuelles diagnostiquées dans le laboratoire de cytogénétique du CPMC.

Les résultats du caryotype montrent que sur les 28 patients (22%) reçus en tant que filles, 22 patients (17%) ont un caryotype féminin normal: 46,XX, 5 patients (4%) ont un caryotype opposé au sexe civil: (46,XY) et un seul patient (1%) a présenté une formule chromosomique en mosaïque.

Concernant les 79 patients (63%) reçus en tant que garçons, 70 patients (56%), ont un caryotype masculin normal : 46,XY, 7 patients (5%) présentent un caryotype féminin: 46,XX et 2 patients (2%) ont présenté une anomalie en mosaïque.

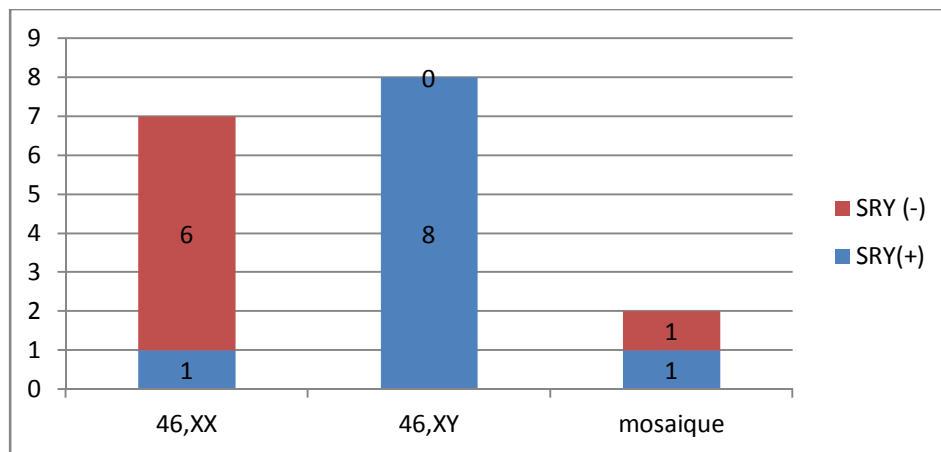
En ce qui concerne les 18 patients (15%) reçus avec un sexe non déterminé, la majorité des cas, soit 9 patients (8%), ont un caryotype masculin: 46,XY, 7 patients (5%) ont un caryotype féminin: 46,XX et 2 patients (2%) présentent un caryotype en mosaïque (Figure IV).



**Figure IV :** Répartition des cas d'ambiguïté sexuelle selon le résultat des caryotypes obtenus au niveau du laboratoire de cytogénétique CPMC.

En conclusion, une FISH a été effectuée pour certains cas de la clinique et de la pathologie. Cette dernière cible le gène SRY (SEX determined region of Y) qui intervient dans le déterminisme du sexe masculin.

Sur les 17 patients analysés par FISH, 7 patients avec un caryotype 46,XX (dont 4 patients reçus en tant que garçons, 2 patients reçus en tant que filles et 1 patient reçu avec un sexe non déterminé) 6 patients représentent une FISH normale (absence du gène SRY) et un seul patient reçu en tant que garçon a présenté une FISH anormale (présence du gène SRY), 8 patients avec un caryotype 46,XY (dont 6 patients reçus en tant que garçons, 1 patient reçu en tant que fille et 1 patient reçu avec un sexe non déterminé) ont présenté une FISH normale (présence du gène SRY) et 2 patients avec un caryotype en mosaïque (dont 1 patient reçu en tant que garçon et l'autre reçu avec un sexe non déterminé) un patient présente une FISH normale pour les deux populations cellulaires (46,XX absence SRY et 46,XY présence du gène). En revanche le deuxième patient dont le caryotype est mosaïque révèle une FISH normale pour la population 46,XX donc absence du gène SRY et une FISH anormale pour les populations 46,XY et 47,XXY où le gène SRY est délété (Figure V).



**Figure V :** Répartition des cas d'ambiguïté sexuelle selon les résultats de l'Hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) obtenues au niveau du même laboratoire.

## 2. Etude cytogénétique

### 2.1. Patiente A

#### a. Clinique

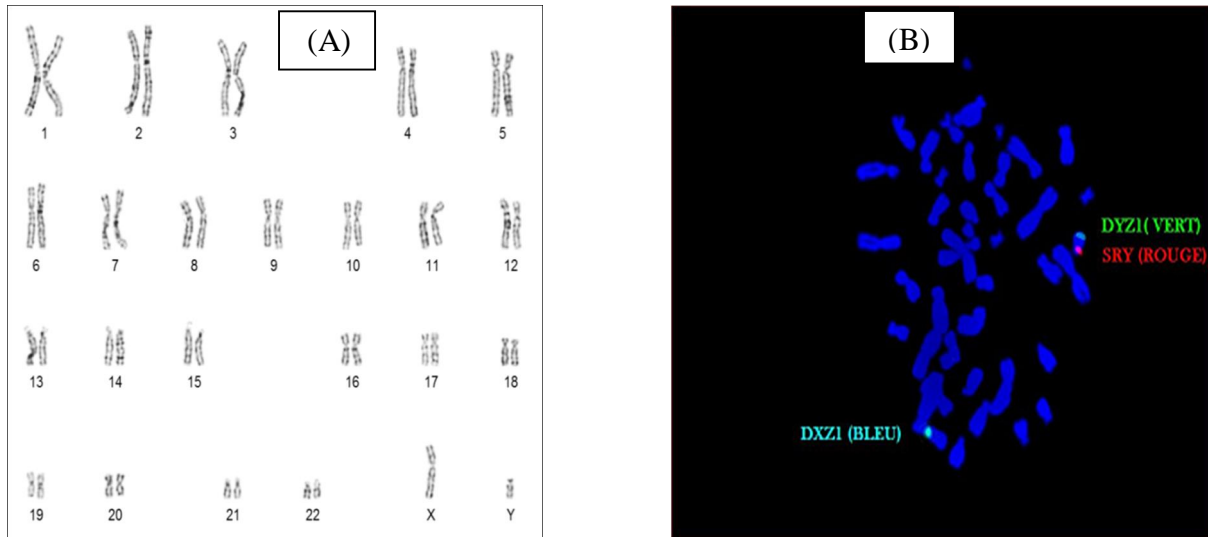
La patiente F.N. âgée de 28 ans (1m82, 70Kg), issue d'un mariage consanguin de troisième degré. elle a été adressée au laboratoire de cytogénétique par le service d'endocrinologie CPMC, pour une ambiguïté sexuelle. La patiente présente des OGE ambigus et une gynécomastie de volume et de taille réduits avec des mamelons normaux. L'échographie abdominale pelvienne révèle la présence des deux testicules ectopique de situation inguinale basse, de taille normale. Le bilan hormonal montre des taux élevés de FSH et de testostérone.

Le caryotype en bandes R de la patiente F.N. révèle un caryotype masculin normal où aucune aberration chromosomique n'est détectée. Bien que le résultat du caryotype confirme le diagnostic suspecté, une FISH a été effectuées à la recherche du gène SRY en utilisant :

Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

rouge, une sonde témoin pour le chromosome Y : DXZI témoin pour le chromosome X de couleur bleue.

Le résultat de cette FISH révèle 5 signaux, un signal bleu correspondant au chromosome X, un signal vert correspondant au chromosome Y et un signal rouge correspondant à la sonde SRY qui confirme la présence de ce gène qui est localisé au niveau Yp11.2, la formule chromosomique de cette patiente est donc (46,XY ish Yp11.2 (SRY+)) (Figure VI).



**Figure VI :** Etude cytogénétique classique et moléculaire de la patiente F.N. qui présente une ambiguïté sexuelle : (A) caryotype en bandes R : la patiente présente un caryotype masculin 46,XY. (B) FISH : présence du signal rouge correspond à la présence du gène SRY.

Cette patiente, présentant un caryotype masculin 46,XY associé à un phénotype féminin, a nécessité une analyse par FISH du gène SRY qui révèle la présence de ce dernier. Le gène SRY implique son expression chez cette patiente, ce qui induit le développement des testicules. Pour des analyses plus précises la patiente a été adressée au laboratoire de biologie moléculaire.

#### Remarque :

Bien que rarement rencontré dans les cas d'intersexualité gonadique, le caryotype XY (SRY positif) est associé à un hermaphrodisme latéral avec un testicule. Cette forme d'anomalie peut être associée à un phénotype féminin.

L'origine de cette anomalie pourrait être liée à :

- Une mutation dans les gènes du déterminisme du sexe interagissant avec le gène SRY, par exemple, des mutations et des translocations dans le gène SOX 9 sont parfois responsables, d'une réversion du sexe mâle en sexe femelle (Paget, 2001).
- Des délétions sur des autosomes, par exemple, la délétion 9p24 entraîne une réversion ou une ambiguïté sexuelle (Bazin, 2002).

#### 1.2.Patient B

Le patient A.A. âgé de 4 ans, issu d'un mariage consanguin, le dernier d'une fratrie de 8 enfants, présente une avance staturopondérale. Il a été adressé au laboratoire de cytogénétique pour suspicion d'une ambiguïté sexuelle liée à une hyperplasie congénitale des glandes



Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

Le pénis est bien développée par rapport à l'âge du patient. Le scrotum hyperpigmenté vide sans testicules palpables. L'écno-abdo-pelvienne révèle la présence d'organe génitaux interne de type féminin (utérus latéralisé à gauche).

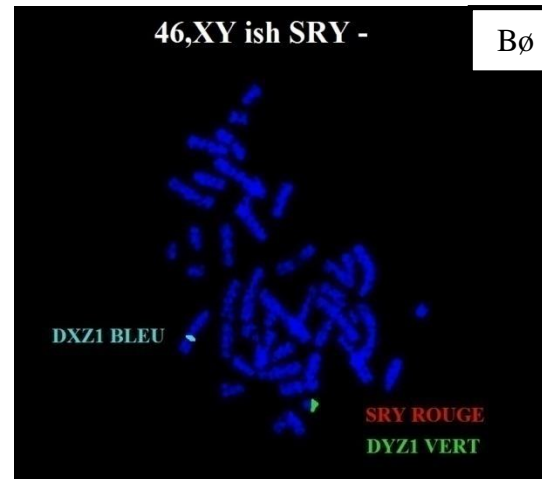
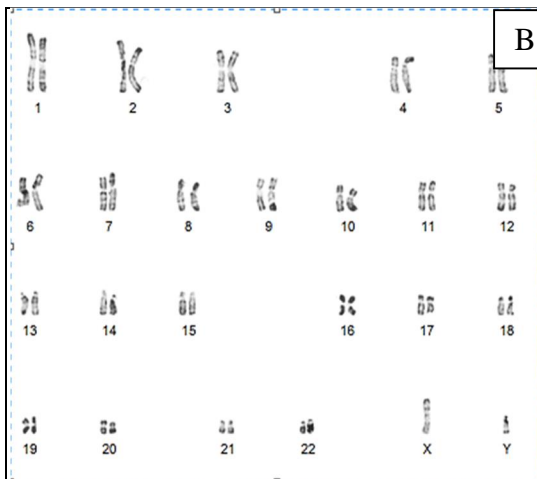
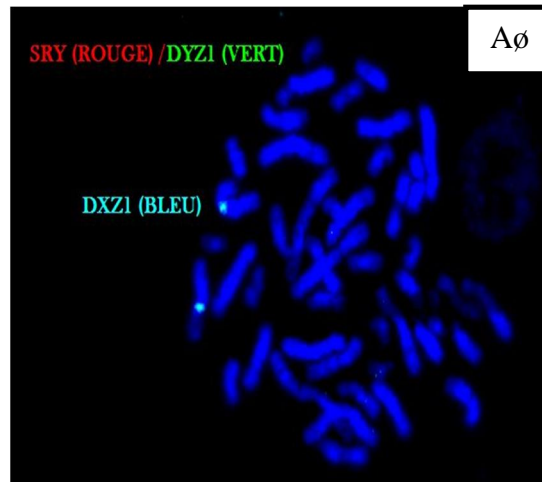
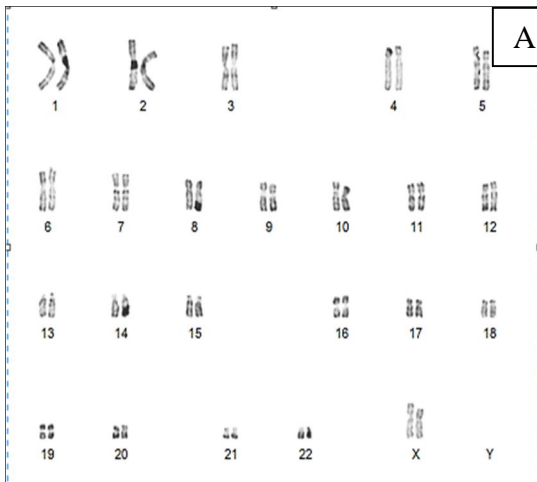
Le caryotype standard de ce patient révèle un mosaïsme constitué de trois populations cellulaires différentes : (66%) des mitose étudiées présentent un caryotype féminin normal 46,XX, (19%) présentent un caryotype masculin normal et la dernière population présentent un chromosome X surnuméraire donc un caryotype 47,XXY (syndrome de Klinefelter) avec un pourcentage de (15%). Afin d'obtenir des résultats plus précise, une FISH a été réalisée à la recherche du gène SRY.

Le résultat de cette FISH est normal pour la population 46,XX, présence de deux signaux bleus correspondant aux chromosomes X et absence des signaux vert et rouge .

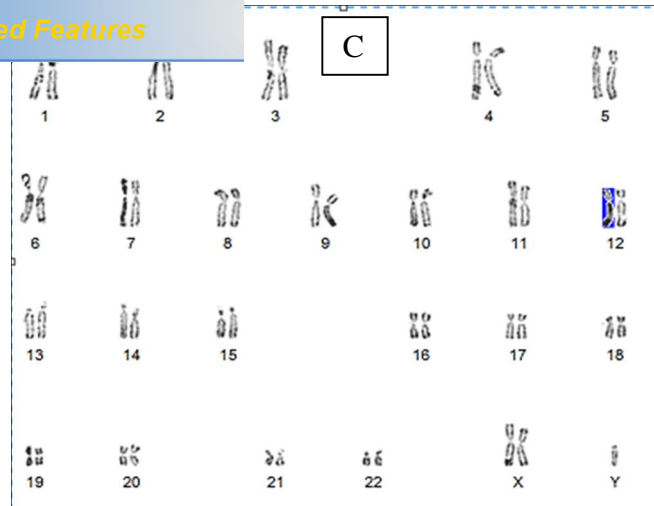
Pour la population 46,XY, présence d'un signal vert correspondant au chromosome Y, un signal bleu correspondant au chromosome X et absence du signal rouge permet de déduire qu'il n'y a pas eu hybridation de la sonde avec le gène SRY.

Pour la population 47,XXY, présence de deux signaux bleus correspondant aux chromosomes X et un signal vert correspondant au chromosome Y et absence du signal rouge révèle que ce gène a été délété (Figure VII).

la formule chromosomique de ce patient est donc (mos 46,XX [71] ish Yp11.2 (SRY-)/ 46,XY [20] ish Yp11.2 (SRY-)/ 47,XXy [16] ish Yp11.2 (SRY-)).







**Figure VII:** Etude cytogénétique du patient 1 qui présente une ambiguïté sexuelle de forme pseudohermaphrodisme masculin : (A), (B) et (C) Caryotype en bandes R révélant trois populations cellulaires différentes respective, (A) 46,XX, (B) 46,XY et (C) 47,XXY. (B) FISH : (A) et (B) l'absence du signal rouge correspond à l'absence du gène SRY.

Ce patient présentant un phénotype masculin avec un caryotype révélant trois populations cellulaires distinctes explique que ce mosaïsme s'est produit en phase post-zygotique par anomalie de ségrégation mitotique d'où dérive la population présentant un X surnuméraire, tandis que la FISH de ce patient révèle un résultat normal pour la population 46,XX (absence du gène SRY) et révèle la délétion du gène SRY dans les deux population 46,XY et 47,XXY. La délétion de ce gène implique sa non expression chez ce patient, ce qui explique le phénotype observé (absence des testicules et présence de l'utérus).

### 1.3. Le patient C

#### a. clinique

Le patient B.M issu d'une consanguinité de 3<sup>ème</sup> degré. Âgé de 10ans (1m36, 35Kg) a été adressé au laboratoire du service d'endocrinologie, pour une prise en charge thérapeutique d'une ambiguïté sexuelle. Le patient présente un phénotype masculin avec organes génitaux ambigus : micropénis, absence de testicule gauche avec testicule droit en place. Le bilan hormonal révèle un taux de testostérone bas. (Les antécédents familiaux : notion d'ambiguïté chez une cousine paternelle).

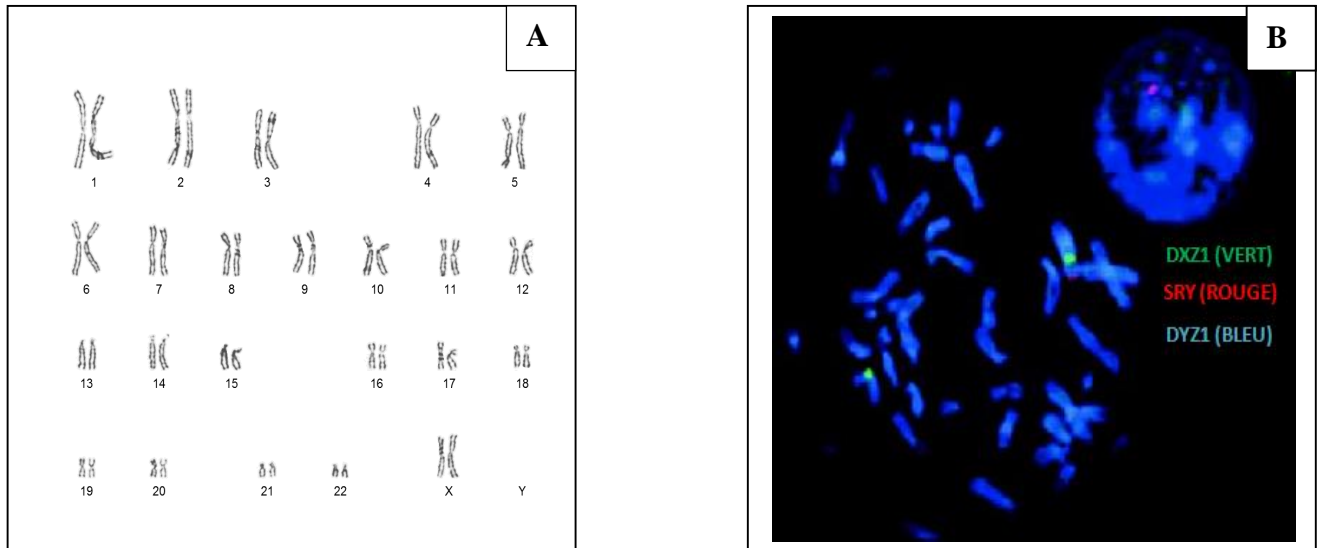
#### b. Résultat cytogénétique

##### c.

Le caryotype standard de ce patient se révèle être un caryotype féminin, avec présence des gonosomes XX. Ce résultat confirme le diagnostic évoqué lors de la consultation (**Figure V**). Afin de déterminer la cause de l'ambiguïté sexuelle que présente ce patient, nous avons réalisé une FISH à la recherche du gène majeur de déterminisme testiculaire SRY porté par le bras court de chromosome Y. La FISH a été réalisée en utilisant : une sonde SRY Yp11.2 (cytoCell) de couleur rouge, une sonde témoin pour le chromosome Y : DYZ1 (cytoCell) de couleur verte et une sonde témoin DXZ1 (cytoCell) du chromosome X de couleur bleue.

Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

de d'un signal bleu correspondant au chromosome X et de la sonde SRY, la formule chromosomique de ce patient est 46,XX,t(11;17)(p11.2;p11.1) (Figure VIII).



**Figure VIII :** Études cytogénétique du patient C présente une ambigüité sexuelle.

(A) Caryotype en bandes R de patient B.M présentant 46 XX. (B) FISH bicolor de la sonde centromérique du chromosome X et de la sonde de séquence unique spécifique du gène SRY (en rouge).

Ce patient, présentant un phénotype masculin avec un caryotype 46XX, nécessite une analyse cytogénétique moléculaire du gène SRY par FISH. Il a été mis en évidence un petit segment de la partie terminale du bras court du chromosome Y sur un des chromosomes X et apparaît comme la conséquence d'un échange terminal entre les séquences d'ADN identique des bras courts des chromosomes X et Y au niveau des sites spécifiques appelées les régions homologues PAR (pseudoautosomique) Xp-Yp (Jack, 2003). Cela est expliqué par le mécanisme de recombinaison génétique homologue initié précisément au stade leptotène par des cassures double-brin de l'ADN au cours de la méiose (crossing-over méiotique) qui est le processus dans lequel le matériel génétique est échangé entre les chromosomes homologues (Guichaoua et al.,2009) (Stephen, 2004). Ces observations ont permis de définir un locus possible pour le gène de détermination testiculaire SRY (qui a été caractérisé par son mécanisme d'action sur la protéine pour laquelle il code, et sur les gènes qu'il pourrait contrôler. Le produit du gène se lie à l'ADN et est capable d'activer la transcription des gènes cibles. Cette liaison est indispensable à la détermination testiculaire). Donc, ça peut être un sexe masculin avec deux chromosomes X : il suffit qu'un des chromosomes X porte le gène SRY ce qui explique alors le phénotype observé (Kutten, 2004).

## 1.4.Le patient D

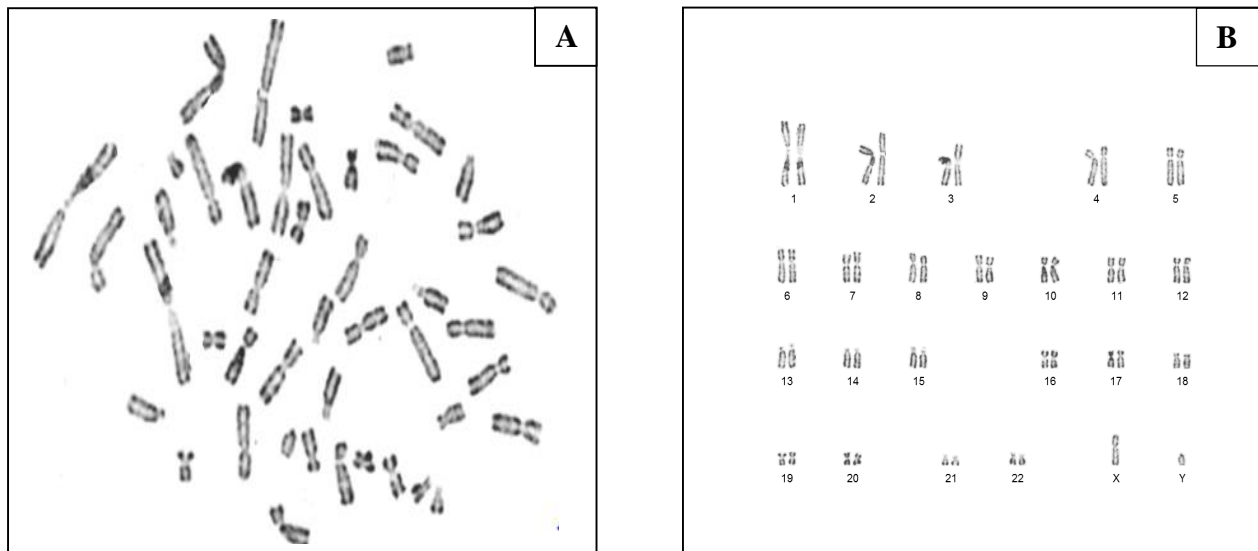
### a. Clinique

La patiente B.F, âgée de 26 ans a été adressée au laboratoire de la cytogénétique pour une suspicion du syndrome de Morris. La patiente présente un phénotype typiquement féminin à

génitaux féminins internes, les testicules de taille normale se trouvant en extra abdominale en regard des grandes lèvres. Le bilan hormonal révèle un taux de testostérone normal.

### b. Résultat cytogénétique

Le caryotype standard de ce patient se révèle être un caryotype masculin, avec présence des gonosomes X et Y (Figure IX). expliquant le phénotype décrit ci-dessus.



**Figure IX : Etude cytogénétique de la patiente D qui présente un syndrome de Morris.**

(A) Métaphase de la patiente B.F. colorée au Giemsa. (B) caryotype en bandes R : la patiente présente un caryotype masculin 46, XY.

Les résultats démontrent une anomalie de testicule féminisant appelé également le syndrome de Morris causée par une insensibilité des tissus périphériques aux androgènes liée à un défaut de récepteur cellulaire correspondant ou à un défaut touchant, soit la transcription du gène soit la liaison nucléaire du complexe stéroïde récepteur (Krichen et al., 2005) ; (Chawnsang, 2002).

Le syndrome du testicule féminisant est une maladie à transmission récessive liée à l'X et est due à une mutation affectant le gène codant pour la synthèse des récepteurs aux androgènes (Schill et al., 2008)

Ce gène est porté par le bras court du chromosome X (X p11-13). Plus de 200 mutations ont été rapportées: des mutations ponctuelles, des délétions complètes ou partielles, pouvant être responsables de plusieurs défauts allant d'une altération plus au moins importante de l'affinité de ces récepteurs à l'absence totale de ces derniers à la surface des cellules (Ethel, 2002).

Malgré le caryotype 46,XY, un déficit androgénique fonctionnel entraîne l'absence de développement du canal de Wolff et la régression du canal de Müller, du fait de la présence de testicules, et donc d'AMH dérivée des cellules de Sertoli, ce qui traduit alors le phénotype observé (Abraham et al., 2006).



Your complimentary use period has ended.  
Thank you for using PDF Complete.

[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



Your complimentary  
use period has ended.  
Thank you for using  
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to  
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

# *Conclusion et perspectives*

sexuelle sont complexes et la cascade qui en découle s'agit d'un équilibre permanent entre les gènes qui entraînent et ceux qui repriment le développement testiculaire ou ovarien, les connaissances actuelles permettent une meilleure prise en charge des patients et de leur famille porteurs d'anomalies à l'aide de la cytogénétique classique et moléculaire. (Ravel et al., 2004).

Toute découverte d'ambiguïté des organes génitaux est un événement traumatogène pour les parents au moment de la naissance de leur bébé ou pour les personnes ambiguës eux même. Cela entre en résonance avec l'importance de la souffrance psychique et dépressive associée à des troubles de l'humeur (désespoir, anxiété, angoisse) (Morel et al., 2009), selon le type de malformation des conséquences fonctionnelles qui peuvent empêcher toute activités sexuelles, nuire à la vie de couple et perturber la fertilité (Gueniche et al., 2008).

Dans cette étude la prise en charge médicale consiste la mise en route des examens chromosomiques, endocriniens et radiologiques, donc le diagnostic d'une ambiguïté sexuelle reste très délicat et nécessite une collaboration multidisciplinaire. (Rajon, 2008).

Au cours de notre travail, nous avons ainsi pu nous combiner avec différentes techniques de cytogénétique et en apprécier les avantages et les limites, et ce en vue de les utiliser pour répondre à une suspicion d'une ambiguïté sexuelle évoquée par un médecin traitant et qui pourrait être provoquée par des anomalies d'ordre chromosomique, qu'elles soit fréquentes ou beaucoup plus rares dans la population.

Le Caryotype permet de donner une vision d'ensemble du génome, mais présente des limites vu l'existence des remaniements cryptiques qui ne peuvent être mis en évidence par cette technique, mais actuellement nous avons des techniques de cytogénétiques moléculaires (FISH, CGH-array) qui sont d'un grand apport vu les informations sur les point de cassures de l'ADN qui sont localiser avec exactitude.

Actuellement on a aussi des techniques de la biologie moléculaire qui sont utilisées dont l'indication peut être orientée par la mise en évidence d'anomalies extra-génitales



Your complimentary  
use period has ended.  
Thank you for using  
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to  
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

# *Références Bibliographiques*



[Click Here to upgrade to  
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

- 1/ Aorahani L., Kicsiszenbaum. (2000) : Histologie et biologie cellulaire : Une introduction à l'anatomie pathologique. Edition *Boeck*. 1<sup>ère</sup> édition : Page 553.
- 2/ ALAOUI BELGHITI YOUSSEF M. (2011). Prise en charge des anomalies de différenciation sexuelle. Thèse de doctorat en médecine, Université sidi Mohamed ben Abdallah, Maroc : P 9.
- 3/ Albert B. et Johnson A. (2002). La biologie moléculaire de l'édition. Cell Garland Science. 4 : 1019-1020.
- 4/ Bargy F., Bouvatier C., Lefèvre H. (2000) : Ambiguïtés sexuelles. *Encycl Méd Chir .Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS*. Page 1.
- 5/ Bazin A. (2002). Bases de cytogénétique préalables à la prise en charge des ambiguïtés sexuelles. *Elsevier SAS*. 15 : 97-9.
- 6/ Beaudry, J.-R. (1985). Génétique générale. (Décarie & Maloine, Eds) (p.501). Paris.
- 7/ Bouvattier C. (2009) : Anomalies du développement sexuel 46, X. *Encycl Méd Chir*. Edition *Elsevier Masson SAS*. Page 1.
- 8/ Bickmore W., Sumner S. (1989): Mammalian chromosome banding-An expression of genome organization. *Trends Genet*. 5: 9-144.
- 9/ Chawnshang C. (2002): Androgens and Androgen Receptor: Syndrome Testicular feminization. Edition *Kluwer*. Page 271.
- 10/ Chouchane L., Sfar S. (2008) : Le projet génome humain : programme fédérateur de la médecine génomique. *Pathologie Biologie*. 56 : 170-175.
- 11/ Eduardo P. (1983) : Biologie cellulaire et moléculaire : Cytogénétique humaine. Edition de *Robertis*. 7<sup>ème</sup> édition : Pages 498-499.
- 12/ Élodie B., Lionel L., Marie D. (2003). Recombinaison homologue et ciblage de gène. *Biologies*. 326 : 51664.
- 13/ Ethel S. (2002): Biology of Women. Edition *Thomson Learning*. 4<sup>ème</sup> édition: Page 115.
- 14/ Goumy C., Gouas L., Roucaute T., Benier C., Buvat A., Veronese L., Tchirkov A., Vago P. (2007). Intérêt des techniques moléculaires de la cytogénétique en reproduction humaine morphologie. 91 :116.
- 15/ Grilliat A-D. , Claude B . (2011) : Psychiatrie de l'enfant : génétique des troubles du développement du jeune enfant. Edition *Brigitte Peyrot*. Page 186.
- 16/ Gueniche k., Jacquot M. , Thibaud E., Polak P. (2013) : L'identité sexuée en impasse. , À propos de jeunes adultes au caryotype XY nées avec une anomalie du développement des organes génitaux et élevées en fille. *Neuropsychiatrie de l'enfance et de l'adolescence*. 56 : 377-385
- 17/ Guichaoua M.-R. , Geoffroy-Siraudin C., Tassistro V., Ghalamoun-Slaimi R., Perrin J., Metzler-Guillemain. (2013) : Chromosomes sexuels et méiose. 37 : 895-900.
- 18/ Jack J. (2003) : Génétique moléculaire humain : Les éléments de base de la génétique. Edition de *Boeck*. 1<sup>ère</sup> édition : Page 66.
- 19/ Jacqueline G-L., Goyffon M., Ménager M-T. (2009) : Toxicologie nucléaire environnementale et humaine : Nature des dommages à l'ADN et mécanismes de réparation. Edition *Lavoisier*. Page 192.
- 20/ Jacques R. (2011) : Signalisation cellulaire et cancer. Edition *springer*. Page 254.
- 21/ Jeanpierre M., Jonveaux P., Lacombe D., Leporrier N., Lyonnet S., Moraine C. (2004) : Génétique médicale : Syndrome microdélétionnels. Edition *Masson*. Page 111.
- 22/ Kassis M., Assaf Z., Kieffer F., Magny J.-F. et Voyer M. (2002). Les pathologies de la détermination et de la différenciation sexuelle : période néonatale. *Elsevier*. 15 : 121-6.



[Click Here to upgrade to  
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

- a L. , Ellouze S. , Mnif M., Khabir A., Ketata A. ,  
(2015) : Syndrome du testicule féminisant associé à des  
hamartomes multiples et à des leiomyomes paratesticulaires bilatéraux. 26 : 9806983.
- 24/ Kuttann F., Acremont MF. , Mowszowicz. I. (2003) : Endocrinologie-Nutrition :  
Anomalies de la différenciation sexuelle. *Encycl. Méd. Chir. Editions Scientifiques et  
Médicales Elsevier SAS*. Page 1.
- 25/ Malan V., Lapierre J.M., Vekemans M. et Romana S.P. (2008). Array CGH: A revolution  
in medical cytogenetics. *Elsevier Masson*. 28 : 245-251.
- 26/ Morel-Journel N., Courtois F., Paparel P., Ruffion A., Carrier S., Leriche A. (2009) :  
Traitement chirurgical à l'âge adulte des séquelles de malformations sexuelles congénitales  
majeures. *Sexologies*. 18 : 147-155.
- 27/ Noel M., Chevenne D., Nicolas M., Rigal O., Kertsz G., Draï L., Porquet D. et  
Guibourdenche J. (2003). :Biochemical investigations of the testicular tissue: establishment of  
reference values and their clinical interest. *Elsevier*. 18 : 2776282.
- 28/ Paget R. (2001). Etude cytogénétique et moléculaire d'un cas d'intersexualité chez le  
chien et le cheval. Thèse de doctorat en science vétérinaire, Ecole nationale vétérinaire  
Toulouse, France : 67-79.
- 29/ Paul P. (1989) : Cytogénétique des mammifères d'élevage. Edition *INRA*. Page 17.
- 30/ Pienkowsk C., Tauber M. (2009) : Le syndrome de Turner. Edition *Springer*. Page 20
- 31/ Quintana-Murci I., Jamain S. et Fellous M. (2001). Origine et évolution des chromosomes  
sexuels des mammifères. *Life Sciences*. 324 : 1611.
- 32/ Rajon A.-M. (2008) : Ce que nous apprennent les parents d'enfants porteurs d'ambiguïté  
génitale. *Neuropsychiatrie de l'enfance et de l'adolescence*. 56 : 370-376.
- 33/ Rass E. , Bertrand P., Grabarz A., Lopez B.-S. (2012) : Réparation des cassures double-  
brin de l'ADN, un mécanisme peut en cacher un autre : la ligature d'extrémités non  
homologues alternative. *Cancer/Radiothérapie*. 16 : 1-10.
- 34/ Ravel C., Chantot-Bastarud S. et Siffroi J. P. (2004). Molecular mechanisms in sex  
determination: from gene regulation to pathology. *Elsevier*. 32 : 584-594.
- 35/ Robert J.M., Plauchu H., Giraud F., Mattéi J.F. (1977) : génétique et cytogénétique  
cliniques. Edition *Flammarion*. Pages 97-99
- 36/ Ruffié J., Colombies P. (1985) : Génétique générale et humaine. Edition *Masson*. 3<sup>ème</sup>  
édition : Page 68.
- 37/ Schill W.-B. , Comhaire F.H., Hargreave T.B. (2008) : Traité d'andrologie à l'usage des  
cliniciens. Edition *Springer*. Page 466.
- 38/ Stephen D. (2004) : Biologie : Génétique. Edition de *Boeck*. 1<sup>ère</sup> édition : Page 231.
- 39/ Stankiewicz P., Lupski JR. (2002): Molecular evolutionary mechanisms for genomic  
disorders. *Curr Opin Genet*. 12:312-319.
- 40/ Tijo J. et Levan A. (1956). The chromosome number in man. *Heriats*. 42: 1-6.
- 41/ Veitia R., Nunes M., McElreavey K. et Fellous M. (1997). Déterminisme et  
différenciation sexuels chez l'homme : de la pathologie aux gènes. *Elsevier*. (Supp12): 118s-  
120s.



**PDF**  
Complete

*Your complimentary  
use period has ended.  
Thank you for using  
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to  
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

La différenciation sexuelle dépend d'une succession d'événements dont chaque étape peut être le siège de dysfonctionnements aboutissant à une ambiguïté sexuelle. Les troubles du développement sexuel peuvent être causés par des anomalies génétiques (chromosomiques) ou hormonales. Ces anomalies, qui sont représentées essentiellement par : Les pseudohermaphrodismes masculin révèle une insuffisance de virilisation d'un patient XY, les pseudohermaphrodismes féminins qui présentent un excès de virilisation d'un patient XX, et les hermaphrodismes vrais exceptionnellement avec une présence d'ovotestis.

L'objectif de notre travail est la mise en évidence des anomalies chromosomiques spécifiques chez les patients atteints d'une ambiguïté sexuelle par la familiarisation des techniques de cytogénétique, le caryotype et l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH).

Les résultats obtenus montrent que le caryotype offre l'avantage d'analyser les anomalies cytogénétiques qui affectent chacun de nos chromosomes avec un pouvoir réolutif limité, soulignant la nécessité d'utiliser des techniques plus résolutive, telles que la FISH, pour mettre en évidence des microremaniements chromosomiques en cause dans l'étiologie de certaines pathologies humaines.

**Mots clés :** ambiguïté sexuelle, pseudohermaphrodisme masculin, pseudohermaphrodisme féminin, hermaphrodisme vrais, cytogénétique, caryotype, FISH.