

Université de Montréal

**Régions de susceptibilité dans les remaniements du
chromosome Y et mosaïcisme: Facteurs de risque du
développement sexuel anormal**

par

Mélanie Beaulieu Bergeron

Département de pathologie et biologie cellulaire

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en Pathologie et biologie cellulaires
option Cytogénétique

Janvier 2011

© Mélanie Beaulieu Bergeron, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

**Régions de susceptibilité dans les remaniements du
chromosome Y et mosaïcisme: Facteurs de risque du
développement sexuel anormal**

présentée par :

Mélanie Beaulieu Bergeron

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Luc L. Oigny, président-rapporteur

Nicole Lemieux, directrice de recherche

Emmanuelle Lemyre, co-directrice

Céline Huot, membre du jury

Josée Lavoie, examinatrice externe

Jean St-Louis, représentant du doyen de la FESP

Résumé

Le développement sexuel est un processus complexe qui dépend de nombreux gènes, une mutation pouvant entraîner un développement sexuel anormal. Par ailleurs, des anomalies chromosomiques peuvent avoir des répercussions importantes sur la détermination gonadique, surtout lorsqu'il s'agit du chromosome Y puisqu'il porte le gène clé du développement sexuel masculin.

Premièrement, nous avons identifié par cytogénétique moléculaire le point de cassure chez 5 patients avec une translocation X;Y et 10 patients avec un chromosome Y isodicentrique. Nous avons ainsi démontré que certaines régions sont plus à risque d'être remaniées, notamment lorsqu'elles contiennent des palindromes ou d'autres séquences répétées. Nous avons également établi une relation entre la distance séparant le centromère et le point de cassure et l'instabilité des chromosomes Y isodicentriques lors des divisions cellulaires.

Deuxièmement, nous avons étudié en cytogénétique les gonades de 22 patients avec un chromosome Y normal ou remanié et présentant un développement sexuel anormal. Nous avons mis en évidence la perte du chromosome Y remanié dans une majorité de cellules gonadiques des 10 patients étudiés, expliquant leur phénotype sexuel anormal. Cependant, chez 11 des 12 patients avec un chromosome Y normal, aucun mosaïcisme expliquant clairement leur détermination gonadique anormale n'a été retrouvé.

Finalement, nous avons analysé par immunohistochimie les gonades dysgénésiques de 30 patients avec une anomalie du développement sexuel et un chromosome Y normal ou remanié. Nos travaux ont montré la présence de cellules germinales immatures au sein de cordons sexuels primitifs sous forme de tissu gonadique indifférencié dans 15 gonades, dont 9 ont évolué en tumeur gonadique. Dans 13 autres gonades, ces cellules germinales immatures avaient disparues par apoptose.

Dans l'ensemble, notre recherche met en évidence la susceptibilité du chromosome Y à subir des remaniements et à être instable lors des divisions cellulaires, et indique que le mosaïcisme peut avoir des répercussions sur la détermination gonadique. Nos travaux montrent également que le tissu gonadique indifférencié peut évoluer vers deux entités, une tumeur gonadique ou une bandelette suite à l'apoptose des cellules germinales, mettant en lumière la nécessité d'analyser le tissu gonadique des patients XY avec dysgénésie gonadique dont les gonades sont laissées en place.

Mots-clés: cytogénétique; chromosome Y; remaniements infrastructuraux; régions de susceptibilité; mosaïcisme; tissu gonadique; développement sexuel normal; désordres du développement sexuel; tissu gonadique indifférencié; tumeurs gonadiques

Abstract

Sexual development is a complex process which depends on numerous genes, mutations possibly resulting in an abnormal sexual development. Furthermore, chromosome abnormalities can have important repercussions on gonadal determination, especially when it comes to the Y chromosome since it carries the master gene of male sexual development.

First, we identified by molecular cytogenetics the breakpoint in 5 patients with an X;Y translocation and 10 patients with an isodicentric Y chromosome. We were thus able to show that some regions are more at risk of being rearranged, especially when they contain palindromes or other repeated sequences. We were also able to establish a relationship between the distance separating the centromere from the breakpoint and instability of isodicentric Y chromosomes during cell divisions.

Second, we studied by cytogenetics the gonads of patients with a normal or rearranged Y chromosome and presenting an abnormal sexual development. We demonstrated loss of the rearranged Y chromosome in a majority of gonadal cells of the 10 analyzed patients, explaining their abnormal sexual phenotype. On the other hand, in 11 of the 12 patients with a normal Y chromosome, no mosaicism clearly explaining their abnormal gonadal determination was found.

Finally, we also analyzed by immunohistochemistry the dysgenetic gonads of 30 patients with an abnormal sexual development and a normal or rearranged Y chromosome. We showed the presence of immature germ cells in primitive sex cords as undifferentiated gonadal tissue in 15 gonads, including 9 that evolved in a gonadal tumor. In 13 other gonads, these immature germ cells had disappeared through apoptosis.

Altogether, our research demonstrates that the Y chromosome is susceptible to rearrangements and can be unstable through cell divisions, and that mosaicism may have repercussions on gonadal determination. Our work also shows that undifferentiated gonadal tissue can evolve in two entities, a gonadal tumor or a streak following apoptosis of germ cells, thus emphasizing the necessity of studying the gonads of XY patients with gonadal dysgenesis when gonads are left in place.

Keywords: cytogenetics; Y chromosome; infrastructural rearrangements; susceptibility regions; mosaicism; gonadal tissue; sexual development; disorders of sex development; undifferentiated gonadal tissue; gonadal tumors

A.1.4.2.1	Variation de la longueur de l'hétérochromatine en Yq12	49
A.1.4.2.2	Inversion péracentrique.....	50
A.2	Le développement sexuel.....	52
A.2.1	Les généralités.....	52
A.2.2	Les anomalies du développement sexuel	56
A.2.2.1	Classification.....	56
A.2.2.1.1	Désordres de la différenciation génitale.....	59
A.2.2.1.2	Désordres de la détermination gonadique	61
A.2.2.2	Tumeurs gonadiques.....	64
A.2.2.3	Tissu gonadique indifférencié	66
A.3	Les anomalies des chromosomes sexuels.....	68
A.3.1	Les anomalies de nombre.....	68
A.3.1.1	Origines et mécanismes.....	69
A.3.1.2	Impacts phénotypiques généraux	73
A.3.2	Les anomalies de structure	74
A.3.2.1	Origines et mécanismes.....	74
A.3.2.2	Impacts phénotypiques généraux	84
A.4	Les patients, les spécimens utilisés et la description des outils de travail	85
A.4.1	L'approbation éthique et les patients sélectionnés	85
A.4.2	Les spécimens utilisés	86
A.4.2.1	Lymphocytes du sang périphérique.....	86
A.4.2.2	Fibroblastes cutanés et tissu gonadique frais	88
A.4.2.3	Liquide amniotique.....	89
A.4.2.4	Tissu gonadique fixé	90
A.4.3	L'analyse caryotypique.....	90
A.4.4	L'immunohistochimie.....	92
A.4.5	L'hybridation <i>in situ</i> en fluorescence (FISH).....	93
A.4.5.1	Principes généraux	93
A.4.5.2	Sondes utilisées	96
A.4.5.2.1	Sondes commerciales	97
A.4.5.2.2	Chromosomes artificiels de bactéries (BACs).....	97

A.4.5.2.3	Autres sondes	100
A.4.5.3	Localisation des sondes	101
A.4.6	Les micropuces.....	102
A.5	Les hypothèses, les objectifs et l'organisation du travail	104
A.5.1	Les hypothèses de travail	104
A.5.2	Les objectifs et l'organisation du travail.....	105

Chapitre 1 - Régions de susceptibilité et mosaïcisme dans les remaniements du chromosome Y 109

Article 1 - Clinical Genetics 2006; 70: 145-150. *Phenotypic variability in isodicentric Y patients: Study of nine cases.*..... 112

Article 2 - Accepté avec corrections mineures pour publication dans l'American Journal of Medical Genetics Part A. *Correlation between intercentromeric distance, mosaicism and sexual phenotype: Molecular localization of breakpoints in isodicentric Y chromosomes.*..... 126

Article 3 - Sexual Development 2011; 5: 1-6. *Identification of new susceptibility regions for X;Y translocations in patients with testicular disorder of sex development.* 153

Chapitre 2 - Facteurs de risque et étiologie des tumeurs gonadiques chez les patients avec une anomalie du développement sexuel..... 168

Article 4 - Pediatric and Developmental Pathology 2010; 13: 66-71. *Co-existence of a choriocarcinoma and a gonadoblastoma in the gonad of a 46,XY female: A SNP array analysis.* 170

<u>Article 5</u> - Accepté avec corrections mineures pour publication dans <i>Pediatric and Developmental Pathology</i> . <i>Undifferentiated gonadal tissue, Y chromosome instability and gonadal tumors in XY gonadal dysgenesis</i>	184
Chapitre 3 - Altérations génétiques rares pouvant causer un développement sexuel anormal	217
<u>Article 6</u> - American Journal of Medical Genetics Part A 2006; 140A: 1768-1772. <i>Male pseudohermaphroditism and gonadal mosaicism in a 47,XY,+22 fetus</i>	220
<u>Article 7</u> - Prenatal Diagnosis 2009; 29: 528–530. <i>Diagnosis of true hermaphroditism in a fetus with acampomelic campomelic dysplasia</i>	234
<u>Article 8</u> - En préparation. <i>Functional Xp disomy and X;Y translocation in a female with gonadal dysgenesis: FISH and CGH array analyses</i>	243
Discussion générale	262
B.1 Les mécanismes sous-jacents aux remaniements de structure les plus fréquents du chromosome Y	263
B.1.1 Les chromosomes Y isodicentriques.....	263
B.1.1.1 Palindromes et séquences répétées	263
B.1.1.2 Hétérochromatine Yq12	266
B.1.2 Les translocations X;Y	268
B.1.2.1 Gènes <i>PRKX</i> et <i>PRKY</i>	268
B.1.2.2 Séquences HERVs et Alu	270
B.1.2.3 Territoires chromosomiques dans le noyau	271
B.2 L'instabilité des chromosomes Y remaniés ou normaux dans les différents tissus	273
B.2.1 Les chromosomes Y isodicentriques.....	273
B.2.2 Les translocations X;Y	279

B.2.3	Les chromosomes Y normaux.....	281
B.2.3.1	Nature particulière de la région centromérique du chromosome Y.....	281
B.2.3.2	Microdélétions du chromosome Y et région DYZ19	283
B.3	Les altérations génétiques pouvant causer un développement sexuel anormal	285
B.3.1	Les individus XY avec un chromosome Y normal ou remanié	285
B.3.1.1	Causes les plus fréquentes	285
B.3.1.2	Causes rares	288
B.3.1.2.1	Gène <i>NROB1</i>	288
B.3.1.2.2	Gènes <i>SOX8</i> , <i>SOX9</i> et <i>SOX10</i>	291
B.3.1.3	Cas familiaux.....	296
B.3.2	Les individus XX avec un chromosome X normal ou remanié	299
B.3.2.1	Causes les plus fréquentes	299
B.3.2.2	Causes rares	302
B.3.2.3	Cas familiaux.....	305
B.4	La pathogenèse des tumeurs gonadiques et les implications du tissu gonadique indifférencié dans les gonades dysgénésiques	307
B.4.1	Le modèle de pathogenèse des tumeurs gonadiques.....	307
B.4.1.1	Gène <i>TSPY</i>	308
B.4.1.2	Autres gènes impliqués.....	310
B.4.2	Les implications du tissu gonadique indifférencié dans les gonades dysgénésiques.....	313
	Conclusion générale	320
	Bibliographie générale	329
	Annexes	ccclxxxiii
	<u>Article</u> - Cytogenetic and Genome Research 2009; 125: 176-185. <i>Frequency of chromosome healing and interstitial telomeres in 40 cases of constitutional abnormalities.</i>	ccclxxxiv
	Curriculum vitae abrégé.....	cdv

Liste des tables

Introduction générale

Table I: Classification de quelques unes des principales anomalies du développement sexuel.	58
--	----

Chapitre 1

Article 1

Table I: <i>Clinical findings of the nine idic(Y) patients.</i>	115
---	-----

Table II: <i>Summary of karyotypes and histology of gonads and adnexal tissues of the nine idic(Y) patients.</i>	119
--	-----

Article 2

Table I: <i>Final karyotypes for blood lymphocytes in idic(Y) patients.</i>	131
---	-----

Table supplémentaire I: <i>Clinical findings in all 10 patients at their latest clinical evaluation.</i>	150
--	-----

Table supplémentaire II: <i>Detailed karyotypes with all FISH results for the idic(Y) patients.</i>	151
---	-----

Table supplémentaire III: <i>Results of all hybridized FISH probes for each idic(Y) patient.</i>	152
--	-----

Article 3

Table I: <i>Results for all probes hybridized on the der(X) in patients 1 to 4.</i>	160
---	-----

Chapitre 2Article 5

Table I: <i>Overview of patients and histology of their gonads, as well as combined cytogenetics results on blood, gonads and/or adnexa when available.</i>	190
---	-----

Table II: <i>Comparison of cytogenetics results obtained on fresh and fixed gonads or adnexa.</i>	194
---	-----

Table III: <i>Intensity of immunochemistry stains in analyzed gonads.</i>	204
---	-----

Chapitre 3Article 6

Table I: <i>Karyotype and description of genitalia and gonads of patients with anomalies of chromosome 22 and abnormal sexual differentiation.</i>	228
--	-----

Article 8

Table I: <i>Summarized results of Xp and Xq microsatellite genotyping.</i>	250
--	-----

Table II: <i>Comparison of phenotypic features reported in cases of Xp disomy with 46,X,der(Y)t(X;Y) constitutions.</i>	253
---	-----

AnnexesArticle

Table I: <i>Karyotype and FISH results for previously reported cases of translocations with interstitial (sub)telomeres.</i>	ccclxxxviii
Table II: <i>Karyotype and FISH results for previously reported cases of ring chromosomes with interstitial (sub)telomeres.</i>	ccclxxxix
Table III: <i>Karyotype and FISH results for 40 cases of deletions, translocations and ring chromosomes.</i>	cccxcii

Liste des figures

Introduction générale

Figure 1: Représentation schématique de l'évolution des chromosomes sexuels.....	36
Figure 2: Idiogramme des chromosomes X et Y montrant la position des régions d'intérêt et des principaux gènes discutés dans cette thèse.....	38
Figure 3: Schéma de la structure du chromosome Y illustrant la position relative des trois classes de gènes et des principales séquences répétées de la région spécifique au mâle, ainsi que leur implication dans certains remaniements structuraux.....	46
Figure 4: Cascade génique simplifiée de la détermination sexuelle chez les individus 46,XY et 46,XX.....	65
Figure 5: Modèle de pathogenèse des tumeurs gonadiques.....	67
Figure 6: Mécanismes impliqués dans la formation des idic(Y).	75
Figure 7: Schématisation des étapes de réparation d'un bris double-brin par recombinaison homologue entre chromatides-sœurs ou chromatides de deux homologues.	76
Figure 8: Schéma illustrant les différents mécanismes pouvant mener à l'instabilité des idic(Y).	79
Figure 9: Schéma illustrant la formation et l'instabilité des anneaux	80
Figure 10: Représentation schématique de la recombinaison normale et anormale pouvant survenir lors de la méiose paternelle, ainsi que des constitutions chromosomiques résultantes chez la descendance.....	83
Figure 11: Idiogramme des chromosomes X et Y illustrant la position de l'ensemble des sondes utilisées.	98

Figure 12: Exemples de localisation de sondes sur les chromosomes X et Y marqués en bandes R.	102
---	-----

Chapitre 1

Article 1

Figure 1: <i>Partial karyotypes of the sex chromosomes and FISH analyses for all patients.</i>	118
--	-----

Article 2

Figure 1: <i>Partial metaphases showing FISH with commercial probes, BACs and/or cosmid clones.</i>	130
---	-----

Figure 2: <i>Idiogram of the Y chromosome with localization of FISH probes, palindromes, inverted and direct repeats, as well as breakpoint regions of patients.</i>	135
--	-----

Figure 3: <i>Bar chart representing the proportion of various cell lines in blood lymphocytes, amniocytes, skin fibroblasts, fixed and/or fresh left and/or right gonadal tissue of all ten patients.</i>	136
---	-----

Figure 4: <i>Correlation between the proportion of cells which lost the Y chromosome in various tissues for each patient and the intercentromeric distance.</i>	141
---	-----

Article 3

Figure 1: <i>Partial metaphases showing FISH results.</i>	159
---	-----

Figure 2: <i>Details of probe coverage of the centromeric boundary of the polymorphic paracentric inversion region on the short arm of the Y chromosome, as well as PRKX and PRKY genes.</i>	163
--	-----

Chapitre 2

Article 4

Figure 1: <i>Microscopical appearance of the right gonad of proband 1 showing the dysgerminoma and a nest of gonadoblastoma.</i>	176
Figure 2: <i>Microscopical appearance of the left gonad of proband 2 showing the adjacent gonadoblastoma and choriocarcinoma, and nests of gonadoblastoma.</i>	177
Figure 3: <i>Schematic representation of the SNP profiling results.</i>	179

Article 5

Figure 1: <i>Histological and immunohistochemical findings in gonadal tumors.</i>	195
Figure 2: <i>Histological and immunohistochemical findings in undifferentiated gonadal tissue (UGT).</i>	199
Figure 3: <i>Histological and immunohistochemical findings in streak gonads and dysgenetic testes.</i>	202

Chapitre 3

Article 6

Figure 1: <i>Face, feet and external genitalia of the fetus.</i>	223
Figure 2: <i>Histological aspect of testis and fetal uterus.</i>	224
Figure 3: <i>Partial karyotype of fetal chromosomes 22, X, and Y, as well as FISH with probes specific to chromosomes 22, X and Y.</i>	226

Article 7

Figure 1: <i>Phenotypic aspect and radiography of the fetus, as well as histology of the ovary and testis.</i>	236
--	-----

Article 8

Figure 1: <i>Idiogram of X, Y and der(Y) chromosomes with position of FISH probes, GTG karyotype of the proband's gonosomes, and FISH with various probes.</i>	249
--	-----

Figure 2: <i>Postulated interactions between SRY, SOX9, RSPO1, WNT4, NROB1, and NR5A1 during sexual development.</i>	255
--	-----

Discussion générale

Figure 13: <i>Remaniements possibles suite à une cassure dans les structures secondaires formées par des palindromes situés sur les chromatides d'un même chromosome ou de chromosomes différents.</i>	265
--	-----

AnnexesArticle

Figure 1: <i>Partial metaphases showing fluorescence in situ hybridization (FISH) with either pan-telomeric or specific subtelomeric probes.</i>	cccxciii
--	----------

Liste des sigles et des abréviations

A	<i>ambiguous genitalia</i> (organes génitaux ambigus)
ABL	<i>abelson murine leukemia viral oncogene homolog</i>
ACC	<i>agenesis of the corpus callosum</i> (agénésie du corps calleux)
ADHD	<i>attention deficit hyperactivity disorder</i> (trouble du déficit de l'attention/hyperactivité)
ADN	acide désoxyribonucléique
AHC	<i>adrenal hypoplasia, congenital</i>
Alu	séquences reconnues par l'endonucléase Alu isolée de l'organisme <i>Arthrobacter luteus</i>
AMELY	<i>amelogenin, Y-chromosomal</i>
AMH	<i>anti-müllerian hormone</i> (hormone anti-müllérienne)
AMHR2	<i>anti-müllerian hormone receptor 2</i>
AR	<i>androgen receptor</i> (récepteur des androgènes)
ARAF1	<i>v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog 1</i>
AT	<i>adenine-thymine</i> (adénine-thymine)
ARN	acide ribonucléique
AZ	<i>Arizona</i> (État de l'Arizona)
AZF _a ; b; c	<i>azoospermia factor a; b; c</i> (facteur d'azoospermie a; b; c)
BACs	<i>bacterial artificial chromosomes</i> (chromosomes artificiels de bactérie)
BCR	<i>breakpoint cluster region</i>
BFB	<i>breakage-fusion-bridge</i> (bris-fusion-pont)
b-HCG	<i>beta-human chorionic gonadotropin</i>
BPAD	<i>bipolar affective disorder</i> (désordre de bipolarité affective)
BrdU	5-bromo-2'-déoxyuridine
B.Sc.	<i>Bachelor of Science</i>
Bx	<i>biopsy</i> (biopsie)
CA	<i>California</i> (État de la Californie)
CBG	<i>C-bands by barium hydroxide using Giemsa</i> (marquage en bandes G après traitement à l'hydroxyde de baryum et coloration au Giemsa)
CCND2	<i>cyclin D2</i>

CD30	aussi connu sous le nom de <i>TNFRSF8</i>
CD117	aussi connu sous le nom de <i>KIT</i>
<i>CDC2L2</i>	<i>cell division cycle 2-like 2</i>
<i>CDCA7</i>	<i>cell division cycle-associated protein 7</i>
<i>CDK5</i>	<i>cyclin-dependent kinase 5</i>
<i>CDK5RAP3</i>	<i>cdk5 regulatory subunit-associated protein 3</i>
CEA	<i>carcinoembryonic antigen</i>
CenH3	<i>centromeric histone 3</i>
CENP-A; B	<i>centromeric protein A; B</i>
CEP	<i>chromosome enumeration probe</i>
CGH	<i>comparative genomic hybridization</i> (hybridation génomique comparative)
CHC	<i>choriocarcinoma</i> (choriocarcinome)
<i>CHK2</i>	<i>checkpoint kinase 2, s. pombe, homolog of</i>
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CKN	<i>cytokeratin AE1/AE3</i>
CKN7	<i>cytokeratin 7</i>
cm	centimètre
<i>CTCF</i>	<i>CCCTC-binding factor</i>
<i>CXorf21</i>	<i>chromosome X open reading frame 21</i>
<i>CYorf16</i>	<i>chromosome Y open reading frame 16</i>
<i>CYP11A</i>	<i>cytochrome P450, subfamily XIA, polypeptide 1</i>
<i>CYP17A1</i>	<i>cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1</i>
<i>CYP21</i>	<i>cytochrome P450, subfamily XXI</i>
<i>CYP11B1</i>	<i>cytochrome p450, subfamily XIB, polypeptide 1</i>
D18Z1	<i>human chromosome 18 specific repeated DNA family 1</i>
DAB	3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
dATP	déoxyadénosine triphosphate
<i>DAX1</i>	<i>DSS-AHC critical region on the X chromosome 1, gene 1; voir NROB1</i>
<i>DCC</i>	<i>deleted in colorectal carcinoma</i>
del()	<i>deleted chromosome</i> (chromosome délété)

der()t(;)	<i>derivative chromosome generated after a translocation</i> (chromosome dérivé d'une translocation)
DG	<i>dysgerminoma</i> (dysgerminome)
DHEAS	<i>dehydroepiandrosterone sulfate</i> (sulfate de déhydroépiandrosterone)
<i>DHCR7</i>	<i>sterol delta-7 reductase</i>
<i>DHH</i>	<i>desert hedgehog</i>
DHT	dihydrotestostérone
dic()	<i>dicentric chromosome</i> (chromosome dicentrique)
dic r()	<i>dicentric ring</i> (anneau dicentrique)
<i>DMD</i>	<i>dystrophin</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<i>DMRT1; 2</i>	<i>doublesex- and mab3-related transcription factor 1; 2</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DNase	désoxyribonucléase
DR	<i>direct repeat</i> (séquence répétée directe)
DSB	<i>double-strand break</i> (bris double-brin)
<i>DSS</i>	<i>dosage-sensitive sex reversal</i>
dup	duplication
dUTP	déoxyuridine triphosphate
DXS1003; 1053; ...	<i>DNA X-chromosome Segment 1003; 1053; ...</i>
DXYS129	<i>DNA XY-chromosomes Segment 129</i>
DXZ1	<i>human X-chromosome specific repeated DNA family 1</i>
DYS14	<i>DNA Y-chromosome Segment 14</i>
DYZ1; 2; ...	<i>human Y-chromosome specific repeated DNA family 1; 2; ...</i>
<i>ELK1</i>	<i>elk1, member of ets oncogene family</i>
EMA	<i>epithelial membrane antigen</i>
ER	<i>estrogen receptor</i> (récepteur des œstrogènes)
ESTCdy16c07	<i>expressed sequence tag contig dy16c07</i>
<i>EWSR1</i>	<i>Ewing sarcoma breakpoint region 1</i>
F	<i>female</i> (féminin)
FCCMG	<i>Fellow of the Canadian College of Medical Genetics</i>
FESP	Faculté des études supérieures et postdoctorales

<i>FGF9</i>	<i>fibroblast growth factor 9</i>
<i>FGFR2</i>	<i>fibroblast growth factor receptor 2</i>
FISH	<i>fluorescence in situ hybridization</i> (hybridation <i>in situ</i> en fluorescence)
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
FRCPC	<i>Fellow of the Royal College of Physicians of Canada</i>
FRSQ	Fond de la recherche en santé du Québec
FSH	<i>follicle stimulating hormone</i> (hormone folliculo-stimulante)
g	grammes
G1	phase G1 du cycle cellulaire
G2	phase G2 du cycle cellulaire
G1/S	transition entre la phase G1 et la phase de synthèse du cycle cellulaire
G2/M	transition entre la phase G2 et la phase de mitose du cycle cellulaire
<i>GATA4</i>	<i>GATA-binding protein 4</i>
GB	<i>gonadoblastoma</i> (gonadoblastome)
<i>GBY</i>	<i>gonadolastoma locus on Y chromosome</i>
GCT	<i>germ cell tumor</i>
<i>GFAP</i>	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
<i>GK</i>	<i>glycerol kinase</i>
<i>GRB7</i>	<i>growth factor receptor-bound protein 7</i>
GTG	<i>G-bands by Trypsin using Giemsa</i> (marquage en bandes G après traitement à la trypsine et coloration au Giemsa)
hCG	<i>human chorionic gonadotrophin</i> (hormone chorionique gonadotrope humaine)
HERVs	<i>human endogenous retrovirus elements</i> (éléments endogènes de rétrovirus humains)
HPS	<i>hematoxylin-phloxine-saffron</i> (hématoxyline-phloxine-safran)
i()	isochromosome
idic()	<i>isodicentric chromosome</i> (chromosome isodicentrique)
IGCNU	<i>intratubular germ cell neoplasia unspecified</i> (néoplasie non spécifiée des cellules germinales intratubulaires)
<i>IL9R</i>	<i>interleukin 9 receptor</i>
IL	<i>Illinois</i> (État de l'Illinois)

INSL3	<i>insulin-like hormone 3</i>
inv	inversion
IR	<i>inverted repeat</i> (séquence répétée inversée)
ISCN	<i>International System for Human Cytogenetic Nomenclature</i>
IU	<i>international unit</i> (unité internationale)
IUGR	<i>intrauterine growth restriction</i>
kb	kilobase
KFSD	<i>keratosis follicularis spinulosa decalvans</i>
<i>KIT</i>	<i>v-kit hardy-zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i> ; aussi connu sous le nom de CD117
<i>KRAS</i>	<i>v-ki-ras2 kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
<i>L</i>	litre
L	<i>left</i> (gauche)
LH	<i>luteinizing hormone</i> (hormone lutéinisante)
LINE	<i>long interspersed element</i>
LINE-1	<i>long interspersed element type 1</i>
LTR	<i>long terminal repeats</i>
m	<i>months</i> (mois)
<i>M</i>	volume molaire (mol/L)
M	<i>male</i> (masculin)
M199	Medium 1999
<i>mab3</i>	<i>male abnormal family member 3</i>
<i>MAD2</i>	<i>mitotic arrest-deficient-2</i>
<i>MAGEB1; 3; 4</i>	<i>melanoma antigen, family B, 1; 3; 4</i>
<i>Map3k4</i>	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4</i>
mar()	<i>marker chromosome</i> (chromosome marqueur)
mat	<i>maternal origin</i> (origine maternelle)
Mb	mégabase
M.D.	<i>Medical Doctor</i>
MD	<i>Maryland</i> (État du Maryland)
mg	milligramme
MIF	<i>macrophage migration inhibitory factor</i>

ml	millilitre
mol	mole
MRI	<i>magnetic resonance imaging</i> (imagerie par résonance magnétique)
M.Sc.	<i>Master of Science</i>
MSY	<i>male-specific region on the Y chromosome</i> (région spécifique au mâle sur le chromosome Y)
<i>MYCN</i>	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral-related oncogene, neuroblastoma-derived</i>
µg	microgramme
µm	micromètre
NA	not available (non disponible)
<i>NANOG</i>	<i>homeobox transcription factor NANOG</i>
NC	<i>North Carolina</i> (État de la Caroline du Nord)
nd	<i>not done</i> (pas fait)
NJ	<i>New Jersey</i> (État du New Jersey)
<i>NR5A1</i>	<i>nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1</i> ; anciennement connu sous le nom de <i>SFI</i>
<i>NRAS</i>	<i>neuroblastoma ras viral oncogene homolog</i>
<i>NROB1</i>	<i>nuclear receptor subfamily O, group B, member 1</i> ; anciennement connu sous le nom de <i>DAX1</i>
NS	<i>nonseminomatous</i> (non-séminome)
NY	<i>New York</i> (État de New York)
<i>OCT3/4</i>	<i>octamer-binding transcription factor 3/4</i> ; aussi connu sous le nom de <i>POU5F1</i>
octa r()	<i>octacentric ring</i> (anneau octacentrique)
On	Ontario
OFC	<i>occipitofrontal circumference</i> (circonférence occipitofrontale)
p	bras court d'un chromosome
<i>p</i>	<i>p value</i> (valeur p)
<i>PAK2</i>	<i>p21-activated kinase 2</i>
PAR1; 2	<i>pseudoautosomal region 1; 2</i> (région pseudoautosomique 1; 2)
pat	<i>paternal origin</i> (origine paternelle)
pb	paires de bases

PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (réaction en chaîne par polymérase)
<i>Pgds</i>	<i>prostaglandin D2 synthase, hematopoietic</i>
PHA	phytohémagglutinine
Ph.D.	<i>Philosophiae Doctor</i>
PI	<i>propidium iodide</i> (iodure de propidium)
PIP	<i>proximal interphalangeal</i> (interphalangienne proximale)
PLAP	<i>placental alkaline phosphatase</i>
<i>PML</i>	<i>acute promyelocytic leukemia, inducer of</i>
PNA	<i>peptide nucleic acid</i>
<i>POU5F1</i>	<i>pou domain, class 5, transcription factor 1</i> ; aussi connu sous le nom de <i>OCT3/4</i>
PPD	p-phénylènediamine
<i>PRKX</i>	<i>protein kinase, X-linked</i>
<i>PRKY</i>	<i>protein kinase, Y-linked</i>
pter	extrémité terminale du bras court
q	bras long d'un chromosome
Qc	Québec
qter	extrémité terminale du bras long
R	<i>right</i> (droit)
<i>r</i>	<i>correlation coefficient</i> (coefficient de corrélation)
r()	<i>ring chromosome</i> (chromosome en anneau)
r1; 2; 3	premier anneau; deuxième anneau; troisième anneau
<i>RARA</i>	<i>retinoic acid receptor, alpha</i>
<i>RBI</i>	<i>retinoblastoma</i>
RBG	<i>R-bands by BrdU using Giemsa</i> (marquage en bandes R après incorporation de BrdU et coloration au Giemsa)
rec	<i>recombinant chromosome</i> (chromosome recombinant)
R/G	transition entre la réplication des bandes R et les bandes G et C lors de la phase de synthèse du cycle cellulaire
RMGA	Réseau de médecine génétique appliquée
RNaseA	ribonucléase A
RP11-	clone de la banque RPCI-11
RPCI	<i>Roswell Park Cancer Institute</i>

RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<i>RSPO1</i>	<i>R-spondin family, member 1</i>
S	période de synthèse (réplication) de l'ADN dans le cycle cellulaire
SE	<i>seminomatous</i> (séminome)
<i>SF1</i>	<i>steroidogenic factor 1</i> ; voir <i>NR5A1</i>
<i>SHOX</i>	<i>short stature homeobox</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
<i>SOX2; 3; ...</i>	<i>SRY-box 2; 3; ...</i>
<i>SPRY3</i>	<i>sprouty, drosophila, homolog of, 3</i>
<i>SRY</i>	<i>sex-determining region Y</i>
<i>STAR</i>	<i>steroidogenic acute regulatory protein</i>
<i>SYCP3</i>	<i>synaptonemal complex protein 3</i>
t(;)	translocation
tas	<i>telomeric association</i> (association télomérique)
TCG	tumeur des cellules germinales
<i>TDP52</i>	<i>tumor protein D52</i>
tetra r()	<i>tetracentric ring</i> (anneau tétracentrique)
TGI	tissu gonadique indifférencié
TM	<i>trademark</i> (marque déposée)
<i>TNFRSF8</i>	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8</i> ; aussi connu sous le nom de CD30
<i>TSIX</i>	<i>X inactivation-specific transcript-antisens</i>
<i>TSPY</i>	<i>testis-specific protein, Y-linked</i>
<i>TSPX</i>	<i>testis-specific protein, Y-linked, X-homolog</i>
U	<i>unspecified side</i> (côté non spécifié)
UCSC	<i>University of California Santa Cruz</i>
UdeM	Université de Montréal
UGT	<i>undifferentiated gonadal tissue</i> (tissu gonadique indifférencié)
USA	<i>United States of America</i> (États-Unis)
VA	<i>Virginia</i> (État de la Virginie)
<i>VAMP7</i>	<i>vesicle-associated membrane protein 7</i>
WAGR	<i>Wilms tumor, aniridia, genitourinary anomalies, and mental retardation syndrome</i>

<i>WASH6P</i>	<i>WAS protein family homolog 6 pseudogene</i>
<i>WCP</i>	<i>whole chromosome paint</i>
<i>WI</i>	<i>Wisconsin (État du Wisconsin)</i>
<i>WNT4</i>	<i>wingless-type MMTV integration site family, member 4</i>
<i>WT1</i>	<i>Wilms tumor 1</i>
<i>XIST</i>	<i>X inactivation-specific transcript</i>
<i>y</i>	<i>years (ans)</i>

*À ma famille; ce qui nous unit va bien au-delà
des chromosomes et de l'ADN.*

Remerciements

Je veux d'abord remercier mes directrices, les docteurs Nicole Lemieux et Emmanuelle Lemyre, qui ont partagé leur savoir-faire et leur passion avec moi. Vous m'avez accordé votre confiance et m'avez encouragée à repousser mes limites. Merci pour votre aide, votre patience, votre support et votre compréhension. Ces quelques lignes semblent bien peu en comparaison de la reconnaissance et de la gratitude que j'éprouve. Vous n'avez pas ménagé vos efforts pour faire de ce projet une réussite ainsi que pour me donner la chance de publier et présenter mes travaux. Vous m'avez donné des opportunités extraordinaires et je vous dois beaucoup. Nicole, je n'oublierai jamais votre immense générosité; merci de m'avoir appris bien plus que la cytogénétique.

J'aimerais exprimer toute ma gratitude au personnel du Département de pathologie du CHU Sainte-Justine qui m'a accueillie et assistée au fil des années, plus particulièrement Mesdames Diane Lachance, Claude Potvin, Nicole St-Jules, Sylvie Masson et Louise Montreuil. Un gros merci aux pathologistes du CHU Sainte-Justine qui ont partagé leur temps et leur expertise avec moi, et qui m'ont généreusement permis d'utiliser leurs infrastructures: les docteurs Pierre Brochu, Dorothée Bouron-Dal Soglio, Hervé Sartelet, Jean-Christophe Fournet, Natacha Patey et Luc Oligny. J'espère sincèrement avoir de nouveau l'opportunité de collaborer avec vous dans le futur. Je remercie plus spécialement le docteur Pierre Brochu qui s'est engagé avec moi dans les dédales de la dysgénésie et des tumeurs gonadiques. Merci de m'avoir appris les rudiments de l'histologie et de l'immunohistochimie et d'avoir passé des heures au microscope pour faire des descriptions histologiques minutieuses. Merci de votre dévouement lors de la rédaction des articles et de votre enthousiasme contagieux; sans vous, la chasse aux cellules germinales n'aurait pas été aussi agréable.

Je remercie aussi les membres du Département de pathologie et biologie cellulaire de l'Université de Montréal qui ont su faire de cet endroit un lieu accueillant, agréable et

convivial, et plus particulièrement Denis Rodrigue pour son amitié, sa bonne humeur, son soutien et son aide.

Je désire également exprimer toute ma gratitude aux témoins sains, patients, médecins, ainsi qu'aux différents collaborateurs qui ont participé à ce projet et aux articles qui en découlent; rien de tout cela n'aurait été possible sans eux. J'ai également eu la chance d'être financée par plusieurs organismes subventionnaires, notamment les Fonds de la recherche en santé du Québec, la Fondation des Étoiles et du CHU Sainte-Justine, la Société des pathologistes du CHU Sainte-Justine, ainsi que différents donateurs par le biais de la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université de Montréal; je leur adresse mes remerciements les plus sincères.

Je ne saurais passer sous silence celles qui ont fait du laboratoire de cytogénétique moléculaire mon deuxième chez-moi: Fléchère Fortin, ma complice de toujours, ainsi que Sophie Dubé et Thi Cam Van Pham, mes partenaires d'hybridation. Vous avez ensoleillé les longs après-midi passés dans la pénombre avec votre dynamisme et votre joie de vivre. Merci d'avoir partagé vos découvertes et vos talents, qu'ils soient scientifiques ou culinaires. Merci d'avoir fait un bout de chemin avec moi; même si nos routes se séparent, ces années à vous côtoyer feront toujours partie de mes plus beaux souvenirs.

Finalement, je souhaite remercier du plus profond de mon cœur ma famille, mon roc, mon phare. Si ces pages marquent la fin d'une époque et le début d'une autre, elles sont aussi le fruit de ce que vous avez contribué à cultiver par votre affection et vos encouragements. Vous êtes, chacun à votre façon, des modèles de persévérance, de détermination et de don de soi. Merci pour l'étincelle de fierté dans vos yeux et de votre intérêt pour mon travail; merci d'avoir savouré avec moi les victoires et de m'avoir réconfortée dans les moments difficiles. Votre soutien indéfectible, votre générosité et votre indulgence m'ont été très précieux, et signifient bien plus pour moi que je ne saurai jamais l'exprimer. Merci d'être ce que vous êtes; moi aussi, je vous aime.

Avant-propos

Près de 50 ans après la découverte de la constitution chromosomique chez l'humain, certains scientifiques considéraient le chromosome Y comme étant voué à l'extinction; une sorte de poubelle génomique ne contenant que quelques gènes importants pour le développement sexuel et la spermatogenèse.

Loin d'être une entité machiste avec un rôle tout puissant dans le développement mâle, le chromosome Y humain est une mauviette. Ce n'est qu'une relique du chromosome X [...]. [Il] disparaît rapidement et, en effet, son futur semble sinistre. [...] Si nous revenons dans 10 ou 100 millions d'années, nous pourrions bien découvrir que les humains, comme certains rongeurs, ont complètement disposé du chromosome Y.

Jennifer A. Marshall Graves, 2000

Ces vues quelque peu réductrices découlaient principalement de deux constatations: la petite taille du chromosome Y, qui est l'un des plus petits chromosomes du génome humain, et sa lente dégradation au cours de l'évolution. Cependant, le projet du génome humain a depuis changé la donne. Achevé à environ 97% en 2003, le séquençage du chromosome Y a révélé une structure complexe et surprenante, qui a permis à ce chromosome de subsister chez l'être humain. Plus que jamais, le Y a prouvé qu'il est bien plus que le chromosome qui porte *SRY*, le gène clé du développement sexuel masculin.

Dans le cadre de ce travail, nous avons étudié des remaniements chromosomiques impliquant le Y afin de mieux comprendre la susceptibilité à produire des cassures de certaines régions et d'évaluer l'impact de l'instabilité de ces remaniements sur le phénotype des patients qui en sont porteurs (chapitre 1). Nous avons également analysé le tissu gonadique de patients avec une anomalie du développement sexuel afin de mieux expliquer leur phénotype ainsi que leur risque d'avoir des tumeurs gonadiques (chapitre 2). Finalement, nous avons étudié trois patients porteurs de rares anomalies génétiques afin de mieux comprendre leur développement sexuel anormal (chapitre 3).

Cette thèse par articles comprend huit parties: une introduction générale, trois chapitres, une discussion générale, une conclusion générale, une bibliographie générale, ainsi que la partie des annexes. Dans l'introduction générale, les concepts essentiels à la compréhension du lecteur sont présentés, de même que les outils de travail utilisés, les hypothèses et les objectifs. Suivent ensuite trois chapitres constitués d'articles publiés, acceptés pour publication ou en préparation, présentés dans leur langue de publication, soit l'anglais. Le chapitre 1 comporte trois articles, et les chapitres 2 et 3 en comportent deux et trois respectivement. Chaque article contient une introduction, une section de matériels et méthodes, une section de résultats, une discussion, des remerciements et les références. La plupart des articles contiennent également un résumé, sauf lorsque l'éditeur ne l'a pas demandé.

La discussion générale qui vient ensuite présente une synthèse des sujets abordés dans les différents articles et intègre ensemble les différents aspects afin de montrer les liens qui existent entre eux. Dans la conclusion générale, les faits saillants de ce travail de doctorat sont décrits, résumant ainsi l'apport de cette thèse aux connaissances, de même que les perspectives d'avenir. La bibliographie générale, quant à elle, liste toutes les références citées dans cette thèse, y compris celles des articles. Finalement, en annexe, on retrouve un neuvième article, ainsi qu'un très bref curriculum vitae.

Introduction générale

Ce n'est que depuis 1956 que l'on connaît le nombre exact de chromosomes dans les cellules somatiques chez l'être humain, soit 46 [Tjio et Levan, 1956]. En cytogénétique, ces 46 chromosomes sont classés en 23 paires. Les 44 premiers chromosomes, en paires numérotées de 1 à 22, sont morphologiquement identiques autant chez l'homme que la femme et sont nommés autosomes ou paires autosomiques. Pour ce qui est de la 23^e paire, elle diffère entre les sexes. En effet, les femmes ont deux chromosomes X alors que les hommes ont un chromosome X et un chromosome Y. C'est pourquoi on fait référence à cette 23^e paire de chromosomes en tant que chromosomes sexuels ou gonosomes. Ainsi, les hommes ont normalement une constitution chromosomique dite à 46,XY alors que celle des femmes est à 46,XX. Or, les chromosomes sexuels ont évolué de manière particulière depuis 350 millions d'années. Et cette évolution a laissé d'importantes traces sur le chromosome Y. Il est donc essentiel de décrire brièvement l'histoire du Y et du X, puisque l'un ne va pas sans l'autre, afin de remettre les choses en perspective.

A.1 Les chromosomes sexuels

A.1.1 L'origine et l'évolution des chromosomes sexuels

Les chromosomes sexuels chez l'être humain, tels que nous les connaissons aujourd'hui, dérivent d'une paire d'autosomes dont l'un des deux chromosomes a subi initialement une mutation au niveau du gène *SOX3* [Foster et Graves, 1994]. Cette mutation a probablement été préservée par force sélective, ce qui a fait en sorte que les inversions, les mutations, les délétions et les additions qui ont forgé les chromosomes X et Y ont été conservés [revu dans Lahn et coll., 2001] (Figure 1, page 36). Ainsi, sur l'un des deux autosomes ancestraux, le proto-Y, le gène *SOX3* est devenu *SRY* alors que le proto-X a conservé la séquence originale de *SOX3*. L'allèle muté ayant une grande pénétrance et étant dominant, la mutation aurait été fixée sur le proto-Y. Le moment de cet événement est toutefois controversé: les publications initiales le plaçaient il y a environ 290 à 350 millions d'années [Lahn et Page, 1999] alors que des données plus récentes indiquent que cela aurait

plutôt eu lieu il y a 165 millions d'années [Veyrunes et coll., 2008]. D'une façon ou d'une autre, cette mutation a eu un effet décisif sur les futurs chromosomes sexuels. Lors des divisions subséquentes, le proto-X pouvait toujours s'apparier à son homologue et effectuer de la recombinaison homologue sur toute sa longueur, n'ayant pas la mutation. Quant au proto-Y, la recombinaison homologue est devenue impossible dans la petite région contenant *SRY* (Figure 1a, page 36), mais se serait poursuivie dans les autres régions chromosomiques, pour un certain temps du moins. En effet, une inversion se serait produite subséquemment sur le proto-Y, agrandissant du même coup de façon dramatique la région exclue de la recombinaison homologue [Lahn et Page, 1999]. Le proto-X et le proto-Y ont alors divergé de façon notable.

Le proto-Y ayant une capacité de recombinaison homologue de plus en plus réduite, il aurait donc toléré les mutations, les délétions, et les inversions. C'est ainsi qu'au moins quatre larges inversions se sont produites sur le Y (Figure 1b, c, e et f) [Lahn et Page, 1999]. De plus, il y a eu plusieurs additions de gènes sur les chromosomes sexuels. La première aurait impliqué le transfert de gènes provenant d'une ou plusieurs régions autosomiques sur le proto-X et le proto-Y (Figure 1d) [Graves, 1995; Graves et coll., 1998; Charchar et coll., 2003]. Finalement, il y aurait eu un dernier transfert, du proto-X vers le proto-Y, il y a environ 3 ou 4 millions d'années (Figure 1g), menant au chromosome Y que l'on connaît aujourd'hui chez l'homme (Figure 1h) [Schwartz et coll., 1998]. S'il faisait approximativement 165 Mb au départ, soit la taille actuelle du chromosome X, le chromosome Y ne fait plus que 67 Mb environ [Graves, 2004].

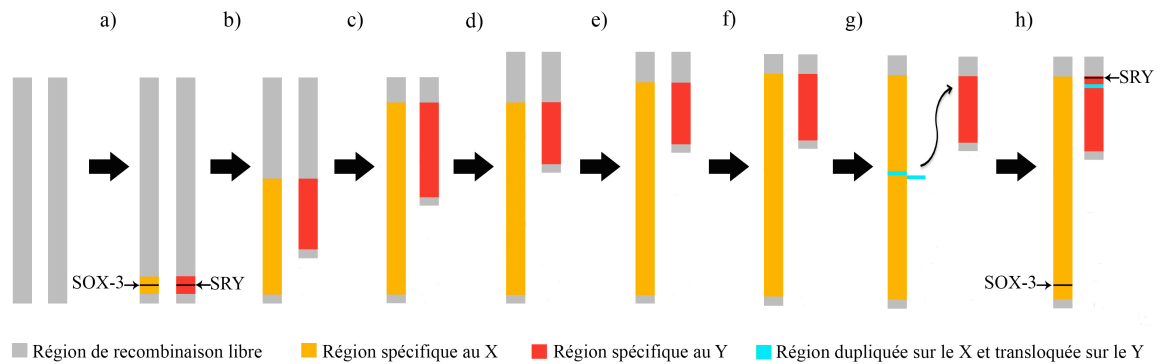


Figure 1: Représentation schématique de l'évolution des chromosomes sexuels. *Modifiée de Lahn et coll. [2001].*

Aujourd'hui, donc, le chromosome Y est l'un des plus petits chromosomes humains et est celui qui contient le moins de gènes: il compte environ cent gènes traduits en protéines [Skaletsky et coll., 2003; Ross et coll., 2005]. Il faut cependant noter que le chromosome Y est constitué d'une large portion d'hétérochromatine non codante dans son bras long. En comparaison, les chromosomes 20, 21 et 22, d'une taille similaire à celle du Y, comptent respectivement 727, 255 et 455 gènes, en plus de nombreux pseudogènes [Dunham et coll., 1999; Hattori et coll., 2000; Deloukas et coll., 2001]. Le chromosome X, quant à lui, compte 1 098 gènes et 700 pseudogènes [Ross et coll., 2005]. À titre de comparaison, le chromosome 2 contient 1 346 gènes encodant des protéines et 1 239 pseudogènes [Hillier et coll., 2005]; il faut cependant noter qu'il est le deuxième plus grand chromosome chez l'humain.

Outre cette dégénérescence du Y, l'autre conséquence de l'évolution est l'existence de nombreuses régions d'homologie persistant entre les chromosomes X et Y chez l'humain. Et puisqu'elles ont un impact non seulement sur la localisation cytogénétique des sondes s'y hybridant mais également, comme nous le verrons plus loin, sur certains remaniements chromosomiques, faisons donc un bref survol de ces principales régions d'homologie.

A.1.2 Les régions d'homologie entre les chromosomes sexuels

A.1.2.1 Régions pseudoautosomiques (PAR)

Les plus connues des régions d'homologie entre les gonosomes sont situées aux extrémités de ceux-ci: ce sont les régions pseudoautosomiques (PAR) du bras court (PAR1) et du bras long (PAR2) [Cooke et coll., 1985; Freije et coll. 1992], de 2,6 et 0,3 Mb respectivement [Petit et coll., 1988; Kvaløy et coll., 1994] (Figure 2, page 38). Au total, les régions PAR contiennent approximativement 28 gènes, soit au moins 24 au niveau de PAR1 et quatre au niveau de PAR2 [Ciccodicola et coll., 2000; Ross et coll., 2005]. Cette imprécision en ce qui a trait au nombre exact de gènes vient du fait que des problèmes lors du séquençage du génome font en sorte que près de 20% de la séquence de PAR1 n'est pas encore connue [Ross et coll., 2005]. Les régions PAR jouent un rôle capital lors de la méiose. En effet, c'est normalement uniquement par ces deux petites régions que les chromosomes X et Y peuvent s'apparier et se recombiner. L'appariement des gonosomes au niveau de la région PAR1 est nécessaire au bon fonctionnement de la méiose I chez l'homme puisqu'une délétion de cette région entraîne l'infertilité [Mohandas et coll., 1992]. Cet appariement donnerait lieu à un taux de recombinaison homologue de 50% [Goodfellow et coll., 1986; Rouyer et coll., 1986; Page et coll., 1987], assurant ainsi le « brassage » génomique ainsi que la ségrégation correcte des homologues lors de la méiose I. En effet, le chiasma formé suite à la recombinaison permet de retenir les deux chromosomes ensemble jusqu'à l'anaphase, assurant ainsi une disjonction correcte des homologues. Lorsque la recombinaison n'a pas lieu, cela peut entraîner des conséquences importantes, comme nous le verrons dans la section A.3.1.1 à la page 69. Dans le cas de PAR2, le taux de recombinaison homologue est d'environ 2%, de sorte que l'on peut parfois observer un appariement [Freije et coll., 1992; Li et Hamer, 1995].

La région PAR1 est essentielle chez l'humain, tant par son rôle dans la recombinaison lors de la méiose masculine que par les gènes qu'elle contient. En effet, il est depuis longtemps présumé que la perte des gènes de PAR1 est responsable en partie du syndrome de Turner, qui a des répercussions sur le développement général et sexuel comme nous le verrons plus loin. Le gène *SHOX*, situé dans la région PAR1 des chromosomes

sexuels (Figure 2, ci-dessous), serait responsable de la courte taille ainsi que de certaines anomalies osseuses dans ce syndrome [Ellison et coll., 1997; Rao et coll., 1997; Kosho et coll., 1999]. Pour ce qui est des gènes de PAR2, les implications phénotypiques d'anomalies les impliquant sont beaucoup moins claires. Certaines études ont montré que *VAMP7* et *IL9R* (Figure 2) pourraient être liés au désordre de bipolarité affective (BPAD) et à l'asthme respectivement [Holroyd et coll., 1998; Kauppi et coll., 2000; Saito et coll., 2000; Müller et coll., 2002].

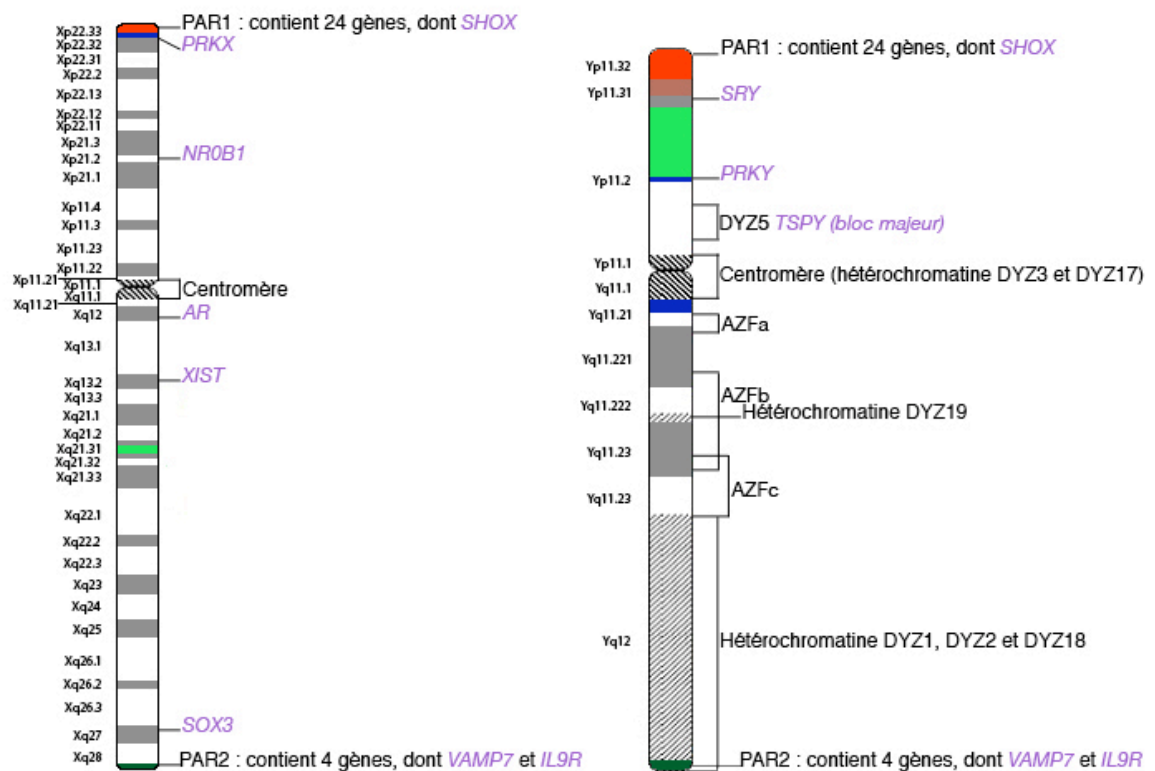


Figure 2: Idiogramme des chromosomes X et Y montrant la position des régions d'intérêt et des principaux gènes discutés dans cette thèse. Chaque région d'homologie est représentée par une couleur spécifique: rouge (PAR1), vert tendre (Yp11.2/Xq21.31), bleu (Yp11.2-q11.2/Xp22.33) et vert forêt (PAR2). Les chromosomes ne sont pas à l'échelle.

Les régions PAR contiennent également les subtélomères des bras courts et longs des chromosomes X et Y, ainsi que les pan-télomères. Les pan-télomères sont constitués d'une séquence consensus, TTAGGG, présente en de multiples copies aux extrémités distales de tous les chromosomes chez l'humain [Moyzis et coll., 1988]. Ils protègent contre la dégradation et les fusions chromosomiques en se repliant sur eux-mêmes pour former une structure nommée « boucle en T » [Griffith et coll., 1999; Hacket et coll., 2001]. Les subtélomères, quant à eux, sont situés entre l'ADN unique des chromosomes et les pan-télomères; ils servent en quelque sorte de zone de transition. Les subtélomères sont aussi constitués de diverses séquences répétées, ainsi que de copies dégénérées de la séquence TTAGGG des pan-télomères, et contiennent plusieurs blocs de duplications segmentaires à travers desquels on retrouve des séquences uniques et même des gènes [revu dans Mefford et Trask, 2002]. Cependant, à la différence des pan-télomères qui sont identiques à toutes les extrémités chromosomiques, l'organisation des diverses séquences subtélomériques est unique pour chaque bras chromosomique de chaque chromosome. Seuls les chromosomes X et Y font exception, puisque les subtélomères du bras court du X et du Y sont identiques et que les subtélomères du bras long du X et du Y le sont également [Knight et coll., 2000].

A.1.2.2 Région Yp11.2/Xq21.31

La seconde région d'homologie la plus connue, d'une longueur approximative de 4 Mb, est située dans la région p11.2 sur le chromosome Y et au milieu de la bande q21.31 sur le chromosome X [Sargent et coll., 1996]. Elle ferait partie des séquences transférées du proto-X au proto-Y il y a environ 3-4 millions d'années tel que décrit précédemment. Toutefois, la région d'homologie avec le X est scindée en deux sur le chromosome Y: un premier bloc de quelques centaines de kb et un deuxième bloc de 3-4 Mb [Mumm et coll., 1997; Schwartz et coll., 1998]. Cela serait dû à une des inversions paracentriques survenues ultérieurement sur le Y au cours de son évolution et impliquant des séquences LINE [Sargent et coll., 1996; Mumm et coll., 1997; Schwartz et coll., 1998]. Par ailleurs, on note que la région d'homologie sur le chromosome X est aussi interrompue par une petite région d'environ 150 kb mais qui n'est pas homologue au chromosome Y. Selon toute

vraisemblance, cette divergence aurait été causée par une délétion subséquente de cette région sur le chromosome Y au cours de son évolution [Vacca et coll., 1999].

A.1.2.3 Région Yp11.2-q11.2/Xp22.33

La troisième région d'homologie entre les chromosomes X et Y dont nous discuterons ici a un impact majeur dans la formation de certains remaniements des gonosomes. Étant située immédiatement sous la région PAR1 du X, elle aurait autrefois fait partie de la région pseudoautosomique des proto-X et proto-Y, mais des inversions subséquentes sur le Y l'auraient non seulement séparée de l'actuelle PAR1, mais également divisée en deux blocs sur le Y (Figure 2, page 38). Elle contient dix gènes, dont le plus notoire est *PRKX* (Xp22.33) et son homologue *PRKY* (Yp11.2). Ces deux gènes, qui sont exprimés de façon ubiquitaire, ne sont pas tant connus pour leur fonction que pour leur implication dans certains remaniements des gonosomes, comme nous le verrons plus loin.

Toutefois, les régions d'homologie ne sont pas les seuls attributs des chromosomes X et Y qui soient dignes de mention. Voyons donc à présent les particularités cytogénétiques et moléculaires de chacun de ces chromosomes afin de mieux comprendre leur importance dans le cadre de cette thèse.

A.1.3 Le chromosome X

A.1.3.1 Particularités cytogénétiques

En 1949, alors même que l'on ne connaît pas le nombre exact de chromosomes chez l'humain, certains chercheurs remarquent après coloration avec le Giemsa une masse très foncée accolée à la membrane nucléaire dans les neurones de chats femelles [Barr et Bertram, 1949]. Dix ans plus tard, Ohno et coll. [1959] associent cette masse, nommée corpuscule de Barr, au chromosome X fortement condensé qui est observé en fin de prophase chez les rats femelles. Finalement, Mary Lyon émettra en 1961 une hypothèse qui

révolutionnera la génétique: l'inactivation, au hasard, de l'un des deux chromosomes X dans les cellules somatiques chez la femme [Lyon, 1961]. La nécessité d'inactiver un chromosome X chez la femme vient du fait que les chromosomes X et Y n'ont pas le même contenu génique suite à leur évolution particulière. Sans cette inactivation, les femmes se retrouveraient avec une dose plus élevée de produits d'expression des gènes spécifiques au chromosome X comparativement aux hommes. Le fait d'empêcher l'expression d'une bonne partie des gènes se trouvant sur le deuxième X chez la femme permet à celle-ci d'avoir un dosage génique similaire à celui des hommes [revu dans Lyon, 1998]. Il a été remarqué que contrairement à son homologue actif, le X inactif se réplique tardivement en phase S [German, 1964; Willard et Latt, 1976]. Mais depuis, on sait que cela n'est pas sa seule caractéristique et que les modifications engendrées par l'inactivation sont bien plus importantes.

A.1.3.2 Mécanismes de l'inactivation

L'inactivation du X s'effectue au hasard sur le chromosome maternel ou paternel, de sorte que l'on retrouve chez la femme une proportion à peu près égale de cellules avec le X maternel inactif et de cellules avec le X paternel inactif, sauf exception (voir la section A.1.3.3 à la page 43 pour plus de détails). Le X inactif le restera pour toutes les divisions mitotiques subséquentes et ne sera réactivé que dans les cellules germinales féminines [revu dans Sugimoto et Abe, 2007]. Chez l'embryon féminin, un chromosome X sera de nouveau inactivé autour du stade de 8 cellules [van den Berg et coll., 2009]. Depuis le début des années 1990, nous savons que le gène *XIST*, situé dans le centre d'inactivation en Xq13 (Figure 2, page 38), est responsable de l'inactivation du chromosome X. Ce gène non traduit en protéine reste sous forme d'ARN dans les cellules afin d'initier le processus d'inactivation, qui se propage sur toute la longueur du chromosome X à partir du centre d'inactivation [revu dans Lyon, 1998]. Exprimé uniquement sur le X qui sera inactivé, il s'accumule autour de ce dernier. Des modifications épigénétiques seront par la suite instaurées afin de rendre l'inactivation permanente: hypoacétylation des histones H3 et H4 [Jeppesen et Turner, 1993; Belyaev et coll., 1996; Boggs et coll., 1996; Gilbert et Sharp,

1999], remplacement des histones H2A par des histones macroH2A [Costanzi et Pehrson, 1998; Chadwick et Willard, 2001] et hyperméthylation des histones H3 [Heard et coll., 2001; Boggs et coll., 2002]. Ces étapes, qui ultimement resserrent la chromatine autour des nucléosomes, empêchent l'expression génique. Les séquences LINE-1 joueraient potentiellement un rôle dans la propagation du signal d'inactivation sur le chromosome X qui sera inactivé [Lyon, 1998]. En effet, Ross et coll. [2005] ont trouvé qu'il y avait une concentration plus importante de séquences LINE-1 dans les strates contenant surtout des gènes soumis à l'inactivation. De plus, la concentration de ces séquences était encore plus importante autour du centre d'inactivation.

La propagation du signal d'inactivation épargne cependant certaines régions qui doivent demeurer actives. Ces régions seraient en quelque sorte « protégées » par des protéines spécifiques, notamment CTCF, qui les isoleraient en retrait en créant des boucles de chromatine [Filippova et coll., 2005]. Parmi les gènes du chromosome X qui doivent échapper à l'inactivation, on retrouve les gènes ayant des homologues sur le chromosome Y ainsi que certains gènes ayant des « orthologues fonctionnels », c'est-à-dire des gènes qui, tout en ayant une séquence différente, jouent un rôle similaire chez les deux sexes. On estime qu'environ 15% du contenu génique total du chromosome X échappe ainsi à l'inactivation [Carrel et Willard, 2005]. Parmi ceux-ci, les plus connus sont les gènes des régions PAR1, puisque leur dosage génique est identique chez les individus XX et XY. Dans le cas de PAR2, certains gènes sont actifs alors que d'autres sont inactifs, mais cela n'affecte pas l'équilibre du dosage génique, qui reste identique chez l'homme et la femme. En effet, les gènes *VAMP7* et *SPRY3* sont inactifs tant sur le X inactif que sur le Y, alors que les gènes *WASH6P* et *IL9R* restent actifs tant sur le X inactif que sur le Y [Ciccodicola et coll., 2000].

Jusqu'à tout récemment, on connaissait bien peu les étapes précédant l'expression de *XIST*. Mais en 2006, deux publications ont mis en lumière certains détails du processus. En effet, deux équipes ont démontré qu'il y a appariement transitoire des chromosomes X au niveau de leur centre d'inactivation avant le début de l'expression de *XIST* sur le futur X inactif, et que cet appariement est nécessaire à l'expression de *XIST* [Bacher et coll. 2006;

Xu et coll., 2006]. Cet appariement permettrait de déterminer combien de X doivent être inactivés. Sur le X demeurant actif chez la souris, un ARN anti-sens de *Xist*, *Tsix*, est exprimé. À l'instar de *Xist*, *Tsix* n'est pas traduit en protéine et il s'accumule autour du chromosome X devant demeurer actif [Lee et coll., 1999]. Chez l'humain aussi on retrouve un transcrit *TSIX*; cependant, sa séquence diverge de celle de *Tsix* [Migeon et coll., 2001], de sorte que le rôle exact de *TSIX* n'est toujours pas confirmé.

A.1.3.3 Conséquences de l'inactivation sur les remaniements du chromosome X

Dans les cas de remaniements de structure du chromosome X, l'inactivation d'un X remanié est possible si, évidemment, le centre d'inactivation est intact. Un des remaniements les plus étudiés dans l'inactivation du X est la translocation, qui se définit comme un échange réciproque de matériel entre deux chromosomes, formant ainsi deux dérivés (der) de translocation. Dans les translocations impliquant le chromosome X et un autosome par exemple, le dérivé X [der(X)] pourra être inactif s'il le faut, le signal d'inactivation étant capable de se propager sur le matériel provenant de l'autre chromosome impliqué dans la translocation [White et coll., 1998; Sharp et coll., 2001; 2002]. Cette inactivation sur l'autre chromosome semble toutefois moins stable que lorsqu'elle se produit sur du matériel provenant uniquement du chromosome X. Ainsi, Sharp et coll. [2002] ont montré que la propagation du signal d'inactivation était parfois incomplète et discontinue dans certaines régions de segments chromosomiques provenant d'autosomes. Par ailleurs, les travaux de Hall et coll. [2002] ont suggéré que même si le matériel autosomique présent sur le dérivé de translocation était inactif à l'origine, il pourrait être réactivé par la suite. Dans les deux cas, la nature de la chromatine autosomique pourrait faire en sorte qu'elle est moins « réceptive » à certaines étapes de l'inactivation, ce qui pourrait causer des défauts dans le maintien de l'inactivation au fil du temps [Hall et coll., 2002; Sharp et coll., 2002].

Cela étant dit, ce n'est pas parce que le $\text{der}(X)$ peut être inactif qu'il le sera toujours. Il arrive en effet que l'inactivation du $\text{der}(X)$ ait des répercussions si graves sur la viabilité cellulaire qu'il y a sélection clonale contre ces cellules: c'est le biais d'inactivation. Le biais d'inactivation est donc un patron d'inactivation initialement dû au hasard, mais où la proportion de cellules avec l'un et l'autre chromosome X inactif n'est pas 50-50% à cause d'une sélection post-inactivation. Dans les cas de translocations équilibrées, c'est-à-dire lorsque les deux dérivés de translocation sont présents chez l'individu, c'est le X normal qui est inactif dans une grande proportion de cellules au lieu du $\text{der}(X)$. Au contraire, dans les cas de translocations déséquilibrées, c'est-à-dire lorsque l'individu n'a hérité que d'un seul dérivé de son parent chez qui il s'est produit une translocation *de novo* dans les cellules germinales ou qui est porteur d'une translocation équilibrée, c'est souvent le $\text{der}(X)$ qui est inactif dans une plus grande proportion de cellules et non pas le X normal [Leisti et coll., 1975; Mattei et coll., 1982]. Ces différents patrons d'inactivation permettent non seulement la viabilité du fœtus, mais également de réduire les impacts phénotypiques d'un déséquilibre génique fonctionnel.

A.1.4 Le chromosome Y

A.1.4.1 Structure moléculaire

A.1.4.1.1 Euchromatine de la région spécifique au mâle sur le chromosome Y

Si le chromosome X a des particularités moléculaires spécifiques comme un enrichissement en séquences LINE et un centre d'inactivation, le chromosome Y n'est toutefois pas en reste. Outre les 28 gènes des régions PAR, le chromosome Y contient aussi 78 gènes traduits en protéines (dont 27 gènes encodant des protéines uniques) dans la région spécifique au mâle sur le chromosome Y (MSY), c'est-à-dire la région comprise entre les deux régions PAR [Rozen et coll., 2003; Skaletsky et coll., 2003]. Les 23 Mb d'euchromatine de la région MSY contiennent 156 unités de transcription, dont seulement 78 sont traduits en protéines [Skaletsky et coll., 2003]. De ces 78 gènes, 60 sont des copies parfois mutées des mêmes 9 gènes, de sorte qu'on ne retrouve que 27 protéines uniques

encodées sur le chromosome Y [Skaletsky et coll., 2003]. Par ailleurs, l'ensemble des gènes de la MSY peut être subdivisé en trois catégories selon leur origine: transposés du X (99% d'homologie), dégénérés du X (60-96% d'homologie) et ampliconiques (99,9% d'homologie avec d'autres gènes de la région MSY) (Figure 3, page 46) [Skaletsky et coll., 2003]. Les gènes transposés du X sont les gènes qui ont été transférés, il y a environ 3-4 millions d'années, du proto-X au proto-Y. Mais contrairement aux gènes des régions PAR, les gènes transposés du X ne participent pas à la recombinaison homologe avec le X puisque les inversions subséquentes du chromosome Y ont fait en sorte que ces gènes ont été dispersés sur le Y. Quant aux gènes dégénérés du X, ce sont des gènes originalement communs aux proto-X et proto-Y, mais qui ont depuis divergé suite à l'arrêt de recombinaison entre les gonosomes. Parmi eux, certains ont conservé une fonction relativement proche de celle du gène initial, alors que d'autres ne sont plus que des pseudogènes, c'est-à-dire un gène n'ayant plus de fonction suite à l'accumulation de mutations. Finalement, les gènes ampliconiques sont des gènes qui ont plusieurs copies sur le chromosome Y. Contrairement aux autres gènes du Y, qui sont exprimés dans l'ensemble du corps ou dans des tissus très variés comme le cerveau, les testicules, la prostate et les dents, les gènes ampliconiques sont surtout exprimés dans les testicules et ont acquis une fonction dans la spermatogenèse [revu dans Skaletsky et coll., 2003].

Si le gène le plus connu du chromosome Y est *SRY*, le gène clé du développement sexuel masculin comme nous le verrons bientôt, le gène ampliconique le plus connu est probablement *TSPY*, localisé en Yp11.2 (Figure 2, page 38). Il est célèbre non seulement pour sa fonction, sur laquelle nous reviendrons plus tard, mais également pour sa structure. Du point de vue de sa structure, c'est un gène répété en tandem dont certaines copies sont des pseudogènes [Manz et coll., 1993]. Il a été détecté par diverses sondes et a porté différents sigles, notamment *DYZ4*, *DYZ5*, *DYZ6*, *DYS14* et *TSPY*. Mais à la fin des années 1980 et au début des années 1990, la communauté scientifique a peu à peu réalisé que toutes ces sondes détectaient le même locus sur le bras court du chromosome Y [Tyler-Smith et coll., 1988; Neil et coll., 1990; Manz et coll., 1993; revu dans Vogel et Schmidtke, 1998]. En 2003, un gène antisens de *TSPY* a été trouvé: *CYorf16* [Skaletsky et coll., 2003].

TSPY et *CYorf16* peuvent être présents en 23 à 64 copies selon les individus, mais on en retrouve en moyenne 32 copies [Repping et coll., 2006]. La plupart des copies en tandem de *TSPY/CYorf16* sont localisées dans un bloc au milieu de la bande Yp11.2, mais on retrouve aussi une copie en position plus distale en Yp11.2, probablement après qu'une inversion ait séparé le bloc de copies en deux. Finalement, quelques auteurs ont rapporté la présence de quelques copies de *TSPY* sur le bras long du Y, en Yq11.22-11.23 [Gläser et coll., 1997; Röttger et coll., 2002], mais ces résultats ne semblent pas avoir été corroborés lors du séquençage du chromosome Y puisqu'ils n'apparaissent pas sur la carte moléculaire de ce chromosome [Skaletsky et coll., 2003].

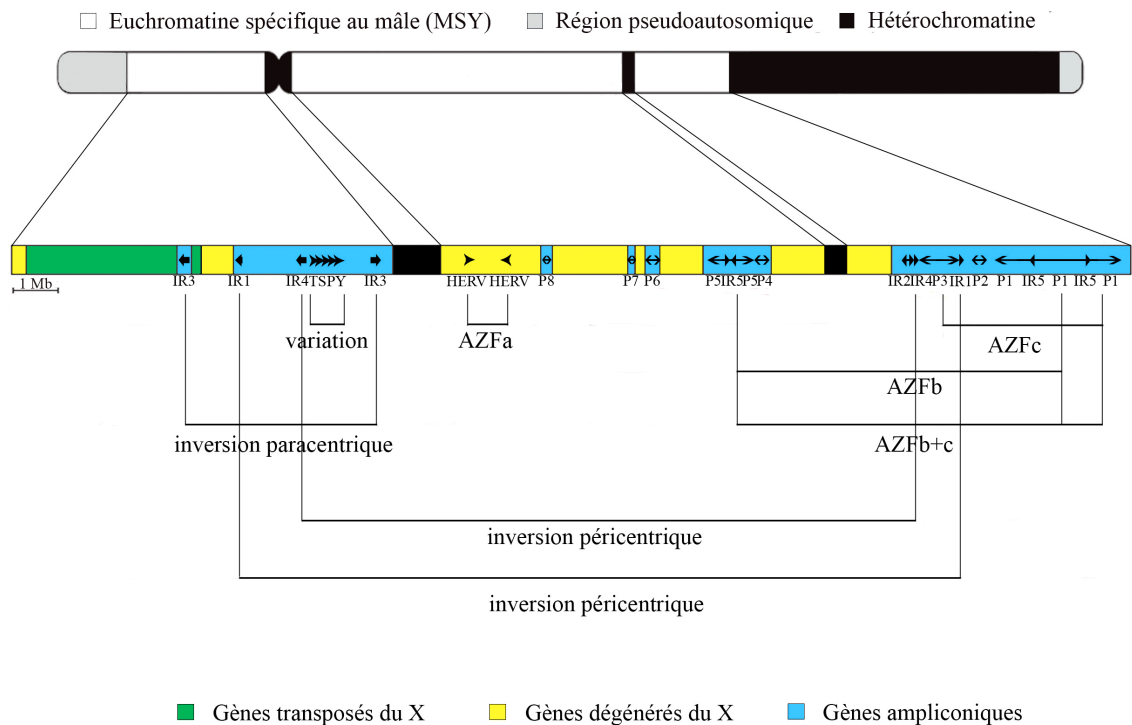


Figure 3: Schéma de la structure du chromosome Y illustrant la position relative des trois classes de gènes et des principales séquences répétées palindromiques (P) ou inversées (IR) de la région spécifique au mâle, ainsi que leur implication dans certains remaniements structuraux. *Modifiée de Hurler et Jobling [2003] et de Repping et coll. [2006].*

Parmi les autres gènes connus du chromosome Y, on note les facteurs d'azoospermie (AZF) car ils jouent un rôle essentiel dans la spermatogenèse et la fertilité masculine. Ces gènes sont regroupés en trois régions sur le bras long du Y, en Yq11.21-11.22, Yq11.222-11.223 et Yq11.223-11.23: AZFa, AZFb et AZFc (Figure 2, page 38, et Figure 3, page 46) [Vogt et coll., 1996]. On ne connaît pas encore le rôle exact des gènes retrouvés dans chacune de ces régions, ni même si tous les gènes s'y trouvant ont un rôle essentiel [revu dans Vogt et coll., 2008].

L'aspect le plus marquant de cette MSY est la présence de nombreux palindromes ainsi que de séquences répétées inversées, pouvant contenir des gènes. Par exemple, *TSPY* est encodé dans la troisième répétition inversée (IR3). Les palindromes sont des séquences qui peuvent être lues de façon identique sur les deux brins de l'ADN à partir d'un point central de symétrie en miroir [Willard, 2003]. On en trouve huit sur le chromosome Y, tous situés sur son bras long, d'une taille variant entre une trentaine de kb jusqu'à près de 3 Mb [Skaletsky et coll., 2003] (Figure 3, page 46). Ces séquences, comme nous le verrons à la section A.3.2.1 de la page 74, auraient joué un rôle dans la préservation de l'intégrité de séquences importantes pour le chromosome Y. Quant aux séquences répétées inversées, on en retrouve cinq paires, d'une centaine de kb chacune, dispersées sur les bras court et long du Y. Les deux séquences d'une même paire peuvent être distantes de quelques centaines de kb ou d'une dizaine de Mb, et sont d'orientation inverse l'une par rapport à l'autre [Skaletsky et coll., 2003]. On retrouve également des éléments endogènes de rétrovirus humains (HERVs), traces d'infections virales ancestrales, qui ont été conservées au cours de l'évolution [revu dans Bannert et Kurth, 2004]. Ces séquences, bien que retrouvées dans l'ensemble du génome, seraient particulièrement enrichies sur le chromosome Y [Kjellman et coll., 1995]. On retrouve également des séquences Alu, qui dérivent de la fusion des extrémités 5' et 3' d'un gène d'ARN et qui ont été amplifiées depuis [revu dans Häsler et Strub, 2006]. Des études subséquentes ont prouvé qu'une recombinaison homologue entre ces divers types de séquences est à l'origine de bien des remaniements du chromosome Y, comme nous l'expliquerons plus tard.

A.1.4.1.2 *Hétérochromatine du chromosome Y*

Près des deux tiers du Y sont constitués d'hétérochromatine dont la plus importante région se situe sur le bras long, en Yq12 (Figure 2, page 38). D'un point de vue moléculaire, cette hétérochromatine est formée de séquences d'ADN satellite III répété en tandem, plus précisément DYZ1 et DYZ2. DYZ1 est une séquence de 5 pb organisée en sous-unités de 3,4 à 3,6 kb dont on retrouve entre 2 000 et 4 000 copies selon les individus [Nakahori et coll., 1986; Skaletsky et coll., 2003]. Pour ce qui est de DYZ2, c'est une répétition d'environ 2 000 fois d'une séquence riche en bases AT entrecoupée de séquences Alu et organisée en sous-unités de 2,4 kb [Cooke et coll., 1982; Frommer et coll., 1984]. Ces deux séquences répétées en tandem d'ADN se retrouvent au niveau de l'hétérochromatine du bras long du Y, en Yq12: DYZ2 serait surtout située aux deux extrémités alors que DYZ1 serait dispersée sur toute la longueur [Ludeña et coll., 1993]. Une autre séquence d'ADN répété en tandem, DYZ18, a aussi été identifiée en 2003, et serait localisée près de la frontière avec l'euchromatine. Elle serait constituée de près de 3 000 répétitions d'une séquence de 5 pb organisée en sous-unités de 2,9 kb [Skaletsky et coll., 2003]. Par ailleurs, on retrouve aussi sur le bras long une petite séquence répétée en tandem d'ADN, DYZ19 (Figure 2) [Skaletsky et coll., 2003]. Il s'agit d'une séquence de 125 pb répétée plus de 3 000 fois en Yq11.22, au beau milieu de l'euchromatine, qui a une taille d'environ 400 kb.

Une deuxième région d'hétérochromatine du Y est située au niveau du centromère (Figure 2) et est composée de DYZ3, une autre séquence répétée en tandem d'ADN. DYZ3 est constituée d'une séquence de 170 pb environ, aussi appelée ADN α -satellite, alpha-satellite ou alpoïde, organisée en sous-unités de 5,7 à 6,0 kb [Wolfe et coll., 1985; Tyler-Smith et Brown, 1987] qui serait répétée environ 6 000 fois au niveau du centromère du Y. Si cette séquence α -satellite est retrouvée au niveau du centromère de l'ensemble des chromosomes chez l'humain, l'organisation en sous-unités et de légères variations dans la séquence permettent une spécificité à chaque chromosome [Mitchell et coll., 1985; Choo et coll., 1991]. Au niveau du centromère du Y, on retrouve également une autre séquence

de 5 pb répétée en tandem, DYZ17, à la jonction entre DYZ3 et l'euchromatine du bras long [Skaletsky et coll., 2003]. La chromatine des centromères n'est pas enroulée autour d'histones H3 ordinaires; on y trouve plutôt des variantes nommées CenH3 ou CENP-A qui permettraient d'augmenter la rigidité et la robustesse du centromère [revu dans Vagnarelli et coll., 2008]. De nombreuses protéines se lient ensemble au niveau du centromère pour former le kinétochore, un complexe responsable de l'interaction entre le centromère des chromosomes et les microtubules lors de la division cellulaire. Parmi elles, on retrouve notamment une famille des protéines centromériques, les CENP [revu dans Przewloka et Glover, 2009]. Ces protéines peuvent se lier directement à l'ADN par le biais de sites de liaison sur l'ADN α -satellite ou encore se lier entre elles. Cet arrangement de protéines pour former le kinétochore est identique pour tous les chromosomes humains, à l'exception du Y qui est le seul à ne pas posséder de sites de liaison pour CENP-B [Tyler-Smith et Brown, 1987; Masumoto et coll., 1989; Muro et coll., 1992].

À première vue, l'attention portée à ces séquences répétées peut sembler superflue, surtout que l'hétérochromatine ne comporte pas de séquences codantes. Cependant, comme il le sera discuté plus loin, la nature particulière de ces régions a peut-être un rôle important à jouer dans certains remaniements. D'une part, les différences observées au niveau de la région centromérique du chromosome Y par rapport à celle des autres chromosomes pourraient affecter son efficacité ou sa stabilité. D'autre part, comme nous le verrons à l'instant, l'hétérochromatine Yq12 n'est pas totalement inerte.

A.1.4.2 Particularités cytogénétiques et hétéromorphismes

A.1.4.2.1 Variation de la longueur de l'hétérochromatine en Yq12

Bien qu'une variation dans la longueur totale du chromosome Y ait été notée dès 1962, ce n'est qu'en 1971 que la raison de cette variation a été découverte : l'hétérochromatine présente à l'extrémité du bras long du chromosome Y, en Yq12 [Laberge et Gagné, 1971; Robinson et Buckton, 1971]. Or, la longueur de l'hétérochromatine varie d'un chromosome Y à l'autre: c'est un hétéromorphisme, c'est-à-

dire une variation dans l'apparence du chromosome qui n'entraîne aucune conséquence sur le phénotype. Environ 0,6% de la population masculine générale présente un chromosome Y avec une hétérochromatine Yq12 plus courte que la normale, alors qu'environ 0,7% de la population masculine générale présente une région Yq12 plus longue [Hsu et coll., 1987]. On note cependant des variations dans la fréquence de ces hétéromorphismes selon les groupes ethniques. Par exemple, un chromosome Y avec une hétérochromatine Yq12 plus longue semble être plus fréquent chez les Asiatiques, alors qu'un chromosome Y avec une courte hétérochromatine Yq12 est plus fréquemment retrouvé chez les Hispaniques et certains Asiatiques [Hsu et coll., 1987]. Plus récemment, il a été estimé que la longueur de l'hétérochromatine en Yq12 peut représenter entre 29 et 54% de la longueur totale du chromosome (où la longueur moyenne de 44% correspond à la normale) [Repping et coll., 2006].

Cette variation dans l'hétérochromatine Yq12 peut s'expliquer par deux mécanismes: une délétion interstitielle [Kühl et coll., 2001] ou un échange inégal de matériel entre les chromatides-sœurs [Akkari et coll., 2005]. Dans le premier cas, il a été remarqué que la région PAR2 est préservée sur les chromosomes Y avec peu ou pas d'hétérochromatine, indiquant que les variations de longueur ne peuvent pas être dues à une délétion terminale [Kühl et coll., 2001]. Dans le deuxième cas, un échange inégal entre chromatides-sœurs générant une chromatide contenant plus d'hétérochromatine et une chromatide contenant moins d'hétérochromatine pourrait expliquer la présence des deux lignées retrouvées chez quelques individus [Wahlström et coll., 1985; Nazarenko et coll., 1987; Akkari et coll., 2005]. D'une façon ou d'une autre, l'hétérochromatine semble donc pouvoir être le siège occasionnel d'événements moléculaires suggérant une certaine instabilité.

A.1.4.2.2 Inversion péricentrique

Rapportée pour la première fois en 1964, ce n'est cependant qu'au cours des années 1980 que l'inversion du segment situé entre les bandes Yp11.2 et Yq11.2 a formellement été reconnue comme un hétéromorphisme [Verma et coll., 1982; Bernstein et coll., 1986].

Elle est facilement repérable en cytogénétique puisqu'elle altère de façon dramatique le ratio entre la longueur du bras court et celle du bras long, modifiant du même coup l'apparence du chromosome. Elle est sans impact sur le phénotype ou la fertilité des porteurs; d'ailleurs, elle est aujourd'hui retrouvée chez près de 30% des Indiens musulmans Gujerati d'Afrique du Sud et est transmise de père en fils [Bernstein et coll., 1986]. Cependant, elle modifie évidemment l'ordre des gènes situés dans le segment inversé, ce qui affecte la localisation des sondes cytogénétiques les reconnaissant. La fréquence de l'inversion péricentrique est d'environ 0,1% dans la population masculine générale [Zeuthen et Nielsen, 1973; Verma et coll., 1982; Shapiro et coll., 1984; Hsu et coll., 1987].

Dès 2001, Tilford et coll. [2001] ont émis l'hypothèse que des séquences répétées inversées présentes sur le chromosome Y étaient responsables de certains des hétéromorphismes observés. Et comme nous le verrons dans la section A.3.2.1 de la page 74, il s'est avéré que cela n'était que la pointe de l'iceberg. Mais avant de s'intéresser aux origines et aux impacts des remaniements du Y, il faut d'abord expliquer le rôle que joue normalement le chromosome Y dans le processus complexe qu'est le développement sexuel.

*Personne ne gagnera jamais la guerre des sexes;
il y a trop de fraternisation avec l'ennemi.*

Henry Kissinger

A.2 Le développement sexuel

A.2.1 Les généralités

Le développement sexuel est divisé en trois grandes étapes: la détermination sexuelle masculine ou féminine, le développement des gonades primitives bipotentiels, et la différenciation sexuelle masculine ou féminine [revu dans Jaubert et coll., 2009]. La détermination sexuelle est souvent associée à la détermination gonadique comme telle, lorsque la gonade bipotentielle initie un programme génétique menant soit à la formation d'un testicule, soit à la formation d'un ovaire. Plus tard, lorsque les cellules des gonades se différencient en cellules de Sertoli et de Leydig chez l'homme, ou cellules de la thèque et de la granulosa chez la femme, les sécrétions de ces cellules vont influencer le développement des structures adjacentes et donner lieu à la formation des organes génitaux internes et externes spécifiques à chaque sexe. On réfère à ce processus influencé par les sécrétions émises par les gonades en tant que différenciation sexuelle [revu dans Quigley, 2006].

De nombreux gènes sont impliqués dans le développement sexuel, dont la plupart sont localisés sur les autosomes. Les gonosomes ne contiennent que quelques gènes impliqués dans ce processus, mais ces gènes jouent un rôle au début de la cascade. Sur le chromosome Y, le seul gène connu impliqué dans le développement sexuel est *SRY*, en Yp11.31. Sur le chromosome X, il y a *NROBI* (Xp21.2) et *AR* (Xq12). Sur les autosomes, on retrouve des joueurs importants tels que *WNT4* (1p36.12), *RSPO1* (1p34.3), *GATA4* (8p23.1), *NR5A1* (9q33.3), *WT1* (11p13), *DHH* (12q13.12), *AMHR2* (12q13.13), *FGF9*

(13q12.11), *SOX9* (17q24.3) et *AMH* (19p13.3). Nous ne présenterons ici que les grandes lignes du développement sexuel.

Vers la 4^e semaine post-conception chez l'humain, il y a migration des cellules germinales primordiales vers la crête urogénitale, qui dérive de la condensation du mésenchyme à proximité du canal intestinal [revu dans Jaubert et coll., 2009; Schoenwolf et coll., 2009]. Cette crête bilatérale se divisera par la suite en deux domaines différents: la crête gonadique, en position médiane, et la crête mésonéphrique, en position latérale. Les canaux mésonéphriques (structures de Wolff) se forment très tôt, s'étendant de part et d'autre de la crête gonadique, et migrent caudalement puis médianement pour fusionner dans la région urogénitale. Vers la 5^e semaine post-conception, la prolifération de l'épithélium cœlomique recouvrant la crête gonadique et sa pénétration dans le mésenchyme adjacent permettent la formation des gonades bipotentielles. Parmi les gènes impliqués dans ce processus, il y aurait *WT1* et *NR5A1* (anciennement *SF1*) [revu dans Quigley, 2006; Jaubert et coll., 2009]. Par ailleurs, les canaux paramésonéphriques (structures de Müller) se forment également en suivant parallèlement les canaux mésonéphriques [revu dans Jaubert et coll., 2009; Schoenwolf et coll., 2009]. À ce stade, les cordons sexuels primaires contenant les cellules germinales et les cellules de soutien ne montrent aucune différence entre les gonades masculines ou féminines.

À la fin de la 6^e semaine post-conception chez les embryons 46,XY, la détermination sexuelle masculine s'amorce lorsque l'expression de *SRY* entraîne l'organisation des cordons sexuels primaires en tubules séminifères [revu dans Jaubert et coll., 2009; Schoenwolf et coll., 2009]. Le gène *SRY* induit une augmentation de la transcription de *SOX9*, avec l'aide de *NR5A1*, puis cesse d'être exprimé [Sekido et Lovell-Badge, 2008]. *SOX9* maintiendrait ensuite son activation grâce à une boucle de rétroaction avec *FGF9* et la coopération de *NR5A1* [Kim et coll., 2006]. C'est ensuite la protéine *SOX9* qui, avec l'aide des protéines encodées par les gènes *WT1*, *NR5A1* et *GATA4*, active la transcription de l'hormone anti-müllérienne (AMH) [Nachtigal et coll., 1998; Tremblay et Viger, 2001] (Figure 4A, page 55). Cette substance permet alors d'inhiber le

développement des canaux paramésonephriques à partir de la 8^e semaine post-conception. Par ailleurs, *NR5A1* et *DHH*, dont la transcription est activée dans les cellules de Sertoli, joueraient un rôle dans la différenciation des cellules de Leydig (et la production de testostérone dans les testicules), stimulant ainsi le développement des canaux mésonephriques en rete testis, canaux deferens, épидидyme et vas deferens [revu dans Jaubert et coll., 2009]. Quant à *FGF9*, il inhiberait la voie de la bêta-caténine et les gènes *WNT4* et *RSPO1*, qui joueraient un rôle important dans la détermination sexuelle féminine [Kim et coll., 2006; revu dans Bernard et Harley, 2007]. Par la suite, l'action de l'un des dérivés de la testostérone, la dihydrotestostérone (DHT), sur les organes génitaux externes permettra la différenciation sexuelle masculine de l'individu vers la 13^e semaine post-conception [revu dans Jaubert et coll., 2009; Schoenwolf et coll., 2009]. En effet, les tissus des organes génitaux externes expriment le récepteur aux androgènes (AR), ce qui leur permet de répondre à la stimulation hormonale, favorisant une croissance et une organisation tissulaire qui est spécifique au sexe masculin.

Chez les embryons 46,XX, en l'absence de développement testiculaire et de production d'AMH, les canaux paramésonephriques se développent, à partir de la 6^e semaine post-conception, en trompes de Fallope bilatérales puis fusionnent près de la région urogénitale pour former l'utérus. Par ailleurs, en l'absence de testostérone et de DHT, les canaux mésonephriques régressent peu à peu à partir de la 10^e semaine post-conception et les organes génitaux externes ne peuvent pas se masculiniser [revu dans Jaubert et coll., 2009; Schoenwolf et coll., 2009]. Ce n'est que vers la 11^e semaine post-conception qu'il y a finalement début de formation de l'ovaire quand les cordons sexuels primaires amorcent leur organisation en follicules primordiaux; ce processus ne sera complété que vers la 15^e semaine post-conception [revu dans Jaubert et coll., 2009]. Les gènes *WNT4*, *RSPO1* et *NROB1* (anciennement *DAX1*) y joueraient un rôle important. En l'absence de *SRY*, *SOX9* n'est pas suractivé et il n'y a pas de boucle de rétroaction avec *FGF9*; *WNT4* et *RSPO1* pourraient donc déclencher la détermination sexuelle féminine [Chassot et coll., 2008; Tomizuka et coll., 2008] (Figure 4B, page 55). *WNT4* inhiberait notamment la formation du vaisseau cœlomique [Jordan et coll., 2003], un vaisseau normalement retrouvé dans le testicule et qui y assurerait le transport de la testostérone

[Brennan et coll., 2002]. Par ailleurs, il activerait également *NROB1* [Mizusaki et coll., 2003], qui inhiberait à son tour l'interaction entre les protéines NR5A1 et GATA4/WT1, ce qui bloquerait du même coup la sécrétion d'AMH [Nachtigal et coll., 1998; Tremblay et Viger, 2001].

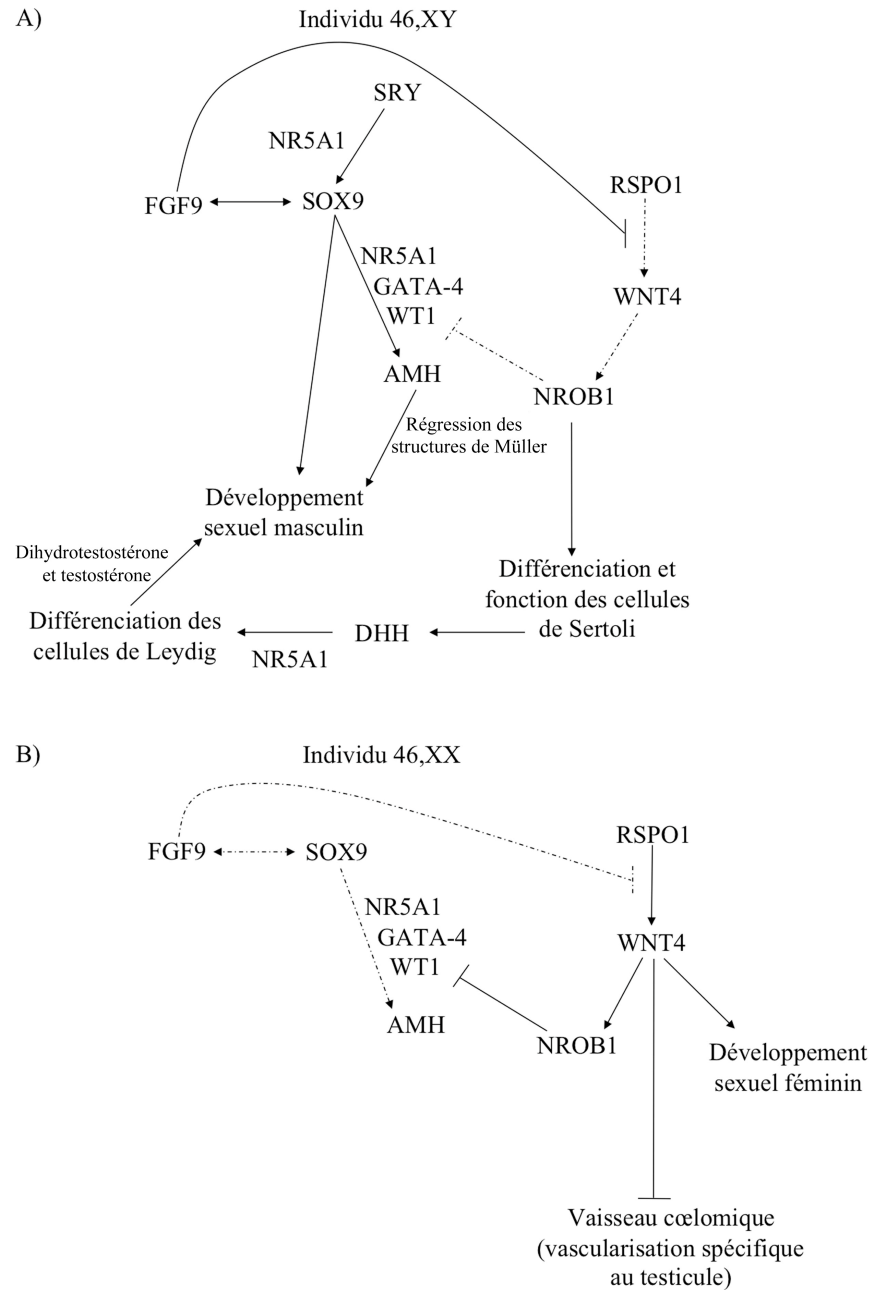


Figure 4: Cascade génique simplifiée de la détermination sexuelle chez A) les individus 46,XY et B) 46,XX.

Le développement sexuel est donc un processus très complexe qui se doit d'être finement contrôlé, d'autant plus que d'autres éléments viennent le compliquer davantage. D'une part, beaucoup de gènes impliqués dans le développement sexuel ont également d'autres rôles. Par exemple, *SOX9* est aussi nécessaire à la chondrogenèse chez l'humain [revu dans Akiyama, 2008], alors que *NROBI* et *NR5A1* sont également impliqués respectivement dans le développement et la fonction du cortex surrénalien qui produit notamment les corticostéroïdes, des hormones qui influencent le métabolisme, la croissance, le système nerveux et le système immunitaire [revu dans Kaplan, 2000]. D'autre part, certains gènes semblent jouer un rôle autant dans le développement sexuel masculin que féminin. C'est le cas de *NROBI*, qui en plus d'inhiber la sécrétion de l'AMH chez les individus XX, serait nécessaire à la différenciation et la fonction des cellules de Sertoli chez les individus XY [Meeks et coll., 2003] (Figure 4, page 55). Le dosage génique, le moment précis d'expression, ainsi que les différents partenaires présents dans les tissus cibles contribueraient aux multiples rôles des gènes impliqués dans le développement sexuel [Ludbrook et Harley, 2004]. Bien des dysfonctionnements sont donc susceptibles de survenir dans ce ballet de cascades d'activations et de sécrétions, comme nous le verrons à l'instant.

A.2.2 Les anomalies du développement sexuel

A.2.2.1 Classification

Les anomalies du développement sexuel touchent à la fois la génétique, l'endocrinologie et le développement anormal des organes (pathologie), c'est pourquoi chacune de ces disciplines a adopté sa propre classification. Il existe bien entendu de nombreux recoupements, les noms des syndromes étant les mêmes, mais il existe tout de même une certaine divergence dans la façon de les organiser en catégories. Au cours des dernières années, la nomenclature des désordres du développement sexuel a complètement été revue par un comité d'experts réunissant des endocrinologues, des généticiens, des chirurgiens, des psychologues et des membres d'associations pour les patients (Consensus

de Chicago) [revu dans Hughes, 2008]. Les pathologistes semblent toutefois avoir conservé leur propre classification [Robboy et Jaubert, 2009]. Le travail de cette thèse touchant à la fois à ces trois domaines, une classification hybride a été adoptée afin de tenter de réconcilier les différentes disciplines. Cette classification est présentée dans la Table I, à la page 58. L'ancienne nomenclature, c'est-à-dire celle en vigueur avant le Consensus de Chicago, est spécifiée entre parenthèses lorsque nécessaire, puisque certains articles dont est composée cette thèse ont été écrits avant l'usage courant de cette nouvelle nomenclature.

Brièvement, la classification choisie divise les désordres du développement sexuel en deux grands groupes: les désordres XY et les désordres XX. Chaque groupe est ensuite redivisé en deux grandes catégories: les désordres de la différenciation génitale et les désordres de la détermination gonadique. Dans les désordres de la différenciation génitale, le développement des gonades est tout à fait normal; ce sont plutôt les organes génitaux internes (dérivés des canaux de Wolff et de Müller) et externes qui sont affectés. Les désordres de la détermination gonadique affectent le développement même de la gonade (dysgénésie gonadique) et, de façon indirecte, les organes génitaux. Autant dans les désordres de la différenciation génitale que ceux de la détermination gonadique, le phénotype sexuel peut être féminin, masculin ou ambigu.

Table I: Classification de quelques unes des principales anomalies du développement sexuel et de leurs causes, lorsque connues. L'ancienne nomenclature est précisée entre parenthèses, lorsque nécessaire.

Désordres de développement sexuel XY	Désordres de développement sexuel XX
DÉSORDRES DE DIFFÉRENCIATION GÉNITALE	
<p>Défauts dans la voie des corticostéroïdes ou des androgènes</p> <ul style="list-style-type: none"> • Défauts en aval du cholestérol: mutation ou délétion de <i>CYP11A</i>, <i>CYP17A1</i>, <i>CYP21</i>, <i>CYP11B1</i>, etc. • Défauts en amont du cholestérol (Smith-Lemli-Opitz): mutation ou délétion de <i>DHCR7</i> • Insensibilité aux androgènes: mutation ou délétion de <i>AR</i> <p>Défauts dans la voie de l'AMH</p> <ul style="list-style-type: none"> • Persistance des structures de Müller: mutation ou délétion de <i>AMH</i> ou <i>AMHR2</i> 	<p>Défauts dans la voie des corticostéroïdes ou des androgènes</p> <ul style="list-style-type: none"> • Chez le fœtus: mutation ou délétion de <i>CYP11A</i> ou <i>CYP11B1</i> • Chez la mère: tumeur virilisante ou ingestion de progestagènes de synthèse
DÉSORDRES DE DÉTERMINATION GONADIQUE	
<p>Dysgénésie gonadique</p> <ul style="list-style-type: none"> • pure (complète; femme XY; syndrome de Swyer): délétion ou mutation de <i>SRY</i>, de <i>DHH</i> ou de <i>DMRT</i>; duplication de <i>NROB1</i> ou de <i>WNT4</i>; mosaïque X/XY • mixte (asymétrique; pseudo-hermaphrodisme mâle dysgénésique): mosaïque X/XY; mutation ou délétion de <i>DHH</i> • associée à un syndrome <ol style="list-style-type: none"> 1. Frasier/Denys-Drash/WAGR: mutation ou délétion de <i>WT1</i> 2. Dysplasie campomélique: mutation ou délétion de <i>SOX9</i> 3. Insuffisance surrénalienne: mutation ou délétion de <i>NR5A1</i> 	<p>Dysgénésie gonadique</p> <ul style="list-style-type: none"> • complète <p>Désordre testiculaire (homme XX): présence de <i>SRY</i>; duplication de <i>SOX9</i>; mutation de <i>RSPO1</i> ou de <i>WNT4</i></p> <p>Désordre ovotesticulaire (hermaphrodisme vrai XX)</p>
Désordre ovotesticulaire (hermaphrodisme vrai XY)	

A.2.2.1.1 Désordres de la différenciation génitale

Cette catégorie de désordres du développement sexuel englobe toutes les anomalies qui affectent les structures de Müller ou de Wolff ainsi que les organes génitaux externes. Les termes d'ambiguïté sexuelle et de pseudohermaphrodisme masculin ou féminin autrefois retrouvés dans cette catégorie ont été abolis dans la nouvelle nomenclature. Ces anomalies peuvent notamment être causées par des défauts dans la synthèse ou l'action des androgènes, par des mutations affectant la régression des structures de Müller ou encore le développement des structures de Wolff. Dans tous les cas, cependant, les gonades sont conformes à la constitution chromosomique de l'individu: ovaires chez les individus 46,XX et testicules chez les individus 46,XY. Les désordres de différenciation génitale sont relativement fréquents, avec une fréquence estimée à 1 sur 100 [Fleming et Vilain, 2004].

Chez les individus 46,XX, les désordres de la différenciation génitale sont le plus souvent causés par la surproduction d'androgènes suite à des déficiences enzymatiques dans la voie de synthèse des corticostéroïdes qui en sont les précurseurs. Ils peuvent également être causés par un excès d'androgènes chez la mère, suite à l'ingestion de progestagènes de synthèse ou par la présence de tumeurs comme les lutéomes de grossesse. Il en résulte une accumulation des précurseurs des androgènes qui peuvent avoir une action similaire à celle de la testostérone ou de la DHT, entraînant une persistance des canaux de Wolff et une virilisation des organes génitaux externes du fœtus. Toutefois, puisque l'on retrouve des ovaires chez ces individus et non pas des testicules, il n'y a pas de production d'AMH; les structures de Müller sont donc bien présentes. Selon le pouvoir androgénique des précurseurs accumulés, il peut y avoir présence simultanée de structures de Müller et de Wolff avec masculinisation importante des organes génitaux externes (anciennement pseudohermaphrodisme féminin), ou avec seulement une faible masculinisation des organes génitaux externes (anciennement ambiguïté sexuelle) [revu dans Robboy et Jaubert, 2009].

Chez les individus 46,XY, une anomalie au niveau des enzymes impliquées dans la synthèse des corticostéroïdes ou du cholestérol, l'absence d'AMH ou une anomalie de son récepteur, ainsi qu'une résistance aux androgènes sont parmi les causes les plus fréquentes. Tel qu'expliqué plus tôt, une déficience dans la synthèse des corticostéroïdes peut entraîner un déséquilibre dans la production des androgènes et causer l'accumulation de précurseurs ayant un pouvoir androgénique variable. Il s'ensuit donc un développement incomplet des structures de Wolff et une masculinisation variable des organes génitaux externes chez les individus 46,XY. Toutefois, l'AMH étant produite, il n'y a pas de structure de Müller résiduelle [revu dans Robboy et Jaubert, 2009]. Par ailleurs, dans le syndrome de Smith-Lemli-Opitz, il y a déficience de l'enzyme permettant de synthétiser le cholestérol, le premier précurseur des androgènes. Il en résulte donc un phénotype similaire à celui observé pour la déficience en corticostéroïdes, qui s'accompagne en outre d'une panoplie d'anomalies phénotypiques caractéristiques affectant le visage et les membres. En effet, le cholestérol joue également un rôle dans les cascades de signalisation au cours de l'embryogenèse, expliquant le large éventail d'anomalies dans ce syndrome [revu dans Porter, 2003].

Les mutations des gènes encodant pour l'AMH ou pour son récepteur, AMHR2, peuvent également causer des désordres de la différenciation génitale. Aussi connus sous le nom de pseudohermaphrodisme masculin ou syndrome de persistance des structures de Müller, ils se caractérisent par la présence simultanée de structures de Wolff et de Müller puisque ceux-ci n'ont pas régressé lors du développement. Les organes génitaux externes sont masculinisés, bien qu'il y ait de la cryptorchidie ou non descente des testicules [revu dans Robboy et Jaubert, 2009]. En effet, la descente des testicules dans le scrotum dépend en partie de l'élargissement du gubernaculum, au niveau de la cavité inguinale, suite à la sécrétion de l'hormone INSL3, et possiblement de l'AMH [revu dans Foresta et coll., 2008].

Finalement, il y a les mutations dans le gène encodant pour le récepteur aux androgènes, *AR*, qui causent l'insensibilité aux androgènes (anciennement syndrome du testicule féminisant). En effet, bien qu'il ait des testicules, l'individu 46,XY aura des

organes génitaux externes féminins à cause de l'insensibilité des tissus urogénitaux à répondre à la stimulation hormonale. De plus, au niveau des organes génitaux internes, les structures de Wolff ne se développeront pas normalement puisque leur maturation dépend de leur réponse à la testostérone. La sécrétion de l'AMH n'étant toutefois pas perturbée, il y aura absence des structures de Müller chez ces patients [revu dans Robboy et Jaubert, 2009]. Par ailleurs, une autre conséquence de la résistance aux androgènes est la position inhabituelle des testicules dans l'abdomen ou dans le canal inguinal. En effet, la disparition du ligament qui attache le testicule à la paroi postérieure de l'abdomen, une des étapes nécessaires à la descente des testicules, dépend de la testostérone. Or, en présence d'une mutation du gène *AR*, ce ligament persiste, ce qui limite la descente des testicules [revu dans Foresta et coll., 2008].

A.2.2.1.2 Désordres de la détermination gonadique

Contrairement aux désordres de la différenciation génitale, les désordres de la détermination gonadique conduisent à une formation anormale des gonades. Le développement de la gonade étant responsable de la différenciation génitale du fœtus, il y a donc également des répercussions sur le développement des structures de Müller et de Wolff, ainsi que sur les organes génitaux externes. La perturbation du développement gonadique peut être secondaire à une anomalie chromosomique ou à une mutation dans l'un des nombreux gènes impliqués dans la cascade de développement sexuel.

Chez les individus 46,XX, le désordre de détermination gonadique le plus fréquent est le désordre testiculaire du développement sexuel, autrefois appelé réversion sexuelle XX ou hommes XX; sa fréquence est estimée à 1 sur 20 000 à 25 000 nouveaux-nés de sexe masculin [de la Chapelle, 1981]. Chez 90% d'entre eux, le phénotype sexuel anormal est dû à la présence d'un chromosome X contenant le gène *SRY* suite à un remaniement avec le chromosome Y lors de la méiose paternelle [McElreavey et coll., 1995]. Quelques cas de patients 46,XX avec désordre testiculaire ayant une duplication ou une surexpression de *SOX9* [Huang et coll., 1999; Kojima et coll., 2008] ou une mutation de *RSPO1* [Parma

et coll., 2006] sont également décrits. Dans la plupart des cas, outre leurs testicules atrophiques, ces individus ont un phénotype masculin normal; cependant, les patients sont toujours infertiles. Des mutations homozygotes de *WNT4* sont aussi rapportées chez quelques patients; toutefois, cette anomalie semble également associée à des anomalies cardiaques et pulmonaires, de même qu'une agénésie rénale et une hyperplasie surrénalienne [Mandel et coll., 2008]. Par ailleurs, il arrive que certains individus 46,XX développent à la fois du tissu testiculaire et ovarien, que ce soit au sein de la même gonade ou dans deux gonades différentes. Autrefois surnommée hermaphrodisme, cette pathologie est aujourd'hui appelée désordre ovotesticulaire du développement sexuel. La présence et le développement des structures de Müller et de Wolff dépendent des sécrétions hormonales provenant de la gonade adjacente. Les niveaux variables de testostérone vont également influencer le développement des organes génitaux externes qui peuvent être plus ou moins ambigus. On ne retrouve cependant pas que des individus 46,XX avec cette pathologie: si 60% des individus ont une constitution 46,XX, 12% d'entre eux ont une constitution 46,XY et 28% sont des mosaïques 46,XX/46,XY, 46,XY/47,XXY ou 45,X/46,XY [revu dans Robboy et Jaubert, 2009]. Cependant, le gène *SRY* n'est détecté que dans 10% des cas de désordres ovotesticulaires avec une constitution 46,XX [McElreavey et coll., 1992]. On comprend encore mal comment ces différentes constitutions peuvent mener à une telle pathologie. Très récemment, une mutation de *RSPO1* a été identifiée chez un patient [Tomaselli et coll., 2008].

En ce qui a trait aux individus 46,XY, le désordre de détermination gonadique le plus fréquent est la dysgénésie gonadique complète ou pure. Autrefois connue sous le nom de syndrome de Swyer, de réversion sexuelle 46,XY ou de femmes 46,XY, sa fréquence est estimée à 1 sur 3 000 nouveaux-nés [Camerino et coll., 2006]. Les patientes ne développent pas de caractères sexuels secondaires et ne sont pas menstruées; elles sont donc infertiles. Un des gènes les plus fréquemment impliqué est *SRY*. Environ 25% des femmes avec une dysgénésie gonadique pure auraient une mutation du gène *SRY* sur leur chromosome Y, ce qui rendrait le gène inactif, ou seraient porteuses d'un chromosome Y ayant perdu le gène *SRY* suite à un remaniement chromosomique [McElreavey et coll., 1995; Cameron et

Sinclair, 1997]. Une mosaïque X/XY pourrait également être la cause chez certaines patientes. Des pertes de fonction au niveau de quelques gènes impliqués dans la cascade de développement sexuel, tels que *SOX9* [Foster et coll., 1994; Wagner et coll., 1994; Mansour et coll., 1995], *WT1* [Pelletier et coll., 1991a; 1991b; Barbaux et coll., 1997; revu dans Little et Wells, 1997], *NR5A1* [Achermann et coll., 1999; revu dans Schlaubitz et coll., 2007] et *DHH* [Canto et coll., 2004], ainsi que des duplications de *NROBI* [Bardoni et coll., 1994] et *WNT4* [Jordan et coll., 2001], ont été retrouvées chez certains patients. Une délétion du bras court du chromosome 9, impliquant possiblement les gènes *DMRT1* et *DMRT2*, a également été rapportée [revu dans Muroya et coll., 2000; Öunap et coll., 2004]; toutefois, le rôle des gènes *DMRT* dans le développement sexuel est inconnu. La fréquence de ces anomalies est cependant trop faible pour permettre d'expliquer tous les cas de dysgénésie gonadique. D'autre part, l'haploinsuffisance de *SOX9*, *WT1* et *NR5A1*, de même que les délétions 9p, ont également d'autres implications sur le phénotype, de sorte qu'elles sont généralement associés à une dysgénésie gonadique dite syndromique. Ainsi, dans une grande majorité de cas de désordres de détermination gonadique dits non syndromiques chez les individus 46,XY, l'étiologie demeure inexplicée [Fleming et Vilain, 2004].

La dysgénésie gonadique pure observée chez ces individus, c'est-à-dire l'absence de cellules germinales et la présence d'une gonade fibreuse appelée bandelette gonadique, engendre l'infertilité. En effet, bien que le développement sexuel féminin soit activé chez ces individus, celui-ci serait incomplet. Il y aurait dégénérescence des follicules pendant la période embryonnaire, résultant en une apoptose des cellules germinales [revu dans Robboy et Jaubert, 2009]. Par ailleurs, la probabilité que des tumeurs bénignes ou malignes se développent dans les gonades de ces patientes est de l'ordre de 30% [Verp et Simpson, 1987]. Étant donné que les mécanismes exacts du développement de ces tumeurs sont méconnus, on procède le plus souvent à l'ablation de la gonade dysgénésique chez ces femmes afin d'écartier tout risque de cancer.

Par ailleurs, il arrive que certains individus 46,XY présentent une dysgénésie gonadique mixte, aussi connue sous le nom de dysgénésie gonadique asymétrique. Elle est caractérisée classiquement par la présence d'un testicule dygénésique et d'une bandelette gonadique contralatérale ou encore d'un testicule dygénésique sans gonade contralatérale [revu dans Robboy et Jaubert, 2009]. Récemment, il a été suggéré que les individus avec des testicules bilatéraux dygénésiques et souffrant d'une condition autrefois appelée pseudohermaphrodisme mâle dygénésique, soient également inclus dans la classe de la dysgénésie gonadique mixte [Robboy et Jaubert, 2009].

Le phénotype des individus avec une dysgénésie gonadique mixte peut être féminin ou masculin. Les structures de Wolff sont souvent immatures et il y a persistance des structures de Müller suite à la sécrétion sous-optimale de testostérone et d'AMH par le testicule dygénésique. Dans le cas d'un phénotype masculin, les organes génitaux externes sont le plus souvent asymétriques lorsqu'un seul testicule est présent ou descendu dans le scrotum. Dans le cas d'un phénotype féminin, les organes génitaux peuvent être ambigus. Les patients avec une dysgénésie gonadique mixte sont également à risque de développer des tumeurs gonadiques, quoique dans une proportion réduite (environ 15%) par rapport aux patientes avec une dysgénésie gonadique 46,XY pure [revu dans Cools et coll., 2006a]. La constitution chromosomique des patients avec une dysgénésie gonadique mixte, de phénotype masculin ou féminin, est une mosaïque X/XY dans environ 50% des cas [Zäh et coll., 1975; Robboy et coll., 1982; Yamakita et coll., 1989]. Une mutation de *DHH* pourrait également expliquer quelques cas [Umehara et coll., 2000; Canto et coll., 2005].

A.2.2.2 Tumeurs gonadiques

En 1987, Verp et Simpson notaient que les gonadoblastomes, des tumeurs caractérisées par la présence de foyers de cellules germinales, étaient retrouvés presque exclusivement chez les individus avec une dysgénésie gonadique 46,XY, le plus souvent des femmes avec la forme pure de dysgénésie gonadique XY. En fait, le tiers de ces individus développent des tumeurs gonadiques [revu dans Verp et Simpson, 1987]. Dans la plupart des cas, elles sont diagnostiquées avant l'âge de 20 ans. Considérées comme

bénignes car elles ne font pas de métastases, ces tumeurs sont toutefois pré-néoplasiques et évoluent dans près de 60% des cas en tumeurs germinales malignes. Parmi les tumeurs germinales malignes associées au gonadoblastome lors de la gonadectomie chez les jeunes femmes, le dysgerminome est de loin le plus fréquent (80% des cas) [Scully et coll., 1998a]. C'est donc dire que 50% des cas de gonadoblastomes ont déjà évolué en dysgerminomes au moment du diagnostic [revu dans Talerman et Schwartz, 2003]. On retrouve également d'autres types de tumeurs, notamment des carcinomes embryonnaires, des tératomes immatures ou des choriocarcinomes, dans une plus faible proportion de cas [revu dans Scully et coll., 1998a].

À la fin des années 1980, David Page avait émis l'hypothèse qu'un gène de susceptibilité pour le gonadoblastome était localisé sur le chromosome Y, puisque ce type de tumeur n'était que rarement diagnostiqué chez les patients sans chromosome Y [Page, 1987]. Depuis 1995, *TSPY*, le gène ampliconique retrouvé en Yp11.2, est le candidat par excellence. Il a en effet été démontré que ce gène était exprimé dans les cellules germinales des tumeurs gonadiques, notamment les gonadoblastomes [revu dans Lau et coll., 2003]. En 2005, l'équipe de Looijenga a proposé un modèle dans lequel la transformation néoplasique des cellules germinales serait due à l'expression simultanée aberrante des gènes *TSPY* et de *OCT3/4* (aussi appelé *POU5F1*); cela entraînerait la prolifération anormale de cellules germinales indifférenciées [Kersemaekers et coll., 2005]. Normalement, seules les cellules germinales indifférenciées expriment *OCT3/4*, un gène pluripotentiel. Une fois les cellules germinales en contact avec la membrane basale des cordons sexuels organisés en tubules séminifères ou en follicules ovariens, elles amorcent leur différenciation et cessent d'exprimer *OCT3/4* [Honecker et coll., 2004]. Dans le testicule, elles commencent à exprimer *TSPY* afin de proliférer et de permettre la spermatogenèse [Honecker et coll., 2004; Kersemaekers et coll., 2005]. Dans le modèle proposé, ce processus de maturation et d'organisation des cellules en tubules séminifères pourrait toutefois être perturbé par différents facteurs, notamment la cryptorchidie. Dans les testicules, un retard de maturation pourrait mener à la formation de lésions telles que le carcinome *in situ*, maintenant appelé néoplasie non spécifiée des cellules germinales intratubulaires ou IGCNU (« *intratubular germ cell neoplasia unspecified* »), puis vers le

séminome (le pendant du dysgerminome dans les testicules). Dans un contexte de dysgénésie gonadique où l'organisation des cordons sexuels ne s'effectue pas correctement dès le départ et qu'il y a présence de bandelette gonadique, les cellules germinales exprimant les deux gènes à la fois pourraient survivre dans la gonade et proliférer, formant des foyers de gonadoblastome qui pourraient évoluer vers un dysgerminome (Figure 5, page 67). Ce modèle était cependant basé sur la présence de cellules germinales dans les gonades des patientes avec une dysgénésie gonadique 46,XY pure, une entité caractérisée par l'absence de cellules germinales dans les gonades. Or, ce tissu gonadique « intermédiaire » entre les bandelettes gonadiques, où les cellules germinales auraient finalement disparu par apoptose, et les gonadoblastomes, où les cellules germinales auraient proliféré, n'avait jamais été mis en évidence. Mais l'équipe de Looijenga allait bientôt remédier à ce problème.

A.2.2.3 Tissu gonadique indifférencié

En 2006, le laboratoire de Looijenga publie un papier qui démontre la présence de cellules germinales, peu nombreuses et distribuées de façon plus ou moins aléatoire, dans les gonades de patientes 46,XY ayant subi une gonadectomie prophylactique et n'ayant pas développé de tumeur. Ces cellules germinales pouvaient être libres dans le stroma ou encore agglomérées dans des cordons sexuels primaires similaires à ceux retrouvés dans les premières étapes du développement sexuel. Ce type de tissu gonadique nouvellement reconnu, chaînon manquant dans le modèle proposé en 2005, est nommé tissu gonadique indifférencié [Cools et coll., 2006a].

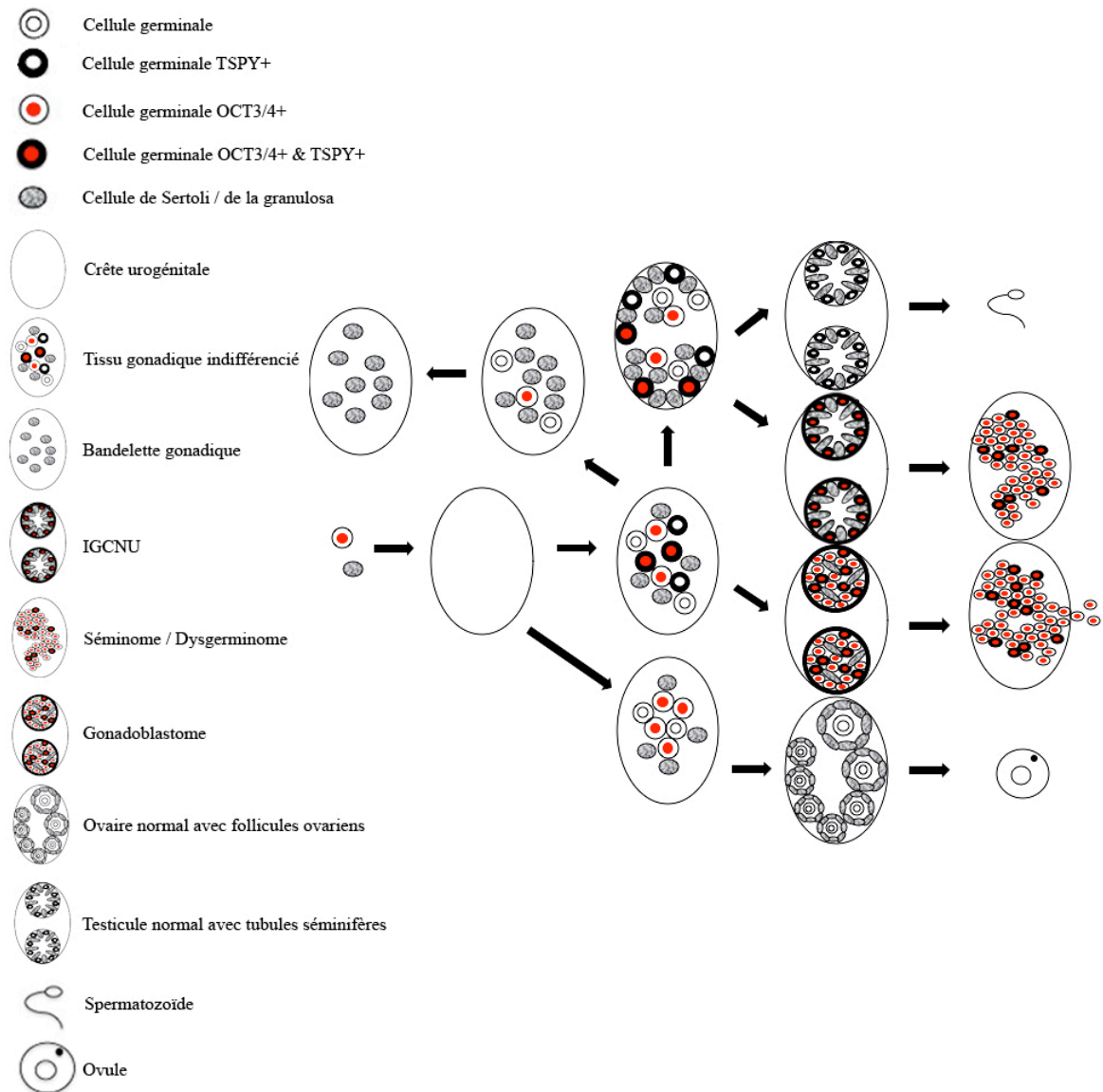


Figure 5: Modèle de pathogenèse des tumeurs gonadiques. *Modifiée de Kersemaekers et coll. [2005] et de Cools et coll. [2006a].*

Il est suggéré que chez la plupart des patientes avec une dysgénésie gonadique 46,XY, les cellules germinales meurent par apoptose, constituant ainsi des bandelettes gonadiques. Par contre, chez un certain nombre de ces individus, des cellules germinales survivent et forment du tissu gonadique indifférencié. Dans leur étude, les auteurs rapportent avoir trouvé des cellules germinales dans 32,5% des gonades analysées [Cools et

coll., 2006a], ce qui correspond à la fréquence des tumeurs gonadiques chez les patients 46,XY avec une dysgénésie gonadique pure. Ces travaux réconcilient donc non seulement le modèle de pathogenèse des gonadoblastomes et la susceptibilité des patients 46,XY avec une dysgénésie gonadique pure à développer ce type de tumeurs, mais ils permettent également d'expliquer pourquoi seulement 30% des patients développent effectivement des tumeurs.

Tel que nous venons de l'évoquer, les anomalies de la détermination gonadique peuvent avoir des répercussions graves pour les individus qui en souffrent. Il importe donc de les repérer le plus tôt possible. Or, tel que mentionné brièvement, l'étiologie de ces désordres est complexe et inclut à la fois des anomalies géniques et chromosomiques. Attardons-nous maintenant aux anomalies chromosomiques, de nombre ou de structure, afin d'évaluer leur fréquence et de mieux comprendre leur(s) rôle(s) dans les désordres de la détermination gonadique.

A.3 Les anomalies des chromosomes sexuels

A.3.1 Les anomalies de nombre

L'aneuploïdie constitutionnelle, c'est-à-dire la perte ou le gain d'un ou de plusieurs chromosomes, est généralement létale chez l'humain, à quelques exceptions près. Une aneuploïdie est en effet retrouvée dans 50 à 70% des avortements spontanés chez l'humain [revu dans Gardner et Sutherland, 2004]. Cependant, des gains de chromosomes 13, 18, 21, 22, X et Y peuvent être viables, ainsi que la perte des chromosomes X et Y [Hassold et Jacobs, 1984]. Toutefois, la faible fréquence des trisomies autosomiques retrouvées chez les naissances vivantes démontre que si elles peuvent être viables, elles n'entraînent pas moins une morbidité relativement élevée. Par contre, l'aneuploïdie des gonosomes est plus fréquente, avec une fréquence globale de 1 cas sur 500 naissances vivantes [revu dans Powell, 1999]. La morbidité moins élevée des aneuploïdies des gonosomes s'explique de

deux façons: l'inactivation de tout chromosome X supplémentaire et le faible contenu génique du chromosome Y. Ainsi, les syndromes du triple X (47,XXX) et de Klinefelter (47,XXY) ont une fréquence de 1 cas sur 1 000 naissances vivantes de sexe féminin et masculin respectivement, alors qu'un homme sur 1 000 souffre du syndrome du double Y (47,XYY) [revu dans Powell, 1999]. Quant au syndrome de Turner (45,X), bien qu'il ait une fréquence de 1 sur 5 000 naissances vivantes de sexe féminin [revu dans Powell, 1999], il présente un taux d'avortements spontanés de 99% [Hook et Warburton, 1983].

A.3.1.1 Origines et mécanismes

Dans le cas où il y a un gonosome de trop, l'origine de celui-ci varie selon le syndrome. Dans le syndrome du triple X, on rapporte que le chromosome X en trop dérive d'une erreur de la méiose I féminine dans 63% des cas, d'une erreur de la méiose II féminine dans 17% des cas, et d'une erreur mitotique post-zygotique dans 20% des cas [Hall et coll., 2006; Hassold et coll., 2007]. Dans le syndrome de Klinefelter, les études suggèrent que l'erreur est survenue au cours de la méiose I féminine dans 25% des cas, de la méiose II féminine dans 15% des cas, de la méiose I masculine dans 51% des cas, et d'une division mitotique post-zygotique dans moins de 10% des cas [Hall et coll., 2006; Hassold et coll., 2007]. Dans le syndrome de Turner, on estime que dans 70 à 80% des cas, le chromosome manquant est un chromosome Y et que le syndrome est donc dû à une erreur méiotique paternelle [Jacobs et coll., 1997]. Finalement, dans le cas du syndrome du double Y, 85% des cas seraient dus à une erreur de la méiose II masculine [Robinson et Jacobs, 1999].

En 1997, Jacobs et coll. ont avancé l'hypothèse que le patron de recombinaison des chromosomes X et Y par leurs extrémités seulement pouvait être un facteur de risque conduisant à l'aneuploïdie, notamment dans le syndrome de Turner. En effet, les chiasmas générés suite à une recombinaison homologue lors de la méiose permettent de tenir ensemble les deux homologues. Une mauvaise répartition des chiasmas pourrait ainsi affecter la ségrégation des chromosomes [revu dans Lynn et coll., 2004]. Ainsi, des chiasmas trop près des centromères pourraient causer une séparation prématurée des

chromatides-sœurs de l'un des homologues si la cohésion entre les chromatides de ce dernier est affaiblie [Hawley et coll., 1994; Koehler et coll., 1996; revu dans Lamb et coll., 1997]. Dans le cas où les chiasmata se produisent uniquement aux extrémités, il est possible qu'ils ne soient pas assez forts pour retenir les homologues ensemble jusqu'à la fin de la méiose I. Il s'ensuit un risque de ségrégation indépendante des homologues, pouvant mener à la formation de gamètes avec une chromatide en plus ou en moins à la fin de la méiose II [Hawley et coll., 1994; revu dans Lamb et coll., 1997]. Par ailleurs, puisque la zone de recombinaison des chromosomes X et Y est très petite (moins de 4 Mb), il est possible que la recombinaison n'ait parfois tout simplement pas lieu. En effet, plusieurs auteurs ont trouvé qu'il n'y avait tout simplement pas de chiasma entre le X et le Y dans la majorité des cas de syndrome de Klinefelter, faisant en sorte que les deux homologues ségrégaient de façon totalement indépendante, augmentant ainsi les risques d'aneuploïdie [revu dans Thomas et Hassold, 2003]. Dans certains cas, il a été avancé que l'absence de recombinaison en méiose I pourrait possiblement mener à une non-disjonction à la méiose II, notamment dans le syndrome de double Y, à cause d'un mauvais alignement des gonosomes sur la plaque métaphasique [Robinson et Jacobs, 1999]. Il est cependant difficile de différencier ce type d'instabilité d'une erreur post-zygotique, créant ainsi une imprécision quant à la proportion exacte de cas d'aneuploïdies causés par l'un et l'autre mécanisme [Robinson et Jacobs, 1999].

Seulement 45% des individus atteints du syndrome de Turner ont une constitution 45,X [Jacobs et coll., 1997; Sybert et McCauley, 2004]. En effet, 25 à 40% d'entre eux ont 46 chromosomes mais présentent une anomalie de structure au niveau de leur second chromosome X, avec ou sans mosaïcisme [Jacobs et coll., 1997; Sybert et McCauley, 2004]. C'est que la perte de PAR1 et des autres régions qui échappent à l'inactivation peut également causer le phénotype associé au syndrome de Turner, suite à la perte de *SHOX* notamment, tel que mentionné plus tôt. D'autre part, entre 7 et 16% des patientes avec ce syndrome présentent une mosaïque 45,X/46,XX ou 45,X/47,XXX. Finalement, on retrouve également des cas de mosaïcisme où la seconde lignée contient un chromosome Y normal ou remanié [Jacobs et coll., 1997; Sybert et McCauley, 2004]. En fait, considérant que seulement 1% des grossesses avec une constitution 45,X survivent, une hypothèse répandue

dans la littérature veut que seules les constitutions 45,X en mosaïque soient viables. Dans les cas où une lignée homogène 45,X est trouvée, une mosaïque serait présente au niveau d'autres tissus, au moins pendant une partie de l'embryogenèse [Hook et Warburton, 1983; Hassold et coll., 1988; Held et coll., 1992].

Par ailleurs, on sait depuis les années 1960 qu'avec l'âge, les individus montrent une aneuploïdie accrue de leurs gonosomes dans leurs lymphocytes sanguins, que ce soit suite à une non-disjonction ou à la perte d'un chromosome sous forme de micronoyau. Les micronoyaux sont, comme leur nom l'indique, de petits noyaux qui se forment autour de fragments chromosomiques ou de chromosomes entiers qui n'ont pas ségrégué dans une des cellules filles lors de la division cellulaire. Ainsi, n'importe quel chromosome humain peut être expulsé dans un micronoyau s'il ne migre pas avant la fin de l'anaphase (« *anaphase lag* »). Toutefois, les études ont démontré que les chromosomes sexuels sont sur-représentés dans les micronoyaux et que cette fréquence varie en fonction du sexe et de l'âge des individus [Catalán et coll., 1998]. Au contraire, la fréquence de micronoyaux contenant un autosome ne varie pas selon l'âge ou le sexe [Catalán et coll., 1998; Wojda et coll., 2007]. Chez les femmes de 24-29 ans, 14% des micronoyaux, en moyenne, contiennent un chromosome X, comparativement à une moyenne de 24% chez les femmes de 51-58 ans [Catalán et coll., 1995]. Les hommes aussi montrent de l'aneuploïdie au niveau de leurs gonosomes: 4,8% des micronoyaux contiennent un chromosome X chez les hommes de 21-29 ans comparativement à 7% chez les 50-55 ans, alors que 1,6% et 10,4% des micronoyaux contiennent un chromosome Y chez les 21-29 ans et 50-55 ans respectivement [Catalán et coll., 1998]. En ce qui concerne la non-disjonction des chromosomes sexuels, le X est impliqué dans 3,5% et 16,5% des cellules chez les hommes de 22 à 26 ans et de 60 à 70 ans respectivement, contre 2,4% et 7,3% pour le chromosome Y chez les mêmes groupes d'âge [Song et coll., 2009].

Les études initiales ont avancé plusieurs hypothèses pour expliquer cette aneuploïdie. Dans le cas du chromosome X, il a été suggéré que cela serait dû à la séparation prématurée des centromères des deux chromatides-sœurs sur le chromosome X ou un mauvais fonctionnement du centromère, faisant en sorte que le chromosome ne peut

ségréger normalement et est plutôt expulsé dans un micronoyau [revu dans Stone et Sandberg, 1995]. Par ailleurs, certaines études ont suggéré que le X inactif serait plus souvent retrouvé dans les micronoyaux que le X actif [revu dans Stone et Sandberg, 1995; Tucker et coll., 1996], bien que cela soit contesté [revu dans Catalán et coll., 2000a]. Cette séparation prématurée des centromères du X pourrait augmenter avec l'âge, expliquant ainsi l'augmentation du nombre de cellules aneuploïdes chez les femmes plus âgées, et toucher de façon préférentielle le X inactif [revu dans Stone et Sandberg, 1995]. Mais si l'aneuploïdie du X découle indirectement de l'inactivation du X, alors comment expliquer l'existence, bien que dans une plus faible proportion, de cette aneuploïdie du X chez les hommes? Peut-être la présence du chromosome X inactif dans les micronoyaux chez les femmes résulte-t-elle d'une sélection négative des cellules ayant perdu le X actif? Sauf que les cellules 46,XY ayant perdu un chromosome X ne seront pas plus viables que les cellules 46,XX ayant perdu leur X actif. Il semble donc exister un autre mécanisme prédisposant à la perte du chromosome X au cours des divisions cellulaires, autant chez l'homme que chez la femme, qui serait aggravé par l'inactivation de l'un des deux X chez cette dernière [Catalán et coll., 1998]. Ce mécanisme pourrait également être impliqué dans la non-disjonction du chromosome X. Mais qu'en est-il du chromosome Y? Sa perte est-elle la conséquence d'une véritable prédisposition ou du simple fait que la perte du chromosome Y, contrairement aux autres chromosomes, n'est pas délétère pour la cellule? Comme dans le cas du chromosome X, il y a probablement plus d'un mécanisme impliqué. Des études ont en effet montré que 76% de tous les micronoyaux retrouvés dans les cellules sont négatifs lorsqu'un marquage pour certaines protéines du kinétochore est effectué, suggérant que les micronoyaux contiennent soit des fragments chromosomiques sans centromère, soit des chromosomes dont le centromère est « défectueux » [Nath et coll., 1995]. Or, ces auteurs ont observé que 87,8% des micronoyaux contenant un chromosome Y sont négatifs pour le marquage de protéines du kinétochore [Nath et coll., 1995], comparativement à 73,8% des micronoyaux contenant un X inactif et 56,3% des micronoyaux contenant un X actif chez la femme [Tucker et coll., 1996]. Ces données suggèrent que, à l'instar du centromère du chromosome X inactif, le centromère du chromosome Y est parfois « défectueux » et que cela pourrait le rendre plus susceptible d'être perdu dans un micronoyau.

A.3.1.2 Impacts phénotypiques généraux

Si l'inactivation du deuxième chromosome X (et de tout X supplémentaire) ainsi que le faible contenu génique du chromosome Y expliquent la viabilité des syndromes d'aneuploïdies des gonosomes, il n'en demeure pas moins qu'ils ont des répercussions sur le phénotype des personnes atteintes. En effet, tel que vu précédemment, près de 15% des gènes restent actifs sur le chromosome X inactif. Ainsi, des déséquilibres géniques subsistent chez les individus avec un syndrome d'aneuploïdie des gonosomes. L'impact phénotypique se fait surtout ressentir au niveau de la croissance, du développement sexuel, de la fertilité et du développement cognitif. Ainsi, les individus souffrant du syndrome de Klinefelter ou du syndrome du triple X sont généralement plus grands que la moyenne, alors que les individus souffrant du syndrome de Turner ont une taille plus petite que la moyenne. D'autre part, on note souvent un retard de langage chez les individus 47,XXX et 47,XXY, ainsi qu'un risque de troubles d'apprentissage chez les individus 47,XXX et 47,XYY [revu dans Powell, 1999]. À l'exception du syndrome de Turner et de Klinefelter où la fertilité naturelle est extrêmement rare, la fertilité est possible dans les autres syndromes. De plus, les femmes 47,XXX et les hommes 47,XYY ne présentent pas de risque accru d'avoir des enfants porteurs d'une anomalie des gonosomes [revu dans Gardner et Sutherland, 2004].

Pour ce qui est du développement sexuel, les individus 47,XXY ont de petits testicules, des caractères sexuels secondaires généralement peu développés et peuvent souffrir de gynécomastie, alors que les individus 45,X souffrent d'aménorrhée primaire et de dysgénésie gonadique et ont des caractères secondaires peu développés. Dans le cas des individus 45,X cependant, on note également des malformations au niveau cardiaque, rénal, cutané et articulaire [revu dans Powell, 1999]. Les individus ayant en mosaïque une lignée avec du matériel provenant du chromosome Y sont par ailleurs à risque de développer des tumeurs gonadiques, comme nous l'avons vu précédemment.

A.3.2 Les anomalies de structure

Outre les anomalies de nombre, certains remaniements chromosomiques peuvent également survenir. Dans le cas du chromosome Y, leur plus faible morbidité ou mortalité associée expliquerait en partie leur fréquence. D'autre part, comme nous le verrons également, certaines spécificités du Y le rendraient particulièrement susceptible à ce genre d'événement.

A.3.2.1 Origines et mécanismes

Les remaniements chromosomiques découlent d'une ou de plusieurs cassures dans la chromatine, suivie(s) de la perte ou du repositionnement normal ou anormal du matériel impliqué. Dans les cas où le fragment se recolle au même endroit et dans la même orientation, aucune anomalie ne sera générée. Dans le cas des anomalies, soit le recollement se fait au mauvais endroit et/ou dans une orientation inversée, soit il ne se fait pas du tout.

Le chromosome Y isodicentrique [idic(Y)] est l'une des anomalies de structure du Y la plus fréquente, avec les translocations réciproques [Davis, 1981; Hsu, 1994]. Les idic(Y) sont des chromosomes contenant deux centromères constitués de deux bras chromosomiques entiers et de deux copies partielles des bras chromosomiques impliqués dans la cassure, le tout en image miroir. À l'origine, le mécanisme proposé pour les cas d'idic(Y) était une cassure dans les deux chromatides-sœurs d'un chromosome Y répliqué, la perte des fragments distaux aux centromères, puis le recollement en U des fragments contenant les centromères (Figure 6A, page 75) [Cohen et coll., 1973; Therman et coll., 1986]. Cependant, ce ne serait pas le seul mécanisme en cause. En effet, de nombreux palindromes et séquences répétées inversées ont été trouvés sur le chromosome Y [Skaletsky et coll., 2003] et il a été récemment démontré que ces séquences peuvent être impliquées dans la formation de certains idic(Y) (Figure 6B) [Lange et coll., 2009], comme nous l'expliquerons à l'instant.

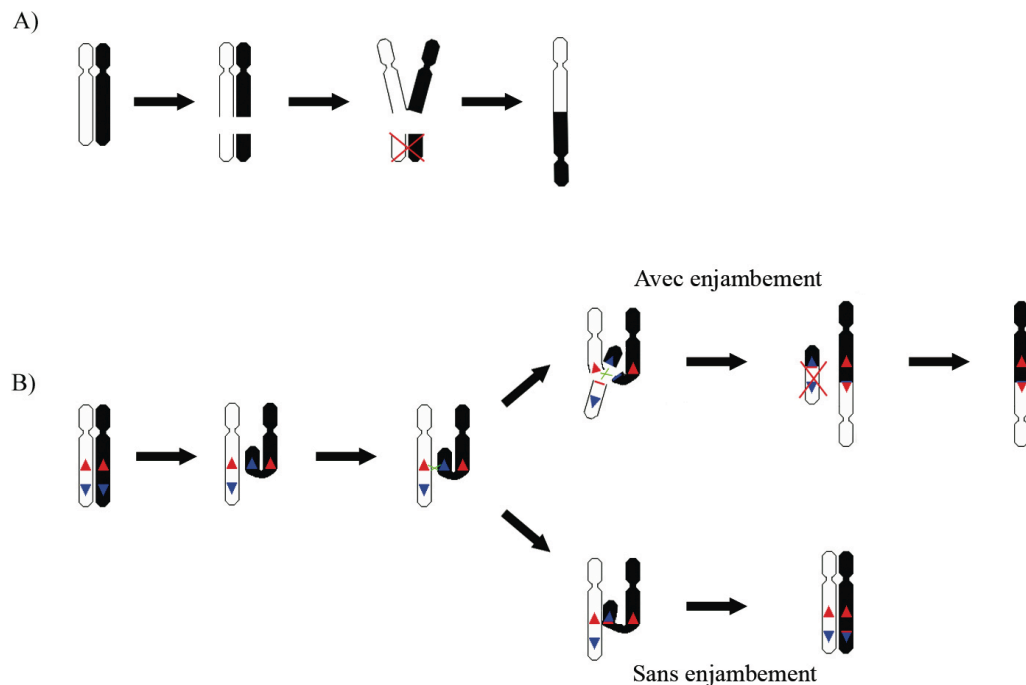


Figure 6: Mécanismes impliqués dans la formation des idic(Y), soit A) la cassure et le recollement en U des chromatides-sœurs, et B) la recombinaison non allélique entre chromatides-sœurs au niveau des bras (têtes de flèche) d'un palindrome.

Les palindromes et les séquences répétées inversées se recombinent souvent entre eux par conversion génique [Rozen et coll., 2003]. La conversion génique est un type de réparation par recombinaison homologue sans enjambement des chromatides (« *noncrossover* ») qui permet de réparer les bris affectant les deux brins d'ADN. Comme son nom l'indique, la réparation par recombinaison homologue se fait normalement entre des séquences alléliques homologues se trouvant sur les chromatides de deux homologues ou les chromatides-sœurs d'un chromosome répliqué [revu dans Filippo et coll., 2008; Hartlerode et Scully, 2009]. Dans le cas du chromosome Y, elle aurait surtout lieu entre les chromatides-sœurs, puisque le Y ne possède pas d'homologue identique sur toute sa longueur avec qui il pourrait se recombiner afin de réparer les bris, contrairement aux autosomes et au chromosome X chez la femme [Johnson et Jasin, 2000; Rozen et coll., 2003]. La recombinaison homologue nécessite l'invasion d'un brin d'ADN de l'autre

chromatide afin de servir de matrice pour la réparation. Suite à la ligation des brins pour fermer les lacunes, il en résulte un entrecroisement des brins d'ADN, appelé jonction de Holliday, qui peut être résolu de deux façons (Figure 7, ci-dessous). Dans le premier cas, seuls le brin « envahisseur » et le brin « envahi » changent de place; c'est la conversion génique, dite sans enjambement (« *noncrossover* »). Dans le second cas, il y a coupure sur les deux autres brins d'ADN, de sorte qu'il y a échange de chromatides ou enjambement (« *crossover* »). La réparation des bris double-brin par recombinaison homologue aurait principalement lieu à la méiose, une fois l'ADN répliqué, puisque la formation des jonctions de Holliday est également nécessaire à la recombinaison homologue normale entre les homologues à ce stade du cycle cellulaire [revu dans Hartlerode et Scully, 2009].

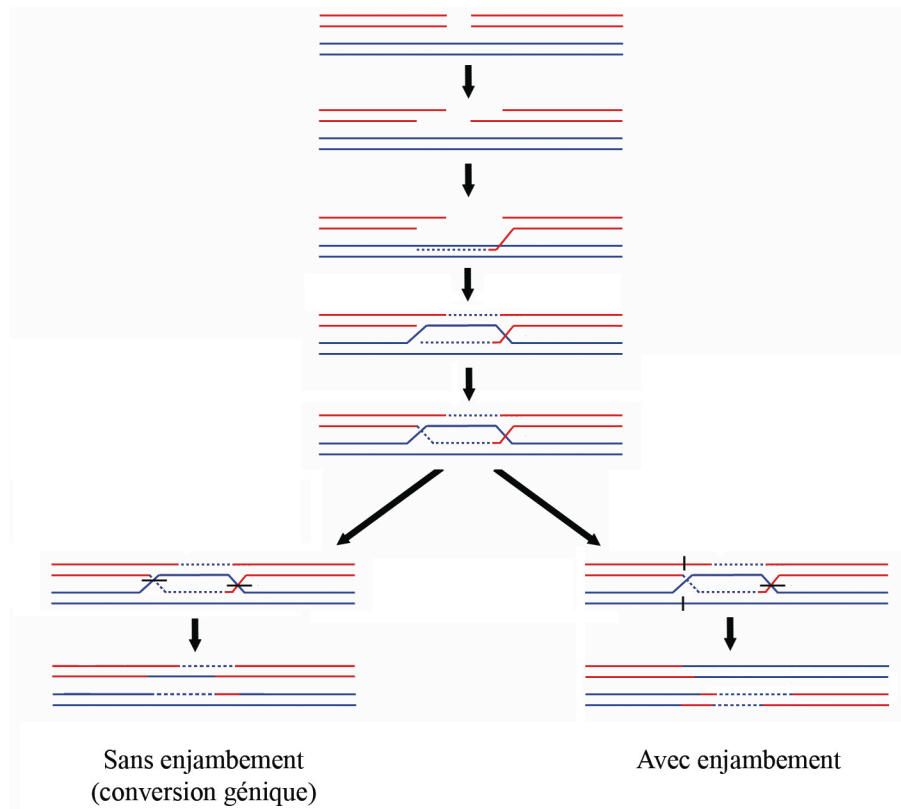


Figure 7: Schématisation des étapes de réparation d'un bris double-brin par recombinaison homologue, que ce soit entre les chromatides-sœurs d'un chromosome répliqué ou les chromatides de deux chromosomes homologues. *Modifiée de Hartlerode et Scully [2009].*

Par contre, la réparation des bris double-brin par recombinaison homologue n'a pas que des avantages, puisqu'elle peut parfois se produire entre des séquences non alléliques. Si cela se produit entre des séquences de même orientation mais qu'il n'y a pas d'enjambement, il y a homogénéisation des séquences. Dans le cas du chromosome Y, tel que mentionné plus tôt, une telle recombinaison sans enjambement entre séquences non alléliques (conversion génique) aurait souvent lieu entre les multiples copies de certains gènes exprimés dans le testicule afin de préserver l'intégrité de leur séquence [Rozen et coll., 2003]. S'il y a enjambement entre chromatides-sœurs au niveau de séquences non alléliques de même orientation se trouvant en plusieurs copies sur un même chromosome, il en résultera plutôt des délétions et des duplications interstitielles [revu dans Shaw et Lupski, 2004]. Ce mécanisme pourrait expliquer certaines délétions interstitielles dans les régions AZF sur le chromosome Y (Figure 3, page 46) [Blanco et coll., 2000; Sun et coll., 2000; Kuroda-Kawaguchi et coll., 2001; Bosch et Jobling, 2003; Hurles et coll., 2004]. De plus, un enjambement entre les séquences répétées inversées ou les palindromes d'une même chromatide peut expliquer les inversions paracentriques ou péricentriques parfois observées sur le chromosome Y (Figure 3) [Tilford et coll., 2001; revu dans Hurles et Jobling, 2003]. Par ailleurs, Lange et coll. [2009] ont récemment démontré que si l'enjambement avait lieu entre des séquences répétées inversées non pas au sein de la même chromatide mais bien entre les chromatides-sœurs d'un Y répliqué, cela pouvait mener à la formation d'idic(Y) (Figure 6B, page 75).

L'un des aspects les plus importants des idic(Y) est leur instabilité au cours des divisions cellulaires. En effet, la présence de deux centromères peut être problématique lorsque vient le temps de procéder à la division cellulaire. Un des deux centromères sera inactivé, éventuellement, afin de faciliter la ségrégation [Therman et coll., 1986]. Toutefois, cette inactivation ne se fait pas tout de suite, de sorte que différentes lignées peuvent être créées chez l'embryon entre temps. La plus importante est la lignée 45,X suite à la perte de l'idic(Y) sous forme de micronoyau. Cela peut se produire lorsque les deux centromères d'une même chromatide lient les pôles opposés du fuseau mitotique, de sorte que l'idic(Y) est littéralement tirailé. Cela peut faire en sorte que l'idic(Y) ne migre pas avant la fin de l'anaphase. Il se forme alors un micronoyau autour du chromosome impliqué. Il en résulte donc deux cellules filles chacune à 45,X et la perte de l'idic(Y) dans les cellules qui en découleront (Figure 8A, page 79). D'autre part, l'idic(Y) tirailé peut également se séparer en deux, entraînant la formation de deux cellules filles au contenu génétique différent: dans la première on retrouve un idic(Y) et un marqueur (mar) dérivé de l'idic(Y), alors que dans la seconde on retrouvera un marqueur dérivé de l'idic(Y) uniquement (Figure 8B). L'extrémité où est survenue la cassure sur le chromosome marqueur peut alors être stabilisée par l'addition ou la capture de télomères [revu dans Fortin et coll., 2009], ou encore par la formation d'un autre idic(Y) par recollement en U avec la chromatide-sœur générée lors de la prochaine phase S, un phénomène appelé cycle bris-fusion-pont et décrit originalement par Barbara McClintock [McClintock, 1941].

Dans le cas où les deux centromères sont très rapprochés l'un de l'autre, il est possible que les deux centromères agissent en synergie, stabilisant ainsi l'idic(Y) sans que l'inactivation d'un centromère ne soit nécessaire [revu dans Lange et coll., 2009].

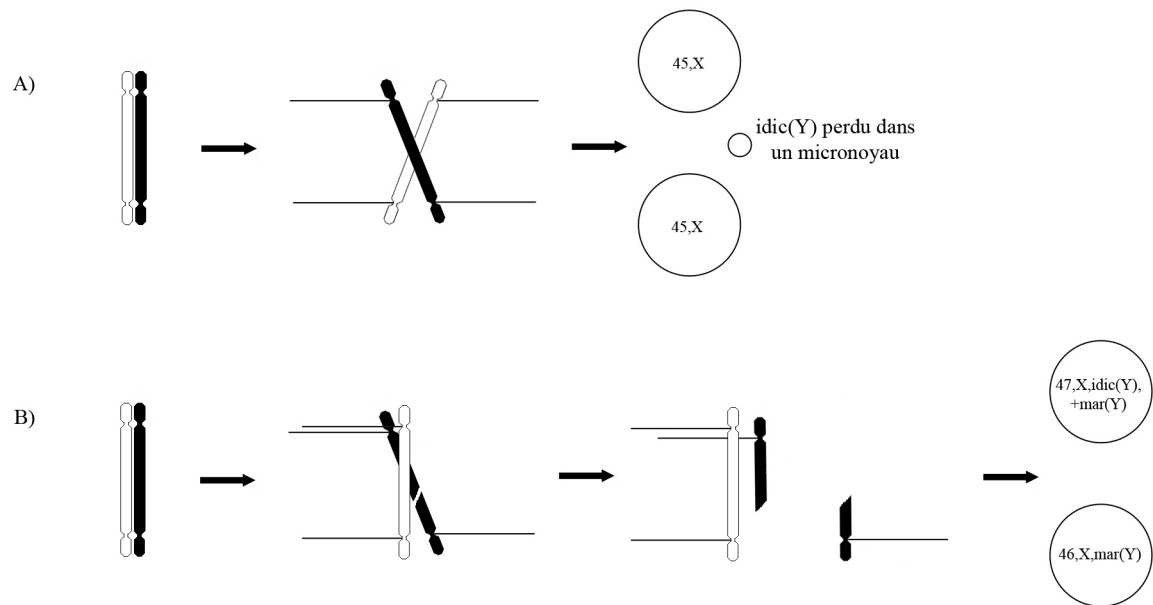


Figure 8: Schéma illustrant A) le retard de migration à l'anaphase et B) la cassure de l'idic(Y) pouvant se produire au cours des divisions cellulaires et mener à l'instabilité de l'idic(Y).

Un autre remaniement de structure, plutôt rare celui-là, est également très instable au cours des divisions cellulaires: c'est le chromosome Y en anneau [r(Y)]. Il est formé suite à deux cassures, une à chaque extrémité du chromosome, et le recollement en forme d'anneau du fragment contenant le centromère (Figure 9A, page 80).

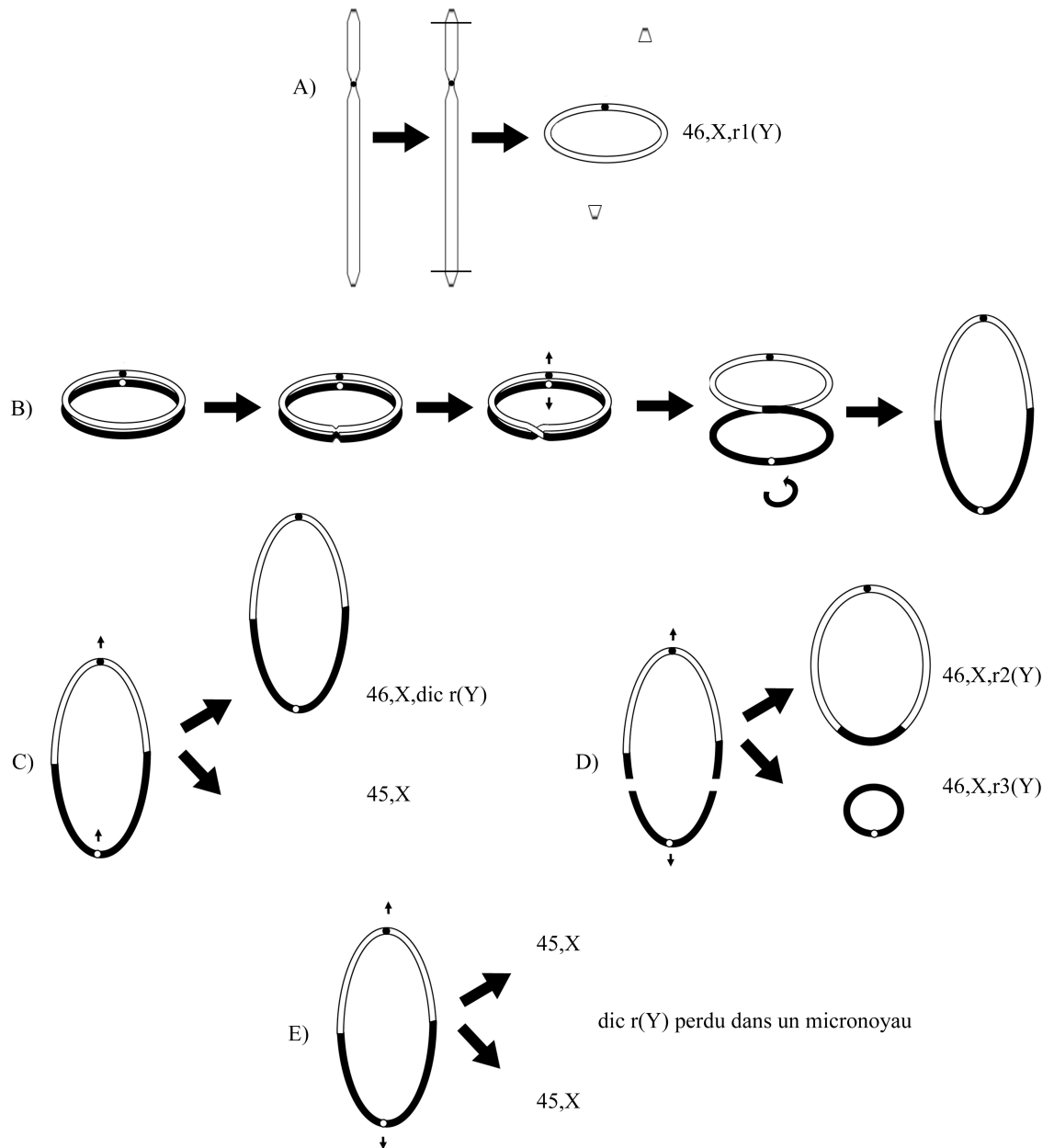


Figure 9: Schéma illustrant A) la formation de l'anneau ainsi que B) l'instabilité qui peut résulter suite à un échange entre chromatides-sœurs engendrant la formation d'un anneau dicentrique qui peut C) lier le même pôle du fuseau mitotique, D) lier des pôles opposés et se briser, ou E) lier des pôles opposés et subir un retard à l'anaphase. *Modifiée de Lejeune [1968].*

Dans le cas d'un $r(Y)$, une instabilité mitotique peut survenir après un nombre impair d'échanges entre ses chromatides après la réplication; il en résulte alors la formation d'un anneau double ou dicentrique [$dic\ r(Y)$] (Figure 9B, page 80). Les deux centromères de l'anneau dicentrique peuvent lier le même pôle du fuseau mitotique, générant ainsi une lignée 45,X et une lignée 46,X, $dic\ r(Y)$ (Figure 9C). Les centromères peuvent également lier des pôles opposés du fuseau mitotique et, à l'instar des $idic(Y)$, l'anneau peut se briser et ainsi former d'autres anneaux (r_2 et r_3) dérivés de l'anneau original (r_1) (Figure 9D), ou encore subir un retard de migration à l'anaphase et être perdu sous forme de micronoyau (Figure 9E). Par contre, si un autre échange entre chromatides-sœurs se produit après la réplication de l'anneau dicentrique, ce dernier pourrait former un anneau tétracentrique [$tetra\ r(Y)$], qui pourrait lui-même former un anneau octacentrique [$octa\ r(Y)$], etc. De nombreuses lignées peuvent ainsi être retrouvées chez un même patient [Henegariu et coll., 1997b; DesGroseilliers et coll., 2006b].

En ce qui a trait aux translocations réciproques, elles supposent l'apparition de cassures dans les deux chromosomes impliqués, suivi d'un échange de matériel. Dans le cas des translocations impliquant le chromosome Y, certaines séquences sur le Y prédisposeraient ce dernier aux translocations, particulièrement avec le chromosome X, ce qui pourrait expliquer leur fréquence. Par exemple, certaines régions d'homologie ancestrale entre les chromosomes X et Y seraient en cause. C'est le cas notamment des régions Yp11.2 et Xp22.33 brièvement discutées plus tôt, qui sont le plus fréquemment impliquées. Ces deux régions, rappelons-le, contiennent respectivement les gènes *PRKY* et *PRKX*. Leur séquence présente 94% d'homologie et il a été démontré que ces deux gènes ont tendance à se recombiner entre eux [Schiebel et coll., 1997]. Normalement, la recombinaison homologe entre les chromosomes sexuels ne s'effectue qu'au niveau des régions PAR1 lors de la méiose I paternelle. Toutefois, *PRKX* étant situé juste en-dessous de la région PAR1, il semble que la recombinaison homologe puisse parfois anormalement s'étendre jusqu'à ce gène. Mais voilà, étant donné la position de *PRKY* sur le Y, la recombinaison homologe anormale entre *PRKX* et *PRKY* a des conséquences importantes. En effet, le gène *SRY* étant situé entre la région PAR1 du Y et *PRKY*, la

recombinaison entre *PRKX* et *PRKY* entraîne le transfert du gène *SRY* du chromosome Y sur le chromosome X, générant des gamètes 23,Y *SRY*- et 23,X *SRY*+ (Figure 10, page 83). Suite à la fécondation d'un ovule 23,X, par le spermatozoïde possédant le der(X) avec *SRY* ou le der(Y) sans *SRY*, le fœtus aura une constitution 46,XX *SRY*+ ou 46,XY *SRY*-, ce qui, comme nous l'avons vu, cause un désordre du développement sexuel.

Tel que vu plus tôt, une inversion paracentrique de 3,6 Mb en Yp11.2 peut être présente chez certains individus 46,XY suite à une recombinaison entre les séquences répétées inversées IR3 présentes sur le bras court du chromosome Y (Figure 3, page 46). Cette inversion, sans effet phénotypique chez le porteur, est cependant un facteur de risque pour la recombinaison entre les gènes *PRKX* et *PRKY* [Jobling et coll., 1998; Sharp et coll., 2005]. En effet, *PRKX* et *PRKY* sont normalement en orientation inverse l'un par rapport à l'autre sur leur bras chromosomique respectif. Cependant, suite à l'inversion paracentrique du bras court du Y, le gène *PRKY* se retrouve dans la même orientation que *PRKX*, augmentant ainsi les chances de recombinaison entre ces deux gènes. Si les hommes porteurs d'une inversion paracentrique en Yp11.2 n'ont pas de phénotype anormal, ils sont cependant plus à risque d'avoir une descendance souffrant d'un désordre du développement sexuel.

Une homologie de séquence entre les chromosomes X et Y, dans la région Yq11.2-Xp22.33 décrite plus tôt, pourrait également jouer un rôle dans des translocations impliquant le bras court du X et le bras long du Y [Yen et coll., 1991; Guioli et coll., 1992; Weil et coll., 1994]. Ces translocations sont toutefois beaucoup plus rares que celles impliquant le bras court du Y [Weil et coll., 1994].

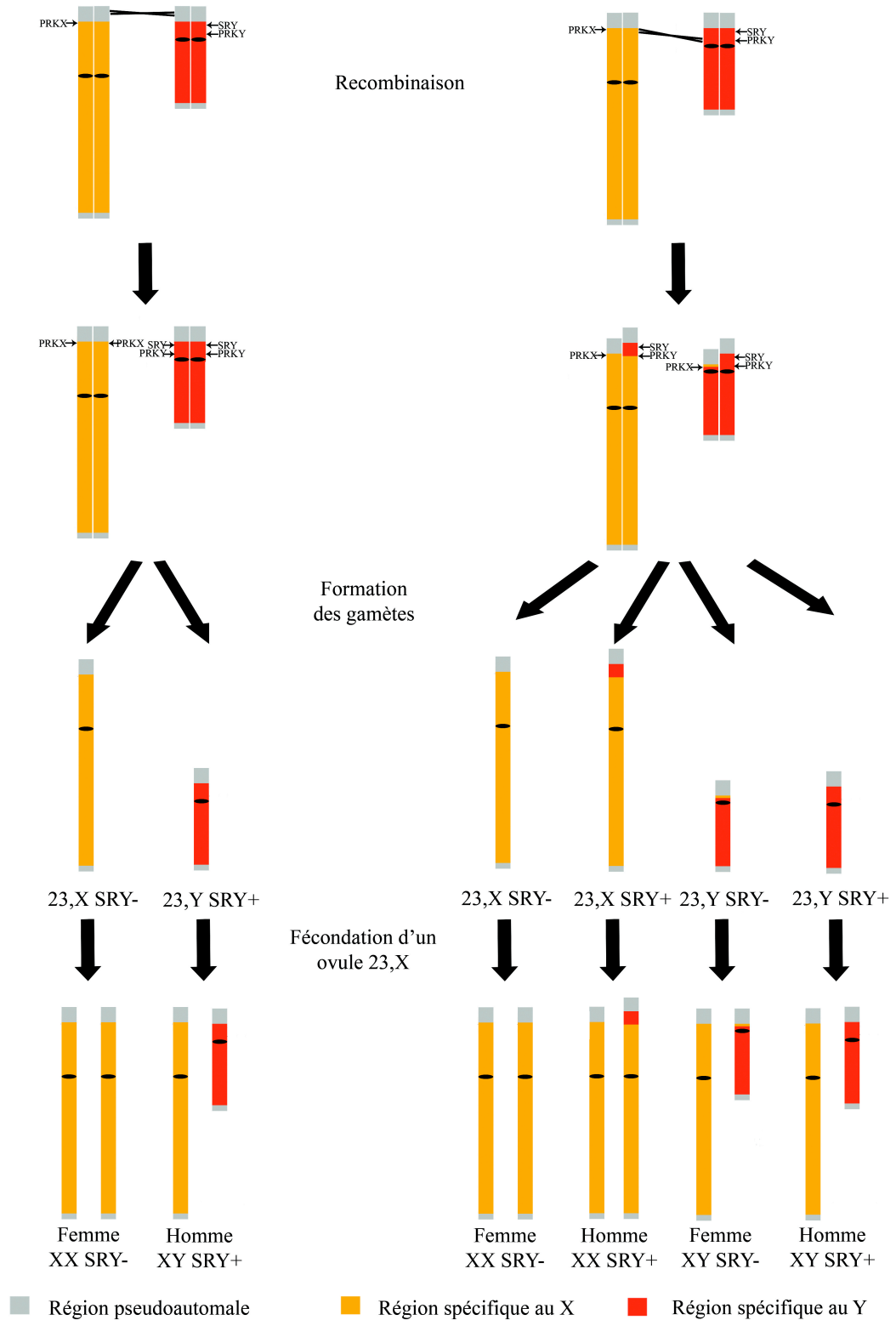


Figure 10: Représentation schématique de la recombinaison normale et anormale pouvant survenir lors de la méiose paternelle, ainsi que des constitutions chromosomiques résultantes chez la descendance. *Modifiée de Wilhelm et coll. [2007].*

A.3.2.2 Impacts phénotypiques généraux

L'instabilité des $idic(Y)$ et des $r(Y)$ engendre une lignée 45,X qui peut être très importante, tel que nous venons de le voir. Cette lignée pourra avoir des conséquences évidentes sur le développement des individus ayant ce type de remaniement. Les patients peuvent ainsi avoir un développement sexuel anormal et des stigmates plus ou moins importants du syndrome de Turner. Le point de cassure de l' $idic(Y)$ ou du $r(Y)$, entraînant par exemple la perte de *SRY* ou de *SHOX*, peut également influencer le phénotype [Henegariu et coll., 1997a; revu dans Bouayed Abdelmoula et Amouri, 2005b; DesGroseilliers et coll., 2006b]. Depuis de nombreuses années, plusieurs auteurs ont fait l'hypothèse que l'importance de la lignée 45,X, tout particulièrement dans les gonades, influençait le phénotype sexuel des patients [Daniel et coll., 1980; Hsu, 1994; Tuck-Muller et coll., 1995; Bouayed Abdelmoula et Amouri, 2005b]. Toutefois, très peu d'études sur le tissu gonadique ont été menées, de sorte que cette hypothèse n'a jamais véritablement été confirmée [revu dans Bouayed Abdelmoula et Amouri, 2005b].

En ce qui a trait aux translocations X;Y, il peut s'ensuivre une trisomie partielle de la région PAR1, ce qui entraînera des stigmates plus ou moins importants du syndrome de Klinefelter, chez les individus porteurs de la forme déséquilibrée. Toutefois, la conséquence la plus fréquente est le développement sexuel anormal, tant chez les individus avec le dérivé X de la translocation [$der(X)t(X;Y)$] que les individus avec le $der(Y)$. La grande majorité des individus 46,X, $der(X)t(X;Y)$ auront un développement sexuel masculin, tel que vu précédemment. Cependant, ces individus ne présentent pas tous un phénotype masculin complet; une faible proportion d'entre eux présente un désordre ovotesticulaire (hermaphrodisme). La proportion de cellules avec le X normal inactif par rapport à celles avec le $der(X)$ inactif ne semble pas vraiment influencer le développement sexuel des individus. En effet, même lorsque c'est le $der(X)$ qui est inactif, la portion chromosomique provenant du Y n'est que peu inactivée [Sharp et coll., 2005]. Par ailleurs, on retrouve un plus grand nombre de cellules avec le X normal inactif autant chez les individus avec désordre ovotesticulaire (hermaphrodites) que ceux avec désordre testiculaire (hommes

XX). Il semble cependant que la localisation du point de cassure près de *SRY* puisse influencer négativement son expression, perturbant ainsi le développement sexuel [Sharp et coll., 2005].

En ce qui a trait aux individus 46,X,der(Y)t(X;Y), tous les patients où *SRY* a été perdu suite à la translocation ont un phénotype féminin. Il arrive cependant que le point de cassure sur le Y ne soit pas dans le bras court, mais bien sur le bras long; *SRY* est alors conservé. Une partie de ces patients présenteront un phénotype masculin, alors que les autres patients auront un phénotype féminin malgré tout. Ces divergences de phénotypes seraient due à l'absence ou la présence respectivement d'une copie supplémentaire du gène *NROBI* sur le der(Y) [Bardoni et coll., 1994; revu dans Baumstark et coll., 1996]. Toutefois, le rôle exact de *NROBI* dans le développement sexuel n'étant pas bien compris, le mécanisme impliqué dans le développement sexuel anormal des patients n'est pas connu [revu dans Quigley, 2006]. Par ailleurs, ces patients présentent également d'autres anomalies phénotypiques importantes, telles que des dysmorphies faciales, un retard de développement et un retard mental, à cause de la présence d'une partie plus ou moins importante du bras court du chromosome X qui demeure active [revu dans Baumstark et coll., 1996].

A.4 Les patients, les spécimens utilisés et la description des outils de travail

Afin de bien comprendre le travail présenté dans cette thèse, il est important d'introduire ici quelques précisions et principes généraux en ce qui a trait aux outils utilisés ainsi qu'aux patients étudiés.

A.4.1 L'approbation éthique et les patients sélectionnés

Après approbation du projet par le comité d'éthique de la recherche du Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, les patients choisis dans cette étude présentent un

développement sexuel anormal et/ou une anomalie du chromosome Y. Une analyse caryotypique en bandes GTG a été faite chez tous les patients. Après exclusion des individus avec insensibilité aux androgènes, 41 patients ont été sélectionnés. Ces patients se répartissent comme suit:

- dix individus de sexe féminin présentant un chromosome Y isocentrique [idic(Y)];
- sept individus de sexe masculin, dont un fœtus, présentant un idic(Y);
- quatre individus de sexe masculin, dont deux jumeaux monozygotiques, présentant une translocation entre les chromosomes X et Y [t(X;Y)];
- un individu de sexe féminin présentant une t(X;Y);
- un individu de sexe féminin avec un chromosome Y en anneau [r(Y)];
- treize individus de sexe féminin avec un chromosome Y normal et dysgénésie gonadique;
- trois individus de sexe masculin avec un chromosome Y normal et dysgénésie gonadique;
- un fœtus XY avec un désordre de la différenciation génitale (pseudohermaphrodisme) et une trisomie 22 [47,XY,+22];
- un fœtus XY avec désordre ovotesticulaire (hermaphrodisme vrai) et une mutation du gène *SOX9*.

A.4.2 Les spécimens utilisés

Afin de mener à bien ce projet, plusieurs types de spécimens biologiques provenant des patients et des témoins sont étudiés, que ce soit le sang périphérique, les fibroblastes cutanés, le tissu gonadique ou le liquide amniotique. Les paramètres généraux de l'obtention des cellules pour chaque type de spécimen sont résumés ici.

A.4.2.1 Lymphocytes du sang périphérique

Les lymphocytes sanguins sont obtenus après une simple prise de sang. Le sang est ensuite mis en présence de milieu RPMI 1640 (Invitrogen, Burlington, On, Canada)

complet, c'est-à-dire avec 10% de sérum de veau foetal (Invitrogen), 1% de phytohémagglutinine (PHA) (GibcoBRL, Grand Island, NY, États-Unis) et 0,1% d'antibiotique (gentamycine) (Invitrogen), pour 72 heures afin d'induire la division cellulaire des lymphocytes et de permettre leur prolifération. Un analogue de la thymidine, le 5-bromo-2'-déoxyuridine (BrdU) (Sigma-Aldrich, Oakville, On, Canada) est également ajouté afin d'obtenir des bandes R, mais nous y reviendrons à la section A.4.5.3 (page 101). Les cellules sont ensuite soumises à une synchronisation cellulaire, un processus qui permet d'obtenir des chromosomes plus longs avec plus de bandes chromosomiques, ce qui permet une analyse caryotypique plus fine. Pour ce faire, de la thymidine (300 µg/ml) (Sigma-Aldrich) est ajoutée au milieu de culture pendant 17 heures, provoquant un débalancement dans les nucléotides et l'arrêt du cycle cellulaire avant le début de la phase de synthèse ou au milieu de cette dernière [Lavoie et Drouin, 2001]. Après que l'excès de thymidine ait été enlevé par lavages, les cellules sont remises dans du milieu M199 complet (Invitrogen) et reprennent leur synthèse de façon synchrone, d'où le terme de synchronisation cellulaire. Puisque nous connaissons la durée de chaque phase du cycle cellulaire, il est alors possible de calculer à quel moment la majorité des cellules atteint le stade désiré du cycle cellulaire, la prométaphase, moment où les chromosomes sont moins condensés qu'à la métaphase [Drouin et coll., 1988]. À ce moment, soit 4 heures plus tard, la formation du fuseau mitotique est bloquée grâce à l'ajout de colchicine (0,09 µg/ml) (ColcemidTM; Invitrogen) pendant 30 minutes, afin d'empêcher les cellules d'entrer en anaphase et ainsi obtenir un maximum de cellules au stade de la prométaphase. Débute alors ce que l'on nomme la récolte des chromosomes. Après centrifugation, le milieu de culture est retiré et les cellules sont ensuite mises en présence d'une solution hypotonique de chlorure de potassium à 0,56% pendant 20 minutes. Cette étape fait gonfler les cellules, donnant plus d'espace aux chromosomes pour se déployer. Après une autre centrifugation et le retrait de la solution hypotonique, un fixateur constitué de 3 volumes de méthanol et de 1 volume d'acide acétique, le carnoy I, est ajouté pendant 20 minutes pour assurer la fixation et la conservation des cellules. La fixation est répétée deux autres fois, puis les cellules fixées sont étalées sur des lames de microscope; ce sont les préparations chromosomiques [modifié de Dutrillaux et Couturier, 1981; Lemieux et coll., 1990].

A.4.2.2 Fibroblastes cutanés et tissu gonadique frais

Le tissu gonadique frais ou la peau, tous deux prélevés en salle d'opération et acheminés au laboratoire de cytogénétique, est d'abord coupé en deux: une première moitié est congelée à -80°C comme matériel de réserve. La seconde moitié est découpée en petits morceaux, que l'on nomme explants, à l'aide d'un bistouri stérile. Les explants sont ensuite déposés soit sur 4 lames de microscope reposant au fond de flacons subdivisés en 4 compartiments, le quadriPERMTM (Sigma-Aldrich), ou dans un flacon T25 (Sarsted, Montréal, Qc, Canada). Les explants sont ensuite recouverts de milieu DMEM (Invitrogen) complet, c'est-à-dire contenant 16,5% de sérum de veau fœtal (Invitrogen) et 0,2% de gentamycine (Invitrogen). En proliférant, les cellules vont migrer à partir des explants et tapisser la lame. Les cellules sont cultivées pendant 2 à 10 jours. Au terme de la culture, de la colchicine (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Invitrogen) est ajoutée dans les quadriPERMTM pendant 4 heures afin de bloquer la formation du fuseau mitotique, puis le milieu est enlevé. La solution hypotonique de chlorure de potassium 0,56% est ajoutée pour 30 minutes, puis les lames sont ensuite mises dans un contenant avec du carnoy II, un fixateur constitué de 6 volumes de méthanol, 3 volumes de chloroforme et de 1 volume d'acide acétique; après environ 20 minutes, du carnoy I est ajouté. Après 5 minutes, le surnageant est enlevé et remplacé par du carnoy I frais pour 20 minutes. Après deux autres fixations, les lames sont séchées [modifié de Dutrillaux et Couturier, 1981; Rooney et Szepulkowski, 1992].

Pour ce qui est des cellules dans les flacons T25, elles servent de réserve en cas de problème ou pour effectuer des analyses supplémentaires. Dans ce cas, le milieu de culture est enlevé et les cellules sont décollées du fond du flacon par un traitement enzymatique léger à la trypsine (0,05%) (Invitrogen). Les cellules sont ensuite transférées dans un tube où elles sont traitées à la colchicine et récoltées comme il a été décrit pour le sang [modifié de Dutrillaux et Couturier, 1981; Rooney et Szepulkowski, 1992].

Dans les cas où les cultures ont échoué, la réserve de tissus congelés à -80°C est utilisée pour faire ce qu'on appelle des « empreintes ». Cette technique consiste à appliquer le tissu congelé à différents endroits sur une lame afin d'y déposer une quantité souhaitée de cellules. Le tissu est ensuite immédiatement remis au congélateur. La lame, quant à elle,

est séchée à l'air libre 1 minute, puis mise dans le carnoy I pour 20 minutes afin de fixer les cellules [modifié de Matsumura et coll., 1992]. Il est à noter que cette technique ne permet pas d'obtenir de cellules en division; les lames ainsi réalisées sont utilisées pour l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) interphasique dont nous discuterons plus loin.

A.4.2.3 Liquide amniotique

Les cellules du liquide amniotique, qui proviennent de la desquamation des cellules de la peau et des tractus digestif et urinaire du fœtus, ainsi que de l'amnion (membrane de la cavité amniotique), sont obtenues suite à deux ponctions de liquide amniotique. Le liquide de chaque tube est ensuite centrifugé afin d'isoler les cellules, puis le culot de cellules est resuspendu dans du milieu de culture A10 (Wisent, St-Bruno, Qc, Canada). Les cellules sont ensuite disposées dans un quadriPERM™ (deux lames par tube) et dans un flacon T25 (les deux tubes combinés). Au terme d'une culture d'environ 5 à 10 jours, de la colchicine (0,03 µg/ml) est ajoutée pendant une heure. Les lames sont ensuite mises à l'horizontale dans une solution hypotonique de citrate de sodium 0,8%; après 25 minutes, du carnoy I est ajouté. Le surnageant est aspiré après 5 minutes et remplacé par du carnoy I frais pour 20 minutes. Après deux autres fixations, les lames sont séchées [modifié de Dutrillaux et Couturier, 1981; Rooney et Szepulkowski, 1992].

Quant au flacon T25, il est utilisé comme matériel de réserve en cas de problème ou pour étaler de nouvelles lames afin d'effectuer des analyses supplémentaires. Dans ce cas, le milieu de culture A10 est enlevé et les cellules sont décollées du fond du flacon par un traitement enzymatique léger à la trypsine 0,05%. Les cellules sont ensuite réparties sur les 4 lames d'un quadriPERM™ dans du milieu de culture A10. Après 2 ou 3 jours de culture, les lames sont récoltées suivant la procédure venant d'être décrite [modifié de Dutrillaux et Couturier, 1981; Rooney et Szepulkowski, 1992].

A.4.2.4 Tissu gonadique fixé

Le tissu gonadique, obtenu de patients ayant subi une gonadectomie prophylactique ou une biopsie, fixé au formaldéhyde et encastré dans de la paraffine, est coupé en tranches de 15 µm au microtome. Ces tranches plus épaisses permettent d'obtenir une plus grande proportion de cellules avec un noyau entier, et donc de faire une évaluation plus précise du niveau d'aneuploïdie. Les tranches, entre 3 et 5, sont mises dans des tubes de 15 ml (Sarstedt) et déparaffinées grâce à un solvant, le xylène (Fisher Scientific, Montréal, Qc, Canada). Elles sont ensuite réhydratées par 5 bains d'éthanol de concentration décroissante (100% à 50%) suivis de 3 bains d'eau distillée. Elles subissent ensuite deux digestions enzymatiques qui ont pour but d'éliminer les fibres de collagène présentes dans le tissu et d'isoler les cellules. En résumé, elles sont mises dans un premier temps en présence de collagénase type IA-S (5 mg/ml) (Sigma-Aldrich) pendant 2 à 3 heures, et rincées par lavages. Ensuite, elles sont mise en présence de trypsine 0,05% (Invitrogen) pour 1 à 2 heures, puis rincées par lavages. Une goutte de suspension cellulaire est ensuite déposée sur des lames de microscope, qui sont chauffées à 50°C pendant 2 heures afin de fixer les cellules. Les lames sont ensuite déshydratées dans 4 bains d'éthanol de concentration croissante (70% à 100%) puis séchées [modifié de Kuchinka et coll. 1995]. Il est à noter que cette technique ne permet pas d'obtenir des cellules en division; les lames obtenues ne servent donc qu'à la FISH interphasique.

A.4.3 L'analyse caryotypique

L'analyse caryotypique est basée sur l'étude de chromosomes marqués en bandes, c'est-à-dire présentant une succession de régions pâles et foncées après marquage, c'est-à-dire des traitements chimiques, thermiques et/ou enzymatiques suivis d'une coloration. L'analyse caryotypique requiert donc des cellules en division, puisque les chromosomes doivent être visibles. Le patron de bandes obtenu après ces marquages est spécifique pour chaque paire de chromosomes, et ce, pour chaque type de marquage. C'est grâce à ce patron de bandes, de même que la taille du chromosome et la position du centromère, que chaque chromosome peut être identifié. L'analyse caryotypique permet non seulement de

déterminer le nombre de chromosomes par cellules, mais également de vérifier si la structure de chaque chromosome est normale; elle permet donc la détection des anomalies de nombre et de structure en cytogénétique. Il existe plusieurs types de marquages qui permettent d'obtenir différentes sortes de bandes sur les chromosomes, les plus communes étant les bandes G, C et R. Ces marquages s'appuient sur les différentes propriétés des diverses régions des chromosomes, notamment le niveau de compaction de la chromatine et la composition en paires de bases.

Dans le cadre de cette thèse, c'est le marquage morphologique GTG, c'est-à-dire le marquage en bandes G après traitement à la trypsine et coloration au Giemsa, qui a été le plus utilisé pour l'analyse caryotypique. Il est effectué directement sur les préparations chromosomiques. Il est basé sur l'action d'une enzyme, la trypsine, qui altère la structure de la chromatine [Sahin et coll., 1999]. En contrôlant la concentration (autour de 2%) de la trypsine (Invitrogen) et le temps de digestion (environ 15 et 90 secondes), on obtient une digestion plus restreinte aux régions les moins condensées des chromosomes [Sahin et coll., 1999]. Lorsque les préparations chromosomiques sont trempées dans le Giemsa (environ 2%, pour approximativement 2 minutes 30 secondes) (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ, États-Unis), qui colore l'ADN en bleu, seules les régions moins digérées retiendront le colorant; ce sont les bandes G [modifié de Seabright, 1971; Lemieux et coll., 1990]. Les bandes R, qui ont été plus digérées par la trypsine, prendront beaucoup moins la coloration. Ce type de marquage ne permet pas complètement de faire la distinction entre l'euchromatine et l'hétérochromatine des chromosomes, cette dernière pouvant être pâle ou foncée selon son degré de compaction.

Dans certains cas, le marquage morphologique CBG est aussi utilisé: il s'agit d'un marquage en bandes C après traitement à l'hydroxyde de baryum (0,3 M) (Fisher) à 37°C pour un temps variant entre 10 secondes et 2-3 minutes, suivi d'un bain de solution saline-citrate de sodium à pH 7,0 [0,3 M de chlorure de sodium (Fisher) et 0,03 M de citrate de sodium (Fisher)] à 60°C pendant 20 minutes, et d'une coloration au Giemsa (4%) d'environ 10 minutes [modifié de Sumner, 1972]. Il est basé sur la dénaturation de la chromatine par

l'effet combiné de la chaleur et de la solution alcaline qu'est l'hydroxyde de baryum. Ce traitement étant très agressif, seules les régions contenant de l'hétérochromatine seront assez préservées pour prendre la coloration, possiblement parce qu'elles contiennent certaines protéines particulières [revu dans Verma et Babu, 1989]. Ce marquage met en évidence les centromères de tous les chromosomes, les régions d'hétérochromatine péricentromérique des chromosomes 1, 9 et 16, les bras courts des chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22, ainsi que l'hétérochromatine du bras long du chromosome Y. Ce type de marquage permet donc de distinguer l'hétérochromatine de l'euchromatine, puisque cette dernière n'est pas colorée.

A.4.4 L'immunohistochimie

Les tissus déjà fixés au formaldéhyde et encastrés dans de la paraffine sont coupés en fines tranches de 3 μm et déposés sur des lames de microscope. Les lames sont ensuite déparaffinées dans du toluène (Chapteck, Pointe-aux-Trembles, Qc, Canada). Une coloration à l'hématoxyline Harris avec acide acétique (ACP Chemicals, Montréal, Qc, Canada), à la phloxine B 1% (ACP Chemicals) et au safran (safran du Gâtinais; Chapteck) est ensuite effectuée dans un appareil de coloration automatique (Sakura Finetek USA, Torrance, CA, États-Unis), ce qui permet de différencier le collagène (jaune), les muscles (rouge), le cytoplasme des cellules (rose) et les noyaux cellulaires (bleu foncé) sur les préparations histologiques. Par ailleurs, différents antigènes peuvent être mis en évidence dans les coupes afin d'identifier avec précision les différents types de cellules et de structures. Toutefois, les doubles liaisons formées par le formaldéhyde avec les différentes protéines des tissus, qui permettent la fixation et la préservation de l'architecture tissulaire, doivent être brisées. Ce processus, qui permet l'accès aux protéines (antigènes) qui seront reconnues par des anticorps spécifiques, est appelé récupération des antigènes (« *antigen retrieval* »). Pour ce faire, les tranches de tissus sont déparaffinées puis réhydratées, avant d'être placées dans une solution de citrate 0,01 M pH 6,0 (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, États-Unis) et chauffées à 100°C dans un autocuiseur, ce qui permet de dégager les épitopes des antigènes, et assure leurs liaisons par les anticorps spécifiques. Les

préparations sont ensuite incubées dans du peroxyde d'hydrogène (Ventana), afin d'inhiber toute activité endogène de la peroxydase, dans un appareil de coloration automatique (Ventana). Par la suite, les lames sont incubées avec un anticorps couplé à la biotine, spécifique à l'antigène que l'on veut détecter. La streptavidine, qui est couplée à de la peroxydase, est ensuite utilisée pour lier l'anticorps biotinylé (LSAB System HRP Kit; Dako, Globstrup, Danemark). L'anticorps est ensuite détecté par peroxydation du 3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB) (Dako), ce qui lui donne une coloration brunâtre [revu dans Ramos-Vara, 2005; Taylor et Shi, 2006].

A.4.5 L'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)

A.4.5.1 Principes généraux

Développée dans les années 1980, l'hybridation *in situ* a révolutionné la cytogénétique dans les années 1990. Grâce à elle, la cytogénétique est devenue moléculaire, c'est-à-dire que des anomalies affectant des gènes ont pu être détectées, alors que seules les anomalies affectant de grands segments chromosomiques pouvaient être détectées au caryotype (cytogénétique standard). À la base, l'hybridation exploite deux propriétés de l'ADN, soit la complémentarité des séquences retrouvées sur les deux brins de la double hélice, et la capacité de reformer les liaisons hydrogène unissant les deux brins d'ADN. Il est donc possible, dans certaines conditions spécifiques, que les brins de la double hélice s'apparient non pas entre eux, mais bien avec un autre brin complémentaire; ils forment alors ce qu'on appelle un hybride. Ce brin complémentaire, qui est constitué de nucléotides modifiés pouvant être détectés au microscope, est nommé sonde. Dans le cas de l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), la formation et la détection de l'hybride se font directement sur les cellules à l'aide d'une sonde émettant de la fluorescence [revu dans Muleris et coll., 1996]. Il y a plusieurs années, les sondes étaient marquées avec des nucléotides non fluorescents conjugués à la biotine ou la digoxigénine; il fallait donc détecter de façon indirecte la sonde, en utilisant des anticorps fluorescents reconnaissant la biotine ou la digoxigénine. De nos jours, la plupart des sondes sont directement marquées

avec des nucléotides couplés à un fluorochrome; la détection de la sonde se fait donc plus rapidement et de façon directe.

La FISH peut se faire sur des cellules à tous les stades du cycle cellulaire, peu importe que l'ADN soit condensé en chromosomes ou non. Lorsque l'ADN est condensé en chromosomes, on parle de FISH sur chromosomes ou sur métaphases; lorsque l'ADN est décondensé dans les noyaux, on parle de FISH sur noyaux interphasiques. La séquence des sondes étant le plus souvent connue, la FISH permet non seulement de vérifier si la séquence détectée par la sonde est présente dans le génome d'un individu, mais également à quel endroit sur les chromosomes. La FISH permet donc de détecter des anomalies de nombre ou de structure qui impliquent la séquence utilisée comme sonde. De plus, les nucléotides fluorescents disponibles en différentes couleurs dont sont constituées les sondes permettent d'utiliser plusieurs sondes à la fois. Selon la nature des sondes, c'est-à-dire la ou les séquences qu'elles reconnaissent, on peut vérifier si une séquence a été perdue, dupliquée ou déplacée lors d'un remaniement chromosomique, ou encore évaluer la proportion de cellules ayant perdu la séquence reconnue par la sonde. La taille des anomalies détectées, c'est-à-dire le niveau de résolution, dépendra de la taille de la sonde: plus la sonde est petite, plus on pourra voir des anomalies fines. La sonde doit cependant avoir une taille minimale afin de pouvoir émettre assez de fluorescence pour être visible. Le signal émis par les plus petites sondes, de moins d'une dizaine de kb, doit être amplifié à l'aide d'anticorps pour être détectable. Selon le but fixé, on utilise des sondes d'une centaine de kb car elles offrent un excellent rapport visibilité-résolution et ne nécessitent pas d'amplification de signal.

La technique de FISH peut être subdivisée en cinq grandes étapes: le prétraitement, la dénaturation, la renaturation, les lavages post-hybridation et la détection. La première étape vise à rendre l'ADN accessible. En effet, l'ADN contenu dans les cellules est ancré sur un échafaudage de diverses protéines et protégé par la membrane nucléaire. De plus, les deux brins de la double hélice étant la plupart du temps appariés, plusieurs conditions

doivent être réunies afin de permettre la formation de l'hybride. Tout d'abord, les préparations chromosomiques destinées à la FISH doivent être débarrassées le plus possible de tout matériel autre que l'ADN [revu dans Muleris et coll., 1996]. Pour ce faire, les lames sont soumises à deux digestions enzymatiques afin de digérer l'ARN et les protéines: avec de la RNaseA type III-A (125 µg/ml) (Invitrogen) pour une heure, puis avec de la pepsine (entre 5 et 50 µg/ml) (Sigma-Aldrich) pour 2 à 10 minutes si nécessaire. C'est le prétraitement. Un ajustement de la concentration des enzymes et des temps de digestion doit être fait pour chaque lame afin de ne pas endommager l'ADN des chromosomes ou des noyaux interphasiques [modifié de Muleris et coll., 1996]. Les lames sont ensuite rincées dans une solution saline tamponnée au phosphate [(0,2 M de phosphate monosodique (Sigma-Aldrich), 0,2 M de phosphate disodique (Fisher) et 0,15 M de chlorure de sodium (Fisher)], déshydratées dans des bains d'éthanol de concentration croissante (70% à 100%), puis séchées [modifié de Lemieux et coll., 1992].

Par ailleurs, les lames contenant des cellules provenant de tissu gonadique fixé doivent subir des traitements enzymatiques plus agressifs. En effet, le formaldéhyde utilisé pour fixer les tissus forme non seulement des doubles liaisons avec les protéines, tel que mentionné plus tôt, mais également avec l'ADN. Ainsi, non seulement les protéines doivent-elles être dégradées pour donner accès à l'ADN, mais les doubles liaisons de l'ADN lui-même doivent être brisées [revu dans Ramos-Vara, 2005]. Pour ce faire, les lames sont plongées dans une solution de sodium bisulfite 30% pendant 12 minutes, puis rincées dans une solution saline-citrate de sodium. Vient ensuite un bain de 20 minutes avec de la protéinase K (250 µg/ml) (Invitrogen) ou de la pepsine (2,5 mg/ml) (Sigma-Aldrich), selon l'état des tissus. Les lames sont ensuite rincées dans une solution saline-citrate de sodium, puis déshydratées dans des bains d'éthanol de concentration croissante (70% à 100%) et séchées [modifié de Kuchinka et coll., 1995].

Ainsi prétraitées, les lames sont prêtes pour la seconde étape de l'hybridation: la dénaturation. Les sondes sont alors déposées sur les lames qui sont ensuite chauffées à une température de 70-90°C pendant 2-3 minutes (10 minutes dans le cas du tissu gonadique fixé), afin de déstabiliser les liaisons hydrogène entre les deux brins de la double hélice d'ADN des sondes et des lames. Les préparations chromosomiques sont ensuite placées dans une étuve à 37°C pour 18 heures, période pendant laquelle les séquences complémentaires des cellules et de la sonde s'apparient et forment des hybrides: c'est la renaturation. Le lendemain, les lames sont prêtes pour les dernières étapes, c'est-à-dire les lavages post-hybridation et la détection des hybrides. Pour ce faire, les lames sont plongées quelques minutes dans une solution saline-citrate de sodium chauffée à 37-70°C, selon la nature de la sonde. La solution saline-citrate de sodium, ayant un pH et une concentration en sels similaires aux conditions normales des cellules, permet d'enlever l'excès de sonde sans affecter la stabilité des hybrides formés lors de la renaturation. Au besoin, les lames sont incubées 20 minutes à 37°C avec des anticorps (5 µg/ml), puis rincées dans une solution saline tamponnée au phosphate, pour détecter les sondes indirectement marquées (voir la page 100 pour plus de détails). Les lames sont ensuite colorées avec du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) (0,5-1 µg/ml) (Roche Diagnostics, Laval, Qc, Canada) en bleu ou avec de l'iodure de propidium (PI) (0,2 µg/ml) (Sigma-Aldrich) en rouge, pour permettre la visualisation de l'ADN chromosomique ou interphasique au microscope à fluorescence. Finalement, du p-phénylènediamine (PPD) (1 mg/ml) (Sigma-Aldrich), un antioxydant, est ajouté afin de préserver la fluorescence des sondes [modifié de Muleris et coll., 1996].

Voyons maintenant les spécificités des principales sondes qui sont utilisées dans le cadre de ce travail.

A.4.5.2 Sondes utilisées

Il existe différentes sortes de sondes, qui reconnaissent différents types de séquences ou de régions chromosomiques: les séquences centromériques ou télomériques, les séquences uniques codantes (gènes), l'hétérochromatine, un bras chromosomique ou

encore un chromosome entier. Certaines de ces sondes sont commercialisées par des compagnies et sont prêtes à l'emploi; elles ne nécessitent aucune préparation. À l'opposé, il y a aussi des sondes dont l'utilisation n'a été validée qu'en recherche seulement. Ces sondes doivent subir différentes manipulations avant d'être détectables au microscope en fluorescence et de pouvoir être utilisées.

A.4.5.2.1 Sondes commerciales

Étant distribuées par des compagnies, les sondes commerciales reconnaissent des séquences ou des régions chromosomiques les plus couramment hybridées en cytogénétique. Dans le cas des gonosomes (Figure 11, page 98), il s'agit des pan-télomères, des subtélomères du bras court et du bras long du X et du Y, de la région contenant le gène *SRY* en Yp11.31, du centromère du X et du Y, de l'hétérochromatine du bras long du Y (Yq12) et de la peinture des chromosomes X et Y. La sonde Quint Y reconnaissant le gène *AMELY* en Yp11.2 a aussi été brièvement utilisée, jusqu'à ce que les compagnies cessent sa distribution.

A.4.5.2.2 Chromosomes artificiels de bactéries (BACs)

De grandes portions des chromosomes humains ne sont donc pas reconnues par des sondes commerciales, restreignant du même coup la caractérisation des anomalies affectant ces régions. C'est pourquoi des chercheurs ont entrepris d'isoler eux-mêmes des séquences de tous les chromosomes humains afin de créer une banque de sondes plus précises. Parmi ces banques de sondes, les chromosomes artificiels de bactéries (BACs) sont les plus utilisés. Les BACs sont des vecteurs bactériens circulaires contenant des fragments spécifiques du génome humain, que l'on nomme inserts, de quelques centaines de kb [Shizuya et coll., 1992]. Les BACs sont constitués de différentes séquences d'origine bactérienne permettant leur répllication dans les bactéries, ainsi que d'un gène de résistance à un antibiotique afin de permettre la sélection positive des bactéries ayant incorporé le BAC par transfection. Les bactéries, en répliquant leur ADN en vue de leur division

cellulaire, vont également répliquer les BACs, et donc les inserts qu'ils contiennent, et ainsi en générer une très grande quantité.

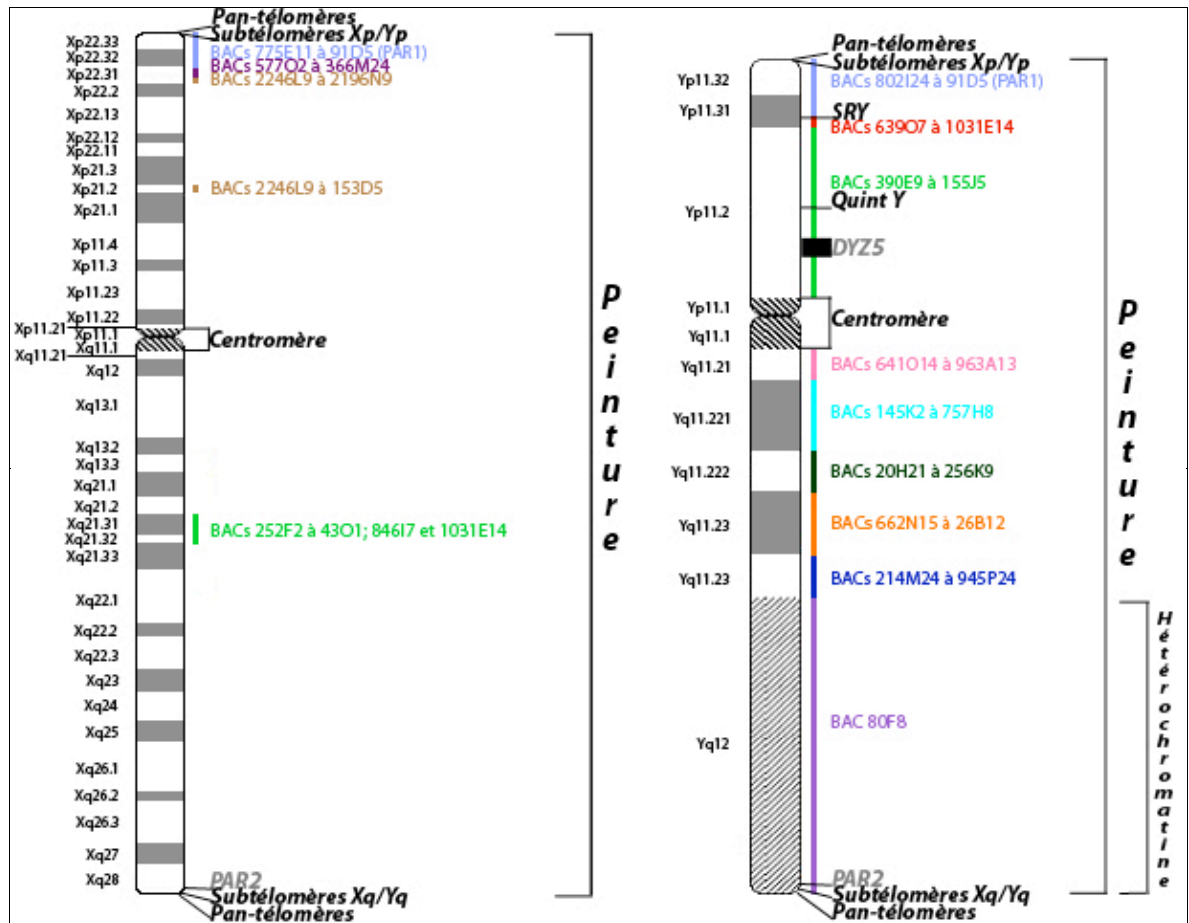


Figure 11: Idiogramme des chromosomes X et Y illustrant la position de l'ensemble des sondes utilisées. Les sondes commerciales sont indiquées en noir et les vecteurs viraux sont en gris. Les BACs sont regroupés par régions de couleurs différentes; les BACs hybridant à plus d'un endroit par homologie de séquence sont représentés par la même couleur dans les deux régions d'homologie. Les chromosomes ne sont pas à l'échelle.

Des bactéries transfectées avec des BACs contenant des inserts spécifiques à l'ensemble des séquences euchromatiques du chromosome Y, ainsi qu'à certaines séquences choisies du chromosome X (Figure 11, ci-dessus), sont obtenues de la banque

RPCI-11 établie par Pieter de Jong au Roswell Park Cancer Institute de Buffalo, dans l'état de New York [Osoegawa et coll., 2001]. Les bactéries sont alors mises en culture afin d'en obtenir une quantité suffisante. Au terme de la culture, les bactéries sont lysées grâce à l'action de différentes solutions qui dissolvent les membranes et dénaturent une grande partie des protéines. Les liaisons hydrogène entre les deux brins de l'ADN bactérien et des BACs, tous deux circulaires, sont également brisées par l'action des différentes solutions utilisées lors de la lyse bactérienne. Une petite quantité d'ADN circulaire peut également être coupée en fragments linéaires [revu dans Maloy, 1990]. Toutefois, tel qu'expliqué plus tôt, les liens hydrogène entre les deux brins d'ADN peuvent se reformer, et l'ADN (qu'il soit circulaire ou linéaire) peut ainsi se renaturer. Or, l'ADN circulaire bactérien étant beaucoup plus long que celui des BACs ou des fragments linéaires, il se renature plus lentement. Les protéines et l'ADN dénaturés migrant plus vite que l'ADN renaturé à cause des altérations dans leur conformation, l'ADN des BACs reste dans le surnageant alors que les autres composantes forment un culot après centrifugation. L'ADN des BACs, les fragments linéaires et l'ARN restés en solution sont ensuite récupérés et précipités à l'alcool, puis resuspendus dans une solution contenant de la RNase afin de dégrader l'ARN. Le tout est déposé sur un gradient de chlorure de césium et soumis à une force centrifuge très forte d'environ 50 000 tours par minute. L'ADN circulaire des BACs étant plus dense que l'ADN linéaire, il migre plus loin dans le gradient; quant à l'ARN, étant plus dense que l'ADN circulaire, il migre jusqu'en bas du gradient. Seul l'ADN circulaire des BACs est récupéré. L'ADN est ensuite précipité dans l'alcool et resuspendu dans une solution permettant sa conservation [revu dans Maloy, 1990].

L'ADN ainsi obtenu est ensuite marqué afin de pouvoir le détecter au microscope à fluorescence lors de la FISH. Pour ce faire, la technique de marquage par déplacement de coupure est utilisée. Cette technique est basée sur l'action de deux enzymes bien distinctes: la DNase et l'ADN polymérase. Dans un premier temps, la DNase cause des bris soit dans un des brins de l'ADN (bris simple brin), soit dans les deux (bris double-brin). Dans un second temps, l'ADN polymérase répare les bris simple brin à l'aide de nucléotides ajoutés dans le milieu, en se servant du brin complémentaire comme matrice. Or, certains de ces

nucléotides ont préalablement été modifiés pour émettre directement de la fluorescence orange (dUTP-Spectrum Orange™) (Vysis, Downers Grove, IL, États-Unis) ou verte (dUTP-Spectrum Green™) (Vysis). Ils peuvent également avoir été couplés à de la biotine (biotine-14-dATP) (Invitrogen) ou de la digoxigénine (digoxigénine-11-dUTP) (Roche) afin d'être reconnus par des anticorps émettant de la fluorescence verte [streptavidine (anti-biotine) conjuguée à de l'isothiocyanate de fluorescéine (GibcoBRL)] ou rouge [anti-digoxigénine-rhodamine (Enzo Diagnostics Inc., Farmingdale, NY, États-Unis)]. En contrôlant soigneusement la quantité de chaque enzyme dans le mélange, nous avons pu remplacer une partie des nucléotides de l'ADN par des nucléotides fluorescents et morceler l'ADN circulaire en une série de fragments linéaires marqués pour en faire des sondes [modifié de Muleris et coll., 1996]. Les sondes (BACs) ainsi marquées contiennent les inserts spécifiques aux chromosomes X et Y humains, mais également de l'ADN d'origine bactérienne permettant la répllication des BACs. Toutefois, ce dernier ne trouvant pas de séquences complémentaires sur les préparations cytogénétiques lors de la FISH, il est éliminé par les lavages après la technique d'hybridation et donc n'interfère pas avec la détection des inserts. La localisation de chaque insert est ensuite vérifiée par FISH, comme nous l'expliquerons dans quelques instants.

A.4.5.2.3 Autres sondes

Trois autres sondes, gracieuseté des chercheurs Christopher Tyler-Smith, Werner Schempp et Rainer Wimmer, ont également été utilisées. Ces sondes sont constituées de fragments d'ADN provenant du chromosome Y qui ont été insérés dans un vecteur viral et qui ont par la suite « infecté » des bactéries. Toutefois, ces sondes ayant déjà été purifiées, caractérisées et localisées par les Drs Tyler-Smith, Schempp et Wimmer, nous n'avons eu qu'à les marquer par déplacement de coupures. Elles reconnaissent la séquence DYZ5, en Yp11.2 [Tyler-Smith et coll, 1988], ainsi que deux parties de la région PAR2 des chromosomes X et Y [Kühl et coll., 2001] (Figure 11, page 98).

A.4.5.3 Localisation des sondes

Afin de vérifier la localisation de chaque BAC, nous les avons hybridés chez des sujets sains 46,XY et 46,XX ayant accepté de participer au projet; cela a nécessité la visualisation simultanée des sondes et des bandes chromosomiques au microscope à fluorescence (Figure 12, page 102). Pour ce faire, nous avons effectué un marquage dynamique en bandes R avec du PPD dont le pH a été ajusté à 11.0 avec de l'hydroxyde de sodium 1 M (Fisher) [Lemieux et coll., 1992]. Les étapes pour réaliser ce marquage commencent après la levée de la synchronisation, avec l'ajout de BrdU (30 µg/ml) (Sigma-Aldrich) lorsque les cellules sont en culture. En résumé, les cellules soumises à la synchronisation cellulaire font un arrêt dans leur phase de synthèse. Cet arrêt peut être situé à la transition G1/S, c'est-à-dire avant le début de la synthèse d'ADN, ou à la transition R/G, qui marque la transition entre la réplication des bandes R et des bandes G et C [Fetni et coll., 1996], pour les cellules qui ont déjà commencé leur synthèse d'ADN [Lavoie et Drouin, 2001]. En ajoutant du BrdU, un analogue de la thymidine, après la levée de la synchronisation, le BrdU est incorporé uniquement dans les régions d'ADN qui effectuent leur réplication à ce moment. Or, le BrdU est photosensible à certaines longueurs d'ondes lorsque mis en présence de certains agents [Drouin et coll., 1989]. Après la récolte des chromosomes et l'étalement des cellules, seules les cellules qui se sont arrêtées à la transition R/G ont complété leur phase de synthèse et ont donc condensé leur ADN sous forme de chromosomes, tel que vu précédemment (section A.4.2.1, page 86). Sous l'effet combiné des rayons de la lampe à fluorescence du microscope et du PPD à pH 11.0, il y a lyse des régions chromosomiques qui ont incorporé du BrdU lors de la synthèse, c'est-à-dire les bandes G et C; ces régions ne prennent donc pas la coloration [Fetni, 1996; Popescu et coll., 2000]. Seules les régions chromosomiques n'ayant pas incorporé le BrdU, c'est-à-dire les bandes R, seront intensément fluorescentes après coloration (Figure 12). Un marquage similaire, pour le microscope photonique, peut également être produit par l'exposition des métaphases à des rayons ultraviolets après un traitement au Hoechst 33258 (2,5 µg/ml) (Sigma-Aldrich), suivi d'une coloration au Giemsa 1%: c'est le marquage RBG (marquage en bandes R après incorporation de BrdU et coloration au Giemsa) [Drouin et coll., 1989].

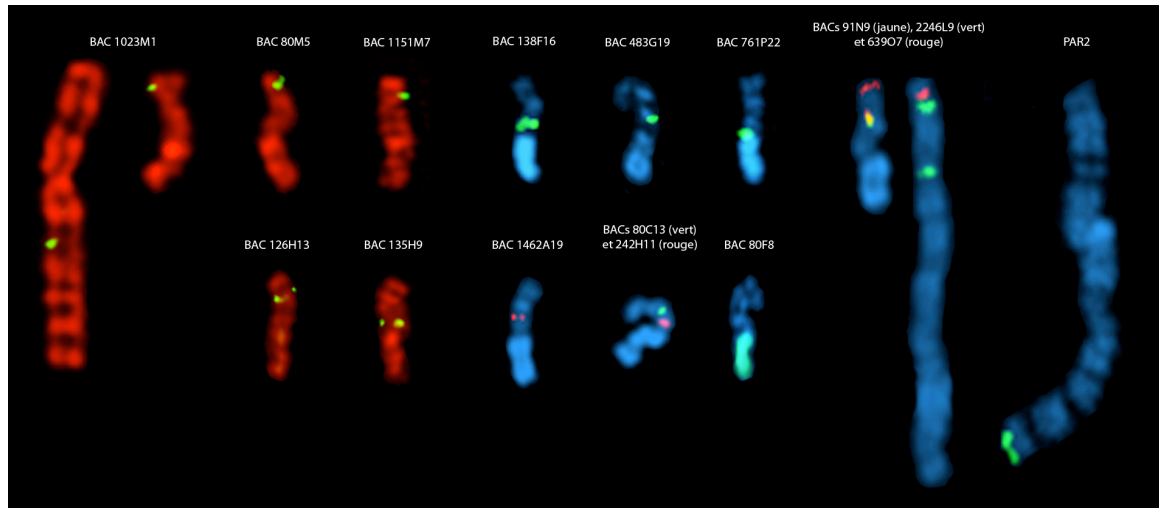


Figure 12: Exemples de localisation de sondes sur les chromosomes X et Y marqués en bandes R. À gauche, les chromosomes sont colorés au PI (rouge) et les sondes, marquées à la biotine, sont détectées par des anticorps conjugués à la fluorescéine (vert). À droite, les chromosomes sont colorés au DAPI (bleu), alors que les sondes sont directement marquées avec un fluorochrome rouge, vert, ou une combinaison des deux (signal jaune).

Une fois leur position validée, les BACs sont utilisés chez des patients pour déterminer la position exacte des points de cassure dans des remaniements impliquant les chromosomes X et Y. À cette occasion, un marquage en bandes G est réalisé, ne nécessitant que l'application de DAPI et de PPD à pH 9.0 sur les lames pour la visualisation. Le DAPI se liant de préférence aux régions riches en AT du sillon mineur de l'ADN et les bandes G étant plus riches en AT, un marquage G très similaire au marquage GTG est obtenu [revu dans Miller et Therman, 2001].

A.4.6 Les micropuces

La technologie des micropuces à ADN est elle aussi basée sur les propriétés de dénaturation-renaturation et de complémentarité des brins d'ADN. Les principes généraux sont donc les mêmes que pour la FISH; nous n'y reviendrons donc pas. Toutefois, il existe

plusieurs différences entre les deux. Premièrement, dans le cas des micropuces, l'hybridation ne se fait pas sur des lames de microscope; elle se fait plutôt sur une matrice (micropuce) contenant des milliers de minuscules puits contenant chacun une sonde spécifique. Il n'est donc pas nécessaire d'obtenir des cellules en division; l'ADN est simplement extrait, puis mis en contact avec la matrice. Deuxièmement, la résolution des micropuces est supérieure à celle de la FISH, lorsque les sondes sont de petite taille (20-100 pb) et que leur espacement est faible, puisque l'évaluation de la fluorescence émise par les hybrides sonde-ADN se fait par ordinateur. Des signaux beaucoup plus petits peuvent ainsi être détectés. On peut ainsi détecter des pertes ou des gains aussi petits que 5 à 50 kb selon les sondes utilisées et leur espacement. De plus, une quantification peut être faite, de sorte que l'on peut évaluer de façon précise le nombre de copies en plus ou en moins [revu dans Holcomb et Trask, 2007; Zahir et Friedman, 2007]. Par ailleurs, il est possible de différencier les allèles homozygotes et hétérozygotes en utilisant des sondes pouvant détecter les « *single nucleotide polymorphisms (SNP)* », ce qui est impossible en FISH étant donné que des sondes de plus grande taille sont utilisées. En effet, les SNP sont basés sur des différences de quelques nucléotides seulement; avec les sondes de très petites tailles (20 pb), ces différences permettront une hybridation spécifique avec des séquences complémentaires. Cependant, lorsque la sonde est plus grande, ces quelques nucléotides de différence n'auront aucune incidence sur l'hybridation de la sonde; il n'y aura donc pas de discrimination entre les deux allèles puisque les deux sondes pourront se lier à la même séquence. Troisièmement, il est possible de détecter l'ensemble des sondes en une seule expérimentation puisque chaque hybride sonde-ADN se trouve dans un puits séparé [revu dans Holcomb et Trask, 2007; Zahir et Friedman, 2007]. En FISH, le nombre de sondes pouvant être différenciées sur chaque cellule est limité par les différentes couleurs de fluorochromes discernables à l'œil.

Toutefois, les micropuces ne peuvent détecter que les changements dans le nombre de copies; elles ne mettent pas en évidence le déplacement des séquences, la polyploïdie, l'hétérogénéité clonale ou les anomalies présentes dans moins de 20% des cellules [revu dans Speicher et Carter, 2005; Ballif et coll., 2006; Scott et coll., 2010]. Il est donc impossible de détecter les réarrangements chromosomiques structuraux qui n'entraînent pas

de perte ou de gain de matériel, tels que les inversions paracentriques ou péricentriques et les translocations équilibrées. Par ailleurs, cette technologie requiert aussi l'utilisation de sondes n'hybridant pas à plusieurs endroits, que ce soit sur le même chromosome ou sur un autre chromosome, suite à une homologie de séquence, au risque de détecter de faux gains ou de masquer de véritables pertes. La localisation cytogénétique des BACs utilisés sur certaines micropuces doit donc toujours être vérifiée par FISH afin d'éliminer toute hybridation croisée [Fiegler et coll., 2003]. Par ailleurs, étant donné la présence de régions connues d'homologie entre les chromosomes sexuels, ceux-ci ne sont pas toujours aussi bien couverts par les sondes que les autres régions chromosomiques, ce qui complique l'utilisation des micropuces dans certains cas de remaniements des chromosomes X et Y [Yatsenko et coll., 2009].

A.5 Les hypothèses, les objectifs et l'organisation du travail

A.5.1 Les hypothèses de travail

Tel que nous l'avons mentionné dans cette introduction générale, le chromosome Y présente de nombreuses caractéristiques pouvant avoir des répercussions importantes sur la genèse des remaniements chromosomiques le concernant ainsi que sur le développement sexuel. Ainsi, les nombreuses séquences répétées d'orientation directe ou inversée (notamment les palindromes) de même que les séquences d'homologie avec le chromosome X semblent non seulement avoir joué un rôle dans son évolution, mais également dans sa susceptibilité à former des remaniements particuliers, notamment des chromosomes Y isodicentriques [$idic(Y)$] et des translocations X;Y [$t(X;Y)$]. Ces remaniements peuvent avoir des conséquences importantes sur le développement sexuel des patients, que ce soit par la perte du gène *SRY* ou par la perte en mosaïque du chromosome Y. Par exemple, la propension des $idic(Y)$ à ne pas migrer avant la fin de l'anaphase et d'être perdus dans un micronoyau, peut ainsi générer une lignée 45,X plus ou moins importante. Par ailleurs, avec l'âge chez les individus sains 46,XY, le centromère du chromosome Y pourrait être moins

efficace dans sa liaison au fuseau mitotique à cause de l'absence de certaines composantes du kinétochore, entraînant sa perte graduelle dans une faible proportion de cellules.

De plus, les patients avec une dysgénésie gonadique et un chromosome Y, qu'il soit remanié ou non, sont à risque de développer des gonadoblastomes ou des dysgerminomes. Or, 15 à 30% des patients, selon le type de dysgénésie gonadique, vont effectivement développer des gonadoblastomes, qui vont progresser vers des dysgerminomes dans la moitié des cas. Il existe donc d'autres facteurs de risque encore inconnus liés à la pathogenèse des tumeurs gonadiques chez ces patients, et la mise en évidence récente du tissu gonadique indifférencié fait partie des pistes intéressantes à explorer.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons donc émis les hypothèses suivantes:

- il existe des régions de susceptibilité aux réarrangements sur le chromosome Y qui expliquent la fréquence des remaniements tels que les $idic(Y)$ et les $t(X;Y)$;
- un mosaïcisme gonadique du Y, par l'instabilité mitotique d'un chromosome Y remanié ou normal, explique le phénotype sexuel des patients avec une dysgénésie gonadique;
- la présence de cellules germinales résiduelles, sous forme de tissu gonadique indifférencié, est un facteur de risque pour la tumorigenèse du gonadoblastome et du dysgerminome chez les patients avec une dysgénésie gonadique.

A.5.2 Les objectifs et l'organisation du travail

Afin de vérifier nos hypothèses, nous avons étayé notre travail de recherche sur quatre objectifs principaux:

- développer de nouveaux outils cytogénétiques par la préparation de sondes BACs contenant des inserts de l'ensemble de l'euchromatine du chromosome Y et localiser ces nouvelles sondes par la FISH afin d'améliorer la caractérisation cytogénétique des remaniements du chromosome Y;

- étudier de façon détaillée les points de cassure chez des patients ayant une anomalie de structure impliquant le chromosome Y afin de vérifier si certaines régions du chromosome Y sont plus à risque d'être réarrangées;
- optimiser la technique de FISH sur tissu gonadique frais et fixé afin de permettre l'évaluation du mosaïcisme tissulaire chez des patients avec un chromosome Y, normal ou remanié, avec une dysgénésie gonadique;
- améliorer la corrélation entre le génotype, le phénotype et l'histologie des gonades chez des patients avec une anomalie du développement sexuel grâce à l'étude en immunohistochimie et par FISH de leur tissu gonadique pour mieux comprendre leur risque de développer des gonadoblastomes et des dysgerminomes.

En gardant en mémoire les différents objectifs présentés plus haut, notre travail de recherche a été divisé en 3 chapitres, dans lesquels sont répartis les 8 articles qui composent cette thèse. Dans le premier chapitre, qui comporte les articles 1 à 3, nous présentons le fruit de la caractérisation des points de cassure chez 10 patients porteurs d'un $idic(Y)$ et 4 patients avec une translocation $X;Y$. Pour ce faire, nous avons sélectionné, parmi les BACs localisés précédemment, ceux qui étaient pertinents pour l'analyse cytogénétique des régions remaniées chez ces individus. Nous avons déterminé de façon précise les régions remaniées chez nos patients et mis en évidence l'existence de régions de susceptibilité pour ces remaniements [articles 2 et 3, pages 126 et 153 respectivement]. En identifiant les points de cassure des patients avec $idic(Y)$ de notre cohorte, nous avons également mis en évidence l'effet de la distance intercentromérique des $idic(Y)$ sur l'instabilité mitotique de ces chromosomes remaniés et sa répercussion sur le mosaïcisme tissulaire [article 2, page 126]. Ce mosaïcisme tissulaire, comme nous l'avons démontré dans les articles 1 et 2 (pages 112 et 126 respectivement), joue un rôle important sur le phénotype sexuel des patients, ce qui serait relié à l'importance de la mosaïque des gonosomes dans les gonades.

Dans le second chapitre, qui comporte les articles 4 et 5, nous nous sommes attardés à comprendre l'étiologie des tumeurs gonadiques et à identifier des facteurs de prédisposition chez 30 patients avec une anomalie du développement sexuel. Nos études par immunohistochimie et micropuces du tissu gonadique de deux sœurs XY avec une

dysgénésie gonadique ont montré que certaines tumeurs très rares comme le choriocarcinome pouvaient survenir dans les gonades de ces patients, et que ces tumeurs pourraient avoir une étiologie commune avec les tumeurs le plus souvent retrouvées chez ces patients, à savoir les gonadoblastomes et les dysgerminomes [article 4, page 170]. Par ailleurs, l'analyse en FISH du tissu gonadique de 10 patients avec un chromosome Y remanié et un phénotype sexuel anormal a montré que la dysgénésie gonadique de ces patients est due à un mosaïcisme gonadique impliquant la perte du chromosome Y remanié dans une majorité de cellules [article 5, page 184]. Au contraire, chez 10 patients avec une dysgénésie gonadique et un chromosome Y normal, le mosaïcisme dans les gonades n'est pas assez important pour être la cause du développement sexuel anormal chez la majorité d'entre eux. De plus, nos travaux sur l'histologie et l'immunohistochimie du tissu gonadique chez l'ensemble de ces patients avec une dysgénésie gonadique et un chromosome Y, qu'il soit normal ou remanié, nous ont permis de confirmer que le tissu gonadique indifférencié est un facteur de risque pour la tumorigenèse gonadique [article 5, page 184].

Finalement, nous avons étudié trois patients présentant un développement sexuel anormal et des altérations génétiques rares afin de mieux comprendre les implications de ces anomalies sur leur développement. Nous les présentons dans le troisième chapitre, qui comporte les articles 6 à 8. Tout d'abord, nous rapportons le cas d'un fœtus XY avec un désordre de la différenciation génitale (pseudohermaphrodisme) et une trisomie 22 [article 6, page 220] et discutons des mécanismes possiblement impliqués dans cette anomalie du développement sexuel, c'est-à-dire un faible mosaïcisme (22 à 50%) suite à la perte du chromosome Y dans certaines cellules de son utérus, et l'effet de la duplication du gène *SOX10*, un homologue de *SOX9*, en 22q13.1 et dont le rôle dans le développement sexuel émerge. Dans un deuxième temps, nous présentons le second cas connu de désordre ovotesticulaire (hermaphrodisme vrai) chez un patient XY, un fœtus, avec une mutation du gène *SOX9* [article 7, page 234]. Afin d'expliquer la variabilité phénotypique de ce fœtus comparativement aux autres patients avec une mutation *SOX9*, nous avons recherché un mosaïcisme gonadique dans ses gonades. Toutefois, tel que nous le discutons dans l'article, la faible mosaïque 45,X retrouvée n'est probablement pas la cause du désordre du

développement sexuel de ce fœtus. Cette anomalie serait possiblement expliquée par une pénétrance variable des mutations de *SOX9*, ou encore par des polymorphismes de l'un des autres gènes impliqués dans le développement sexuel [article 7, page 234]. Finalement, nous rapportons le cas d'une fillette avec un chromosome Y anormal dérivé d'une translocation X;Y [article 8, page 243] et une dysgénésie gonadique. L'analyse par micropuces et FISH, à l'aide de BACs couvrant les régions du X et du Y impliquées dans la translocation, a permis de démontrer que les points de cassure chez notre patiente ne sont pas dans une région d'homologie entre les gonosomes. De plus, nous faisons un parallèle avec les autres cas de disomie Xp fonctionnelle suite à une translocation X;Y dans le but d'expliquer le phénotype sexuel et général de ces patients.

Dans la discussion générale, nous intégrons l'ensemble de ces résultats pour expliquer les mécanismes moléculaires sous-jacents aux remaniements structuraux les plus fréquents du chromosome Y et les facteurs pouvant influencer l'instabilité des chromosomes Y, remaniés ou normaux, dans différents tissus. Nous faisons également une synthèse des altérations génomiques et chromosomiques pouvant expliquer les anomalies du développement sexuel et exposons les conséquences de ces altérations sur la variabilité phénotypique et les cas familiaux. Pour terminer, nous discutons de la pathogenèse des tumeurs gonadiques et des implications du tissu gonadique indifférencié dans les gonades dysgénésiques. Une conclusion soulignant l'apport de cette thèse et présentant les perspectives d'avenir clôt ce travail de recherche.

Chapitre 1

Régions de susceptibilité et mosaïcisme dans les remaniements du chromosome Y

Dans ce chapitre, nous nous sommes attardés à identifier les points de cassure de différents chromosomes Y anormaux afin de déterminer s'il existait des régions plus susceptibles que d'autres aux remaniements. Nous avons également évalué le niveau de mosaïcisme tissulaire de ces Y remaniés afin d'étudier l'impact de ces anomalies chromosomiques sur le phénotype des individus.

Dans le premier article, intitulé « *Phenotypic variability in isodicentric Y patients: Study of nine cases* », nous avons déterminé que la proportion de cellules 45,X dans les divers tissus, notamment gonadiques, semble jouer un rôle primordial dans le phénotype sexuel des patients avec un idic(Y) suite à l'instabilité de ce dernier dans les divisions cellulaires.

Dans le deuxième article, « *Correlation between intercentromeric distance, mosaicism and sexual phenotype: Molecular localization of breakpoints in isodicentric Y chromosomes* », nous avons pu établir une corrélation entre la distance séparant les deux centromères des idic(Y) et leur instabilité lors des divisions cellulaires: plus la distance est grande, plus l'idic(Y) peut être perdu ou cassé. Ce mosaïcisme tissulaire, lorsqu'il touche les gonades, joue un rôle important dans le phénotype sexuel des patients avec un idic(Y). Nous avons également montré que certaines séquences présentes sur le chromosome Y pourraient conférer une susceptibilité à la formation de ces remaniements.

Finalement, dans le troisième article de ce chapitre, « *Identification of new susceptibility regions for X;Y translocations in patients with testicular disorder of sex development* », nous avons démontré qu'il existerait des régions plus susceptibles aux cassures sur les chromosomes sexuels, mais qu'une recombinaison anormale entre le X et le Y n'est pas en cause. Nous discutons également de l'impact de la quantité de matériel provenant du chromosome Y qui est transféré sur le chromosome X sur le phénotype des patients.

En ce qui a trait à la contribution de chaque co-auteur pour les articles de ce chapitre, elle se décline comme suit:

- Mélanie Beaulieu Bergeron, analyses cytogénétiques et rédaction des manuscrits (50% de l'article 1, 100% des articles 2 et 3);
- Martin DesGroseilliers, rédaction d'un manuscrit (50% de l'article 1);
- Pierre Brochu, M.D., analyse histologique des gonades (articles 1 et 2);
- Emmanuelle Lemyre, M.D., révision de l'histoire clinique des patients et supervision de la rédaction des manuscrits (articles 1, 2 et 3);
- Nicole Lemieux, Ph.D., supervision des techniques et de la rédaction des manuscrits (articles 1, 2 et 3).

Article 1 - *Clinical Genetics* 2006; 70: 145-150.

Phenotypic variability in isodicentric Y patients: Study of nine cases.

Martin DesGroseilliers^{a,b,c,*}, Mélanie Beaulieu Bergeron^{a,b,c,*}, Pierre Brochu^{a,b}, Emmanuelle Lemyre^{c,d,e}, and Nicole Lemieux^{a,b,c}

^aDépartement de pathologie et biologie cellulaire, Faculté de médecine, Université de Montréal, ^bDépartement de pathologie et ^cCentre de recherche, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, ^dDépartement de pédiatrie, Faculté de médecine, Université de Montréal, et ^eService de génétique médicale, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada

* These authors have contributed equally to this work.

Corresponding author: Nicole Lemieux, Ph.D.
Département de pathologie et biologie cellulaire
Université de Montréal

Received March 30 2006, revised and accepted for publication May 24 2006.

© 2006 by John Wiley and Sons. DesGroseilliers *et al.* Clin Genet 2006; 70: 145-150.

Abstract

Isodicentric chromosomes are the most commonly reported aberrations of the human Y chromosome. As they are unstable during cell division and can generate various types of cell lines, most reported patients are chromosomal mosaics, generally including a 45,X cell line. Phenotypes depend on the location of the breakpoints as well as on the proportion of each cell line, and vary from male to abnormal female or individual with ambiguous genitalia. Although phenotypic variability is known to also depend on the degree of mosaicism in the various tissues, gonads are rarely studied. We report nine cases of isodicentric Y chromosomes studied by conventional and molecular cytogenetics: three males, five females, and one individual with sexual ambiguity. Two males had a non mosaic karyotype, while the third male was a mosaic with a predominant 46,XY cell line. Three of the females had a major 45,X cell line, while the last two females and the patient with ambiguous genitalia had a major 46,X,idic(Y) cell line. Analyses of gonadal tissues from the individual with sexual ambiguity and of three of the five female patients gave results concordant with their phenotype, allowing us to better understand the sexual differentiation of these patients.

Key words: sex chromosomes - isodicentric Y - mosaicism - sexual differentiation - Turner syndrome - sexual ambiguity - FISH

Isodicentric chromosomes are the most commonly reported Y chromosome aberrations (1). They are usually unstable during cell division and remain so until one of their centromeres is inactivated (2,3). Various types of cell lines can originate from such instability (4), and consequently, most reported patients have alternate cell lines, including 45,X (95% of cases) (5). The resulting phenotype depends on the proportion of each cell line and on the localization of the breakpoints (6,7). The clinical features are therefore very variable: 75-80% of patients have short stature and 65-75% have an abnormal or ambiguous sexual development (1,8), although a bias may exist in post-natally diagnosed cases as these manifestations are more likely to draw clinical attention (1). The most likely mechanism of formation of the isodicentric chromosome is by an isochromatid break, followed by a U-type exchange (5). Breakpoints in the short arm will lead to a duplication of the entire long arm and a part of the short arm, while breakpoints in the long arm lead to the duplication of the entire short arm and part of the long arm.

In this paper, we report nine new cases of isodicentric Y chromosomes: eight cases with breakpoints in the long arm, and one case with a breakpoint in the short arm. Patients were investigated by chromosome analysis and characterized by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). When possible, other tissues were also studied in order to verify if hidden mosaicism could explain the sexual differentiation of the patients.

Materials and methods

Case reports

We describe here nine cases of idic(Y), among which there were three males, five females and one individual with an ambiguous sexual development. Clinical findings are summarized in Table 1. The five females and the patient with ambiguous genitalia underwent resection of their gonads. The histological findings are described in Table 2. As described by Robboy et al. (9), the final diagnosis for the five phenotypic females was pure gonadal dysgenesis, while patient D6 (female with ambiguous genitalia) was considered to have mixed gonadal dysgenesis.

Table 1. Clinical findings of the nine idic(Y) patients

Case	Age at diagnosis (years)	Physical exam	Genitalia (as visually described)
D1 ♂	4 years old	Dysmorphic features, high growth parameters, global developmental delay, dyspraxia	Normal
D2 ♂	2 years old	Mild language delay	Normal
D3 ♂	5 years old	Dysmorphic features, global psychomotor delay, learning difficulties	Normal
D4 ♀	17 years old	Short stature (152 cm), growth delay, small breasts, primary amenorrhea	Small uterus
D5 ♀	16 years old	Short stature (150 cm), Turner stigmata, primary amenorrhea, hyperandrogenism	Underdeveloped vulva and uterus, clitoromegaly
D6 ♀	5 years old	Increased inter nipple distance, short stature (94 cm), sexual ambiguity, language delay	Urogenital bud with parts of the corpus cavernosum and glans of the penis (confirmed histologically), hypospadias, chordae, gonad in the right inguinal region, small vagina and uterus.
D7 ♀	16 years old	Small breasts, primary amenorrhea, hirsutism	Normal vagina and uterus
D8 ♀	4 years old	Dysmorphic features, mild language delay	Small uterus
D9 ♀	17 years old	Short stature (149,86 cm), small breasts, primary amenorrhea	Small uterus and short vagina

Chromosomes and nuclei preparations

Analyses on peripheral blood lymphocytes were performed as described by Lemieux et al. (10,11). Amniotic fluid, cord blood, fresh gonadal tissues and fibroblasts from skin biopsies were prepared according to standard protocols (12,13). 15µm thick sections of buffered formalin-fixed and paraffin-embedded gonadal tissues were dewaxed, and digested by collagenase (Sigma-Aldrich, Oakville, On, Canada) and trypsin (Invitrogen, Burlington, On, Canada) as described by Kuchinka et al. (14) to isolate nuclei. This suspension of nuclei was then dropped on slides and baked, followed by pre-treatment

of the obtained slides in 30% sodium bisulfite and proteinase K (Invitrogen). Karyotypes were established according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) 2005 (15).

DNA probes and fluorescence in situ hybridization (FISH)

FISH was performed as suggested by the manufacturers with probes specific for the following regions: Yq12 heterochromatin [DYZ1 (Oncor, Gaithersburg MD)], Y centromere [DYZ3 (Oncor)], chromosome Y paint (Oncor) or WCP Y (Vysis, Downers Grove, IL), X centromere [DXZ1 (Oncor)], sex region of the Y (Yp11.31) and X centromere [LSI SRY/CEP X (Vysis)], and centromeric regions of chromosomes 18, X and Y [AneuVysion probe mixture #1 (Vysis)]. FISH with probe 91H4.5 (Yp11.2) (16) was done as described by Lemieux et al. (10).

Results

The final karyotypes for all cases are summarized in Table 2.

Male patients D1 and D2 were both found to have a non mosaic *idic(Y)* with breakpoints in Yq11.21 after standard GTG- or RBG-banding (Figs 1a, c), while the third male (D3) had a predominant 46,XY cell line along with the 47,XY,*idic(Y)(q11.21)* cell line (Fig. 1e). FISH with the chromosome Y paint (Fig. 1f) confirmed the origin of both Y chromosomes in patient D3, while probes DYZ3 (D1-D3) (Fig. 1b, d, g), SRY (D1, D3) or 91H4.5 (D2) confirmed the results. Absence of heterochromatin was confirmed by DYZ1 in all three males.

Standard GTG-banding on blood lymphocytes showed that three females had a predominant 45,X cell line along with the *idic(Y)* (D4, D5, and D7) (Fig. 1h, j, p), with breakpoints in Yq11.2. Patient D7 also had a minor *del(Yq)* cell line. Similar analyses in patient D6 revealed the presence of three cell lines in blood [46,X,*idic(Y)(q11.2)* (Fig. 1l), 45,X, and 46,X,*del(Y)(q11.2)* (Fig. 1m)], two cell lines in fibroblasts and in one gonad

[45,X and 46,X,idic(Y)(q11.2)], and a non-mosaic 45,X constitution in the other gonad. FISH analyses with DYZ3 (D4, D5 and D6) (Fig. 1i, k, n) and SRY (D5, D6 and D7) (Fig. 1q) revealed two signals on the idic(Y). As for the del(Yq) found in patients D6 and D7, results were confirmed by SRY (D6) (Fig. 1o) and the chromosome Y paint (D7) (Fig. 1r). Absence of Yq12 heterochromatin was shown by DYZ1 in both idic(Y) (D5 and D6) and the del(Yq) (D6).

Analysis of 32 GTG-banded blood metaphases from patient D8 first showed a non mosaic idic(Y) with a breakpoint in Yq12 (Fig. 1s). Extensive FISH analyses using probes DYZ3 (Fig. 1t), WCP Y (Fig. 1u) and SRY revealed the presence of a 3 cell-line mosaicism in blood lymphocytes (see Table 2). Additionally, a predominant 45,X cell line was found in fibroblasts. As for the last female (D9), GTG- and RBG-banding demonstrated the presence of a minor 45,X cell line in addition to the idic(Y), with a breakpoint in Yp11.2~11.3 (Fig. 1v). FISH with probe DYZ3 (Fig. 1w) confirmed the isodicentric nature of the Y, while the breakpoint was refined by the absence of SRY (Yp11.31) and presence of two close 91H4.5 (Yp11.2) signals (Fig. 1x). Again, a predominant 45,X cell line was found in fibroblasts.

Finally, FISH on formalin-fixed and paraffin-embedded gonadal tissues with the AneuVysion probe mixture #1 (D5), DXZ1 and DYZ3 (D7), and DXZ1 and DYZ1 (D8) confirmed the presence of a predominant 45,X cell line in the gonads of the three female patients tested. A del(Yq) cell line was also found in 2 cases (D5 and D7).

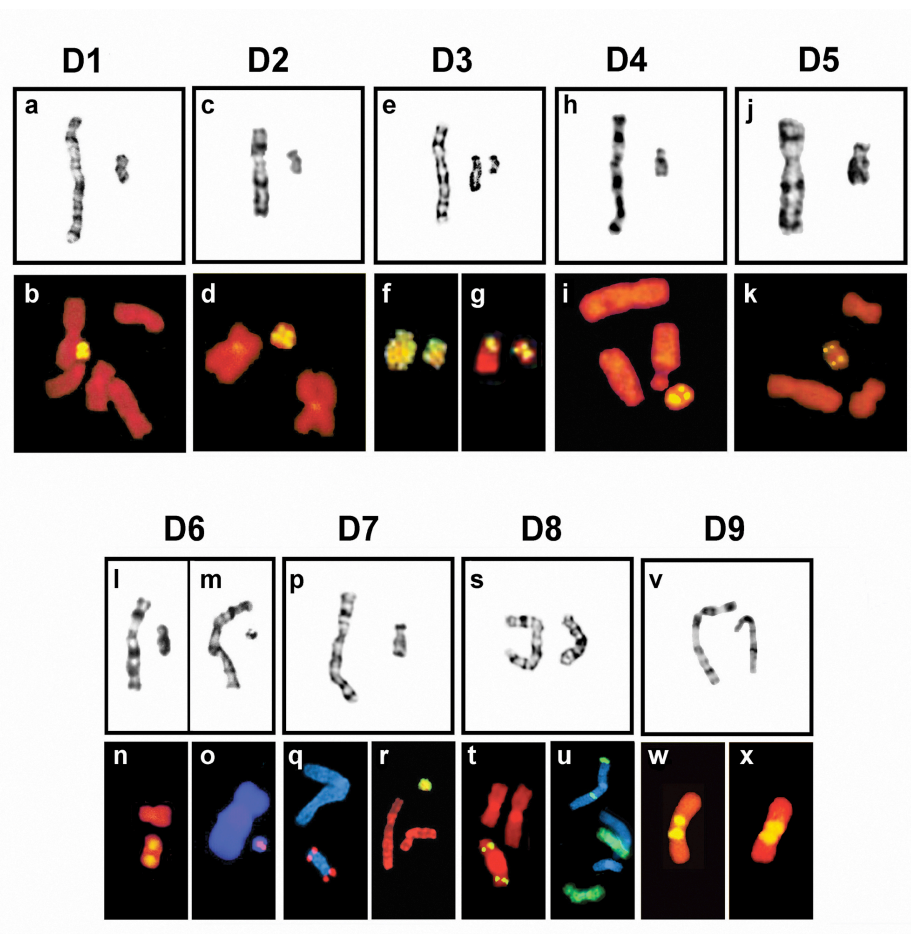


Fig. 1. Partial karyotypes of the sex chromosomes and FISH analyses for all patients.

D1 and D2: partial GTG karyotype of the *idic(Y)* (a, c) and FISH with probe *DYZ3* (b, d).
 D3: partial GTG karyotype showing the normal *Y* (middle) and the *idic(Y)* (right) (e), and FISH with the chromosome *Y* paint (f) and *DYZ3* (g).
 D4 and D5: partial GTG karyotype of the *idic(Y)* (h, j) and FISH with probe *DYZ3* (i, k).
 D6: partial GTG karyotypes showing the *idic(Y)* (l) and the *del(Yq)* (m), and FISH with probes *DYZ3* (n) and *SRY* (o).
 D7: partial GTG karyotype of the *idic(Y)* (p), and FISH with *SRY* (q) and the chromosome *Y* paint (r).
 D8: partial GTG karyotype of the *idic(Y)* (s), and FISH with *DYZ3* (t) and *WCP Y* (u).
 D9: partial RBG karyotype of the *idic(Y)* (v), and FISH with *DYZ3* (w) and *91H4.5* (x).

Table 2. Summary of karyotypes and histology of gonads and adnexal tissues of the nine idic(Y) patients

Case	Karyotypes	Histology of gonads and adnexal tissues
D1 ♂	Blood: 46,X,idic(Y)(q11.21)[140].ish idic(Y)(q11.21) (SR _Y ++,DYZ3++,DYZ1-)	---
D2 ♂	Blood: 46,X,idic(Y)(q11.21)[57].ish idic(Y)(q11.21) (91H4.5++,DYZ3++,DYZ1-) Amniocytes: 46,X,idic(Y)(q11.21)[20].ish idic(Y)(q11.21)(91H4.5++,DYZ3++,DYZ1-)	---
D3 ♂	Blood: 47,XY,idic(Y)(q11.21)[75].ish idic(Y)(q11.21) (wcpY+,SR _Y ++,DYZ3++,DYZ1-)/46,XY[154]	---
D4 ♀	Blood: 45,X[45]/46,X,idic(Y)(q11.2)[30].ish idic(Y)(q11.2)(DYZ3++) Gonads: Not performed; Bouin fixed	Left side: Normal Fallopian tube, Wolffian remnants, streak gonad and hilar cells; partially calcified gonadoblastoma. Right side: Wolffian remnants, streak gonad and hilar cells.
D5 ♀	Blood: 45,X[298]/46,X,idic(Y)(q11.2)[164].ish idic(Y)(q11.2)(SR _Y ++,DYZ3++,DYZ1-) Bilateral gonads: nuc ish(DXZ1x1,DYZ3x0,D18Z1x2)[42]/(DXZ1x1,DYZ3x1,D18Z1x2)[2]/(DXZ1x1,DYZ3x2,D18Z1x2)[1]	Both sides: Normal Fallopian tubes, Wolffian remnants, streak gonads and hilar cells; globular calcifications on one side.
D6 ♀	Blood: 46,X,idic(Y)(q11.2)[192].ish idic(Y)(q11.2) (SR _Y ++,DYZ3++,DYZ1-)/45,X[138]/46,X,del(Y)(q11.2)[22].ish del(Y)(q11.2)(SR _Y +,DYZ3+,DYZ1-) Fibroblasts: 45,X[24]/46,X,idic(Y)(q11.2)[1] Left gonad: 45,X[25] Right gonad: 45,X[20]/46,X,idic(Y)(q11.2)[5]	Left side: Streak gonad, Fallopian tube-like structure, Wolffian remnants, and fibrous tissue with smooth and striated muscle surrounded by vaginalis. Right side: Hypoplastic dysgenetic testis, Fallopian tube, Wolffian remnants with ciliated cells in the inguinal region.
D7 ♀	Blood: 45,X[90]/46,X,idic(Y)(q11.2)[57].ish idic(Y)(q11.2)(SR _Y ++)/46,X,del(Y)(q11.2)[2].ish del(Y)(q11.2)(wcpY+) Bilateral gonads: nuc ish(DXZ1x1)[65]/(DXZ1x1,CEPYx1)[13]/(DXZ1x1,CEPYx2)[1]	Both sides: Streak gonads, multi-nodular gonadoblastoma, globular calcifications, invasive microdysgerminoma, and hilar cells on one side.
D8 ♀	Blood: 46,X,idic(Y)(q12)[226].ish idic(Y)(q12) (wcpY+,SR _Y ++,DYZ3++)/45,X[21]/47,X,idic(Y)(q12)x2[3].ish idic(Y)(q12)x2(wcpY+,SR _Y ++,DYZ3++)x2 Fibroblasts: 45,X[46]/46,X,idic(Y)(q12)[4] Bilateral gonads: nuc ish(DXZ1x1)[158]/(DXZ1x1,CEPYx2)[39]/(DXZ1x1,CEPYx4)[3]	Both sides: Fallopian tubes, Wolffian remnants, and streak gonads. Nests of microscopic gonadoblastoma and sexual cord structures on the left side.
D9 ♀	Blood: 46,X,idic(Y)(p11.2~11.3)[134].ish idic(Y)(p11.2~11.31)(SR _Y -,91H4.5++,DYZ3++)/45,X[40] Fibroblasts: 45,X[19]/46,X,idic(Y)(p11.2~11.3)[1] Gonads: Not performed; Bouin fixed	Both sides: Normal Fallopian tubes, Wolffian remnants, streak gonads and hilar cells. Numerous globular calcifications and hyaline clusters with fusiform cells suggestive of a burned-out gonadoblastoma on the left side.

Discussion

Due to the instability of isodicentric chromosomes during cell division (4), several types of cell lines are found in the great majority of patients with an idic(Y): 45,X (D4, D5, D6, D7, D8 and D9), del(Y) (D5, D6 and D7), idic(Y)x2 (D8), or 46,XY (D3) if the breakage event is post-zygotic (1,5,17-19). It is interesting to note that our patients D1 and D2 are non mosaic. In such cases, it is possible that the isodicentric Y chromosome was stabilized early on, during gametogenesis in the father, through inactivation or synergic action of the centromeres (1,20). The various degrees of mosaicism seen in patients could thus reflect the instability of the idic(Y), and the variable moment of its stabilization during embryogenesis (20).

The phenotype of patients with an isodicentric Y is extremely variable, with features of Turner syndrome and streak gonads in females (~50%), azoospermia, hypospadias and small/abnormal testes in males (~30%), or sexual ambiguity with gonadal dysgenesis in other individuals (~20%) (1,7,8). Short stature is also a common finding, with no regards to the sexual differentiation of the patient (1). As pointed out by Hsu (1), Tuck-Muller et al. (8), and Bouayed Abdelmoula and Amouri (7) in their respective reviews of idic(Y) cases, the sexual differentiation of patients probably depends on the distribution of the 45,X cell line in various tissues, including the gonads. For instance, Alvarez-Nava et al. (6) reported three cases of 45,X/46,X,idic(Y) positive for the same Y chromosome molecular markers, with various degrees of abnormal sexual differentiation. A predominant 45,X cell line was found in the streak gonads of the female with Turner stigmata, while the dysgenetic testes of the male had a predominant 46,X,idic(Y) cell line. The individual with sexual ambiguity had a streak gonad with a predominant 45,X cell line on one side and a dysgenetic testis with a predominant 46,X,idic(Y) cell line on the other side (6). However, gonadal tissues are rarely studied. In fact, only 7 cases in which such tissues were analyzed have been reported (7), including those of Alvarez-Nava et al. (6). In this paper, we studied the gonadal tissues of four of the female patients (cases D5, D6, D7 and D8). We found, as summarized in Table 2, an increase in the proportion of 45,X cells in the gonads compared

to blood in all four patients: 93% vs 64% (D5); 80-100% vs 39% (D6); 82% vs 60% (D7); 79% vs 8% (D8). This could thus explain their female or ambiguous phenotypes. Furthermore, a similar increase of the 45,X cell line was found in fibroblasts compared to blood in patients D6 (96% vs 39%), D8 (92% vs 8%) and D9 (95% vs 23%).

The absence or mutation of *SRY* on the isodicentric Y chromosome is another factor that adds diversity to the phenotype. In the case of *idic(Y)* patient D9, her female phenotype and Turner stigmata can easily be explained by the localization of the breakpoint, which is proximal to the *SRY* gene, in Yp11.2 or p11.31. As for patients like D1, D2 and D3 who do not present a predominant 45,X cell line and possess two copies of *SRY* (as breakpoint are in the long arm), they usually develop as males. However, they are often infertile due to the absence of one of the azoospermia factors (AZF) regions, or the incorrect pairing between the rearranged Y and the X chromosome during meiosis I (18). Still, rare cases of females with a non-mosaic 46,X,*idic(Y)* with breakpoints in the long arm are reported in the literature (21, 22). One of these patients was shown to lack Leydig cells in the testis that was removed at age 16, thus explaining the lack of testosterone production and the female phenotype (21). Mutations in the *SRY* gene on the *idic(Y)*, as reported by Fernandez et al. (23), are a possible explanation for this phenotype. Indeed, sequence analysis of this gene was performed in only a few cases of *idic(Y)* (7). Furthermore, hidden mosaicism or tissue heterogeneity for a 45,X cell line should not be excluded in these patients, as proven by the case of Udler et al. (24), and by our patient D8, whose mosaicism was only detected during extensive FISH analysis.

Because women with gonadal dysgenesis and Y material are at higher risk (15-20%) of developing gonadoblastoma (25), all our female patients had surgery to remove their gonads. Pathological analyses showed that three of them (D4, D7 and D8) had developed a microscopic gonadoblastoma, one (D9) had a probable burned-out gonadoblastoma, and one (D7) developed a micro-dysgerminoma. The putative gonadoblastoma locus (GBY) hypothesized by Page (26) is thought to correspond to the *TSPY* gene (27), which has clusters in several loci on both the short and long arms of the Y chromosome (28,29). The

fact that there may be multiple GBY loci on the Y chromosome could explain why such tumors have been reported in both idic with breakpoints in the long (D4, D7 and D8) and short arms (D9) (1,8).

In conclusion, the great phenotypic variations seen in patients with an isodicentric Y chromosome greatly limit the genotype-phenotype correlation. This variability is explained by the degree of mosaicism in different tissues, and the various locations of the breakpoints. To improve the genotype-phenotype correlation, it is useful to analyze more than one tissue, as significantly different proportions of various cell lines can be found, and to perform histological studies of the gonads. Molecular definition of the breakpoints will also provide more information, allowing for a better genetic counseling.

Acknowledgements

We thank Fléchère Fortin for her technical support, and Denis Rodrigue for his help with the paraffin-embedded tissues. We are also grateful to Dr Christopher Tyler-Smith for providing us with probe 91H4.5, as well as Dr Claude-Lise Richer for reading the manuscript. This work was supported by a grant from the Réseau de Médecine Génétique Appliquée-Fonds de Recherche en Santé du Québec (RMGA-FRSQ).

References

1. Hsu LY. Phenotype/karyotype correlations of Y chromosome aneuploidy with emphasis on structural aberrations in postnatally diagnosed cases. *Am J Med Genet* 1994; 53: 108-140.
2. Daniel A, Lyons N, Casey JH, Gras L. Two dicentric Y isochromosomes, one without the Yqh heterochromatic segment: review of the Y isochromosomes. *Hum Genet* 1980; 54: 31-39.
3. Therman ET, Trunca C, Kuhn EM, Sarto GE. Dicentric chromosomes and the inactivation of the centromere. *Hum Genet* 1986; 72: 191-195.

4. Kohn B, Kleyman SM, Conte RA et al. Characterization of an isodicentric Y-chromosome for the long arm in a newborn with mixed gonadal dysgenesis. *Ann Génét* 1997; 40: 10-13.
5. Bouayed Abdelmoula N, Amouri A. Les chromosomes Y dicentriques. Première partie: Les aspects cytogénétiques et moléculaires. *Ann Biol Clin* 2005; 63: 263-278.
6. Alvarez-Nava F, Soto M, Martinez MC et al. FISH and PCR analyses in three patients with 45,X/46,X,idic(Y) karyotype: clinical and pathologic spectrum. *Ann Génét* 2003; 46: 443-448.
7. Bouayed Abdelmoula N, Amouri A. Les chromosomes Y dicentriques. Deuxième partie: Corrélation phénotype-génotype. *Ann Biol Clin* 2005; 63: 363-375.
8. Tuck-Muller CM, Chen H, Martinez JE et al. Isodicentric Y chromosome: cytogenetic, molecular and clinical studies and review of the literature. *Hum Genet* 1995; 96: 119-129.
9. Robboy SJ, Bentley RC, Russell P, Anderson MC. Embryology and disorders of sexual development. In: Robboy SJ, Anderson MC, Russell P, eds. *Pathology of the Female Reproductive Tract*. London: Churchill Livingstone, 2002: 819-860.
10. Lemieux N, Dutrillaux B, Viegas-Pequignot E. A simple method for simultaneous R- or G-banding and fluorescence in situ hybridization of small single-copy genes. *Cytogenet Cell Genet* 1992; 59: 311-312.
11. Lemieux N, Drouin R, Richer CL. High-resolution dynamic and morphological G-bandings (GBG and GTG): a comparative study. *Hum Genet* 1990; 85: 261-266.
12. Dutrillaux B, Couturier J. *La pratique de l'analyse chromosomique*. Paris: Mason, 1981.
13. Rooney DE, Szepulkowski BH. Prenatal Diagnosis and Tissue Culture. In: Rooney DE, Szepulkowski BH, eds. *Human Cytogenetics: A Practical Approach, Vol. 1 Constitutional Analysis*. New York: Oxford University Press, 1992: 55-89.
14. Kuchinka BD, Kalousek DK, Lomax BL et al. Interphase cytogenetic analysis of single cell suspensions prepared from previously formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Modern Pathol* 1995; 8: 183-186.

15. ISCN 2005. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Shaffer LG, Tommerup N, eds. S Karger, Basel, 2005.
16. Tyler-Smith C, Taylor L, Muller U. Structure of a hypervariable tandemly repeated DNA sequence on the short arm of the human Y chromosome. *J Mol Biol* 1988; 203: 837-848.
17. Ying KL, Ives EJ. Mitotic behavior of a human dicentric Y chromosome. *Cytogenet* 1971; 10: 208-218.
18. Chandley AC, Ambros P, McBeath S et al. Short arm dicentric Y chromosome with associated statural defects in a sterile man. *Hum Genet* 1986; 73: 350-353.
19. Stankiewicz P, Helias-Rodzewicz Z, Jakubow-Durska K et al. Cytogenetic and molecular characterization of two isodicentric Y chromosomes. *Am J Med Genet* 2001; 101: 20-25.
20. Kohler MR, Vogt PH. Interstitial deletions of repetitive DNA blocks in dicentric human Y chromosomes. *Chromosoma* 1994; 103: 324-330.
21. Genuardi M, Bardoni B, Floridia G et al. Dicentric chromosome Y associated with Leydig cell agenesis and sex reversal. *Clin Genet* 1995; 47: 38-41.
22. Robinson DO, Dalton P, Jacobs PA et al. A molecular and FISH analysis of structurally abnormal Y chromosomes in patients with Turner syndrome. *J Med Genet* 1999; 36: 279-284.
23. Fernandez R, Marchal JA, Sanchez A, Pasaro E. A point mutation, R59G, within the HMG-SRY box in a female 45,X/46,X, psu dic(Y)(pter→q11:q11→pter). *Hum Genet* 2002; 111: 242-246.
24. Udler Y, Kauschansky A, Yeshaya J et al. Phenotypic expression of tissue mosaicism in a 45,X/46,X,dicY(q11.2) female. *Am J Med Genet* 2001; 102: 318-323.
25. Verp M, Simpson J. Abnormal sexual differentiation and neoplasia. *Cancer Genet Cytogenet* 1987; 25: 191-218.
26. Page DC. Hypothesis: A Y-chromosomal gene causes gonadoblastoma in dysgenetic gonads. *Devel* 1987; 101: 151-155.

27. Lau YF, Lau HW, Komuves LG. Expression pattern of a gonadoblastoma candidate gene suggests a role of the Y chromosome in prostate cancer. *Cytogenet Genome Res* 2003; 101: 250-260.
28. Tsuchiya K, Reijo R, Page DC, Disteche CM. Gonadoblastoma: Molecular definition of the susceptibility region on the Y chromosome. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 1400-1407.
29. Rottger S, Yen PH, Schempp W. A fiber-FISH contig spanning the non-recombining region of the human Y chromosome. *Chrom Res* 2002; 10: 621-635.

Article 2 - *Accepté avec corrections mineures pour publication dans l'American Journal of Medical Genetics Part A.*

**Correlation between intercentromeric distance, mosaicism and sexual phenotype:
Molecular localization of breakpoints in isodicentric Y chromosomes.**

Mélanie Beaulieu Bergeron ^{1,3,5}, Pierre Brochu ³, Emmanuelle Lemyre ^{2,4,5} and
Nicole Lemieux ^{1,3,5}

¹Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

²Département de pédiatrie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

³Département de pathologie, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada

⁴Service de génétique, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada

⁵Centre de recherche, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada

Corresponding author: Nicole Lemieux, Ph.D.
Département de pathologie et biologie cellulaire
Université de Montréal

ABSTRACT

Isodicentric chromosomes are among the structural abnormalities of the Y chromosome that are most frequently seen in patients. The simultaneous 45,X cell line that is generated in cell division due to instability of the isodicentric Y chromosome [idic(Y)] has long been hypothesized to explain the variable sexual development of patients, although gonads have been studied in only a subset of cases. We report here the molecular localization of breakpoints in ten patients with an idic(Y). Breakpoints were mapped by FISH using BACs; gonads and fibroblasts were also analyzed when possible to evaluate the level of mosaicism. First, we demonstrate great tissue variability in the distribution of idic(Y). Second, palindromes and direct repeats were near the breakpoint of several idic(Y), suggesting that these sequences play a role in the formation of idic(Y). Finally, our data suggests that intercentromeric distance has a negative influence on the stability of idic(Y), as a greater proportion of cells with breakage or loss of the idic(Y) were found in idic(Y) with a greater intercentromeric distance. Females were found to have a significantly greater intercentromeric distance on their idic(Y) than men. In conclusion, our study indicates that the Y chromosome contains sequences that are more prone to formation of isodicentric chromosomes. We also demonstrate that patients with an intercentromeric distance greater than 20 Mb on their idic(Y) are at increased risk of having a female sexual phenotype.

KEY WORDS: isodicentric Y chromosome [idic(Y)]; tissue mosaicism; intercentromeric distance; chromosome instability; disorder of sex development

INTRODUCTION

Isodicentric Y chromosomes [idic(Y)] are one of the most common structural abnormalities of the Y chromosome [Hsu, 1994]. Highly unstable during mitosis due to the presence of two centromeres, most idic(Y) chromosomes are found in mosaics with a 45,X cell line [Hsu, 1994; Tuck-Muller et al., 1995; Bouayed Abdelmoula and Amouri, 2005a]. It has been hypothesized that the proportion of 45,X cells in various tissues would likely influence the phenotypic sex of individuals bearing an idic(Y) chromosome, which ranges from infertile men with hypospadias, to Turner syndrome in women, to individuals with ambiguous genitalia [Hsu, 1994; Tuck-Muller et al., 1995; Bouayed Abdelmoula and Amouri, 2005b].

Isodicentrics caused by a break in the short arm, thus having two intact copies of the long arm of the Y, are abbreviated idic(Y)(p), while isodicentrics caused by a break in the long arm, thus having two intact copies of the short arm, are abbreviated idic(Y)(q) according to the International System for human Cytogenetic Nomenclature (ISCN). However, when referring to an idic with unspecified breakpoints, some authors use idicY(p) or idic(Yp) when two copies of the short arm are present, and idicY(q) or idic(Yq) when two copies of the long arm are present, therefore creating some confusion among readers. In the present paper, all abbreviations are written following the ISCN nomenclature, that is idic(Y)(p) and idic(Y)(q).

As part of a study on structural abnormalities of the Y chromosome that was approved by the Ethic Committee of a pediatric hospital in Montreal, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Sainte-Justine, we mapped by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) the breakpoints of ten patients (six males and four females) with isodicentric Y chromosomes. This allowed us to correlate the phenotypic sex of patients with the intercentromeric distance of idic(Y), as well as the instability of the rearranged Y chromosomes.

CLINICAL REPORTS

All four females were found to have pure gonadal dysgenesis and underwent prophylactic bilateral removal of gonads and Fallopian tubes. As for males, patient 1 presents with cryptorchidism; patient 4 has mixed gonadal dysgenesis, with his left gonad containing both dysgenetic testicular tissue and ovarian tissue. The remaining four male patients have a normal sexual phenotype. Patients 3 and 10 were previously published by DesGroseilliers et al. [2006] as patients D1 and D8 respectively.

MATERIALS AND METHODS

Peripheral blood lymphocytes, amniocytes, skin fibroblasts and cells from fresh gonadal tissues were prepared according to standard protocols [modified from Rooney and Szepulkowski, 1992]. Paraffin-embedded gonadal tissues were prepared using proteinase K and 30% sodium bisulfite [modified from DesGroseilliers et al., 2006]. GTG banding was done according to Lemieux et al. [1990] and karyotypes were established following guidelines of ISCN [2009]. For FISH, the following commercial probes were hybridized as suggested by manufacturers: Yq12 heterochromatin [DYZ1 (Oncor, Gaithersburg, MD, USA) or CEP Y Satellite III (Vysis, Downers Grove, IL, USA)], Y centromere [CEP Y Alpha Satellite (Vysis) or DYZ3 (Oncor)], Y subtelomeric regions [TelVysion Xp/Yp (DXYS129) and Xq/Yq (ESTCdy16c07) (Vysis)], the SRY-region [SRY (Vysis)], X centromere [CEP X (Vysis) or DXZ1 (Oncor)], centromeric regions of chromosome 18, X and Y [AneuVysion Probe Mixture #1 (Vysis)], and the pan-telomeric probe recognizing the consensus sequence (TTAGGG)_n of human telomeres [FITC-(C₃TA₂)₃ peptide nucleic acid (DAKO, Mississauga, ON, Canada)]. We also hybridized a 4.5 kb Hind III fragment of the DYZ4/DYZ5 repeat locus in Yp11.2 [Tyler-Smith et al., 1988], cosmid clones LLYcos130G04 and cos37C09 containing sequences specific to the pseudoautosomal region II (PAR2) of the X and Y chromosomes [Kühl et al., 2001] and the following BAC clones from the Human library RPCI-11 according to the UCSC Genome Browser 2006 hg18 assembly (<http://genome.ucsc.edu>): RP11-145K2, RP11-702H14, RP11-117L2,

RP11-1077B13, RP11-148G1, RP11-652A7, RP11-80C13, RP11-91A13, RP11-1122B19, RP11-78A5, RP11-360H3, RP11-80M6, and RP11-462A19 (Yq11.221); RP11-20H21, RP11-601J1, RP11-138F16, RP11-914P19, RP11-483G19, RP11-356K22, RP11-5I7, and RP11-256K9 (Yq11.222); RP11-120E18, RP11-95B23, RP11-5C5, RP11-140H23, RP11-120I15, RP11-141N4, and RP11-761P22 (Yq11.223); RP11-214M24 (Yq11.223-11.23); RP11-1077O23 and RP11-945P24 (Yq11.23). All hybridizations were done simultaneously on a control slide [modified from Lemieux et al., 1992]. Distance between the centromeres of each idic(Y) was estimated by multiplying by two the distance separating the breakpoint and the centromere, based on the localization of the breakpoint in the Genome Browser. In cases where the breakpoint was mapped in Yq12, the breakpoint was estimated to be in the middle of heterochromatin, as done by Lange et al. [2009]. Pearson's and Spearman's correlations were performed using the SPSS 16.0 software for MacIntosh (SPSS inc. Chicago, IL, USA).

RESULTS

Final karyotypes obtained on blood or amniocytes and intercentromeric distances of idic(Y) are presented in Table I, while FISH results are shown in Figure 1. Breakpoints for each patient are represented in Figure 2 and proportions of the various cell lines are illustrated in Figure 3.

FISH with a probe for the SRY-region showed symmetric signals in all ten cases: interstitial on the idic of patients 1 and 2 [idic(Y)(p)] and at both ends of the idic in patients 3 to 10 [idic(Y)(q)]. As for FISH with the Y centromere, it confirmed the dicentric nature of the rearranged Y in all ten patients.

TABLE I. Final karyotypes for blood lymphocytes in idic(Y) patients

Patient	Sex	Karyotype	Inter-centromeric distance
1	M	46,X,del(Y)(q11)[28]/46,X,idic(Y)(p11.32)[30]/45,X[11]	22 Mb
2	M	46,X,idic(Y)(p11.32)[183]/45,X[47]	22 Mb
3	M	46,X,idic(Y)(q11.221)[140]	7 Mb
4	M	47,XX,idic(Y)(q11.221)[108]/46,XX[274]	12 Mb
5	M	46,X,idic(Y)(q11.222)[193]/45,X[6]/47,X,idic(Y)(q11.222)x2[1]	17 Mb
6	F	46,X,idic(Y)(q11.223)[183]	24 Mb
7	F	46,X,idic(Y)(q11.23)[72]/45,X[160]/46,X,del(Y)(q11)[1]	31 Mb
8*	M	46,X,idic(Y)(q11.23)[41]/45,X[22]	31 Mb
9	F	46,X,idic(Y)(q12)[138]/45,X[36]/46,X,del(Y)(q12)[1]	60 Mb
10	F	46,X,idic(Y)(q12)[260]/45,X[21]/47,X,idic(Y)(q12)x2[3]	60 Mb

* Only amniocytes were available for this patient.

FISH on the idic(Y) of patient 1 indicated that Yp subtelomeres were present at the breakpoint (Fig. 1A), whereas pan-telomeres were not present (Fig. 1B). The breakpoint is thus localized between the subtelomeres and pan-telomeres, at 0-0,264 Mb in Yp11.32. This idic(Y) chromosome was found in 43% of his blood lymphocytes; a marker chromosome (mar) was also found in 41% of the blood cells, while the remaining cells were 45,X. This mar was positive for probes specific to the Y centromere, SRY-region (Fig. 1C) and Yp subtelomeres (Fig. 1D), but negative for Yq subtelomeres and pan-telomeres (not shown). As for the patient's fibroblasts, 17% showed only the mar(Y), whereas all the remaining cells were 45,X. Sadly, we were not able to study the gonads of this patient as all hybridization attempts on the testis biopsy failed.

As for the idic(Y) of patient 2, it was found to be very similar to the one found in patient 1. Indeed, Yp subtelomeres were present at the breakpoint (Fig. 1E) but not the pan-telomeres (not shown). The breakpoint is thus also in Yp11.32, between the subtelomeres and the pan-telomeres, at 0-0,264 Mb. 80% of blood lymphocytes carried the idic(Y); the remaining cells were 45,X. No marker chromosome was found.

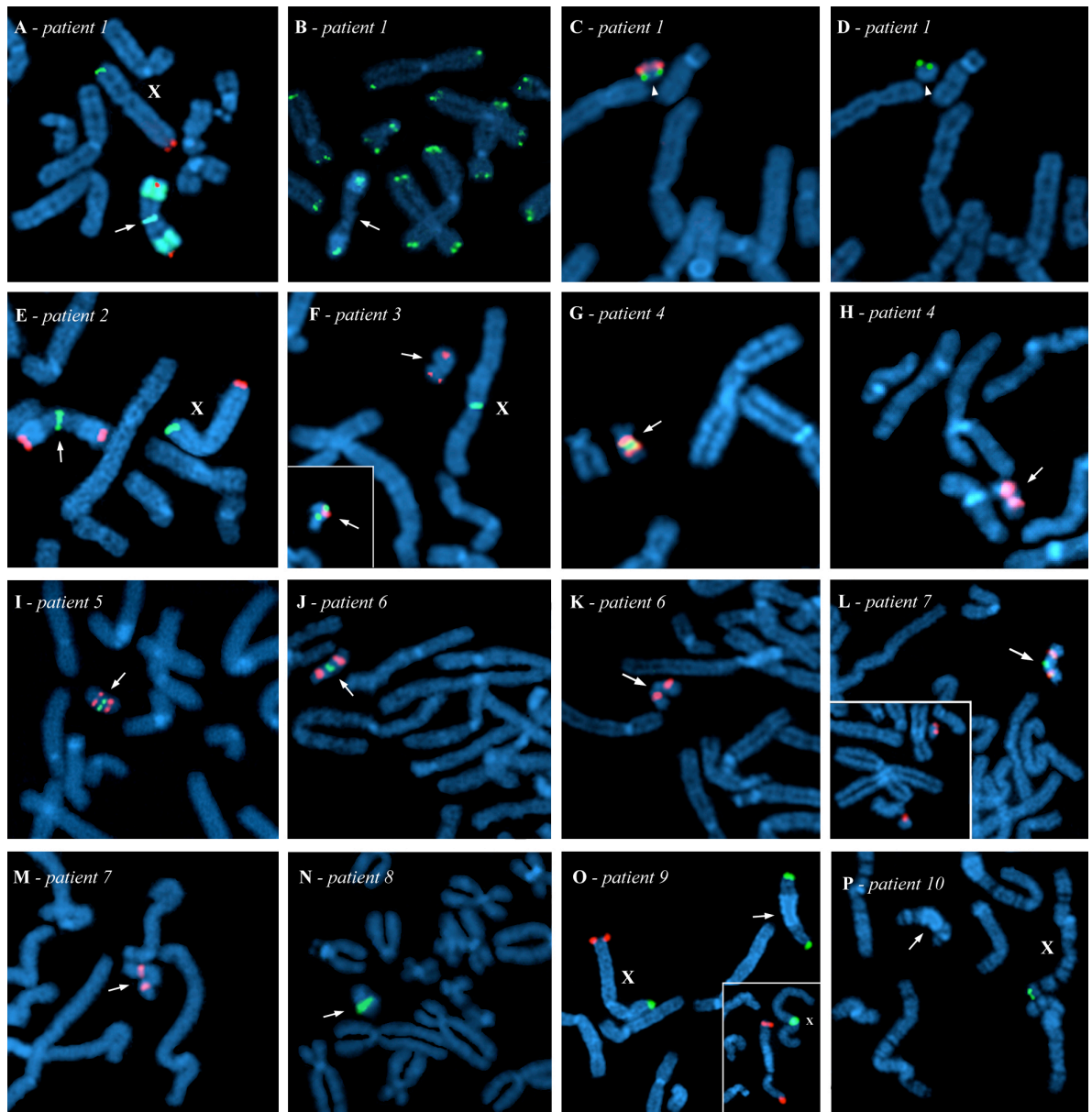


FIG. 1. Partial metaphases showing FISH with commercial probes, BACs and/or cosmid clones. Arrows point to the breakpoint on the *idic(Y)* while arrowheads point to the *mar(Y)*; the X chromosome is identified when visible.

Patient 1: (A) presence of Yq subtelomeres (red) and Yq12 heterochromatin (green) in their normal position on the idic(Y), as well as Yp subtelomeres (green) at the breakpoint; (B) absence of pan-telomeres (green) at the breakpoint on the idic(Y). Presence of (C) SRY-region (red), Y centromere (green) (D) and Yp subtelomeres (green) on the mar(Y). **Patient 2:** (E) presence of Yq subtelomeres (red) in their normal position on the idic(Y) and of Yp subtelomeres (green) and at the breakpoint. **Patient 3:** (F) BAC RP11-117L2 (Yq11.221; green) is absent on the idic(Y) marked by probe SRY (red); the X centromere is in green. Subset: BAC RP11-702H14 (Yq11.221; red) is present on the idic(Y) marked by probe DYZ4/DYZ5 (green). **Patient 4:** (G) presence of BAC RP11-1122B19 (Yq11.221; green) and (H) absence of BAC RP11-78A5 (Yq11.221; green) on the idic(Y) marked by the Y centromere (red). **Patient 5:** (I) BAC RP11-601J1 (Yq11.222; green) is present on the idic(Y) identified by the Y centromere (red). **Patient 6:** (J) presence of BAC RP11-5C5 (Yq11.223; green) and (K) absence of BAC RP11-140H23 (Yq11.223; green) on the idic(Y) marked by the Y centromere (red). **Patient 7:** (L) BAC RP11-1077O23 (Yq11.23; green) is present on the idic(Y) identified by the Y centromere (red). Subset: breakage of the idic(Y) hybridized with the Y centromere (red); the intercentromeric fragment hybridized with BAC RP11-1077O23 (Yq11.23; green) was lost. (M) Absence of BAC RP11-945P24 (Yq11.23; green) on the idic(Y) marked with a Y-centromeric probe (red). **Patient 8:** (N) Presence of BAC RP11-1077O23 (Yq11.23; green) on the idic(Y). **Patient 9:** (O) absence of Yq subtelomeres (red) at the breakpoint on the idic(Y); Yp subtelomeres (green) are found in their normal position. Subset: breakage of the idic(Y) in Yq12. The idic(Y) is hybridized with SRY (red) whereas the X centromere is in green. **Patient 10:** (P) cosmid clone for PAR2 (green) is present at the distal end of the X chromosome, but is absent on the idic(Y).

Blood lymphocytes from patient 3 were found to have a homogeneous *idic(Y)*. The breakpoint was localized at the beginning of Yq11.221, between BACs RP11-702H14 (Figure 1F subset) and RP11-117L2 (Fig. 1F), at 14,637-14,853 Mb. As for patient 4, a 47,XX,*idic(Y)* constitution was found in 28% of his lymphocytes. However, loss of the *idic(Y)* generated a 46,XX cell line that was found in a majority of cells. As FISH was positive with BAC RP11-1122B19 (Fig. 1G) on the *idic(Y)* but was negative with BAC RP11-78A5 (Fig. 1H), the breakpoint for this patient is at 17,144-17,305 Mb, in the distal half of Yq11.221. The 46,XX cell line was also found to be predominant in FISH analyses performed on the fixed biopsy of his left dysgenetic testis. Patient 5 carries an *idic(Y)* in 97% of his blood cells. This *idic(Y)* was found to be positive for BAC RP11-601J1 (Fig. 1I). However, no hybridization signal was observed with BAC RP11-138F16 (not shown). We thus conclude that the breakpoint is at 19,915-20,060 Mb, in the middle of Yq11.222.

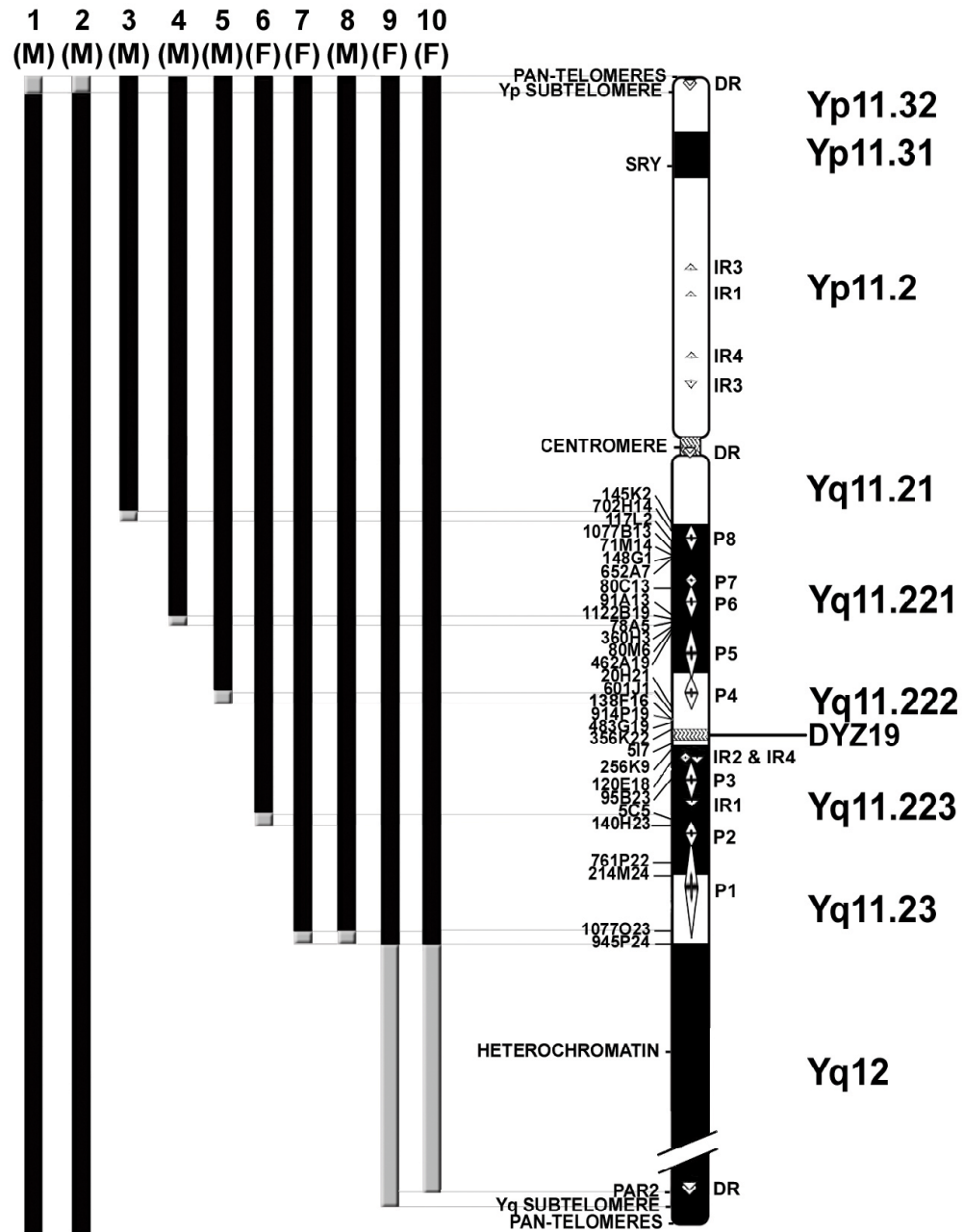


FIG. 2. Idiogram of the Y chromosome with localization of FISH probes on the left, as well as position of palindromes (P) 1 to 8, inverted repeats (IR) 1 to 4 and direct repeats (DR) on the right. Black bars indicate chromosome segments present in each patient whereas grey bars indicate breakpoint regions. The sexual phenotype, male (M) or female (F), is indicated for each patient. Although *idic(Y)* consist, by definition, of two mirror-copies of the same sequence, only one copy is depicted for simplicity.

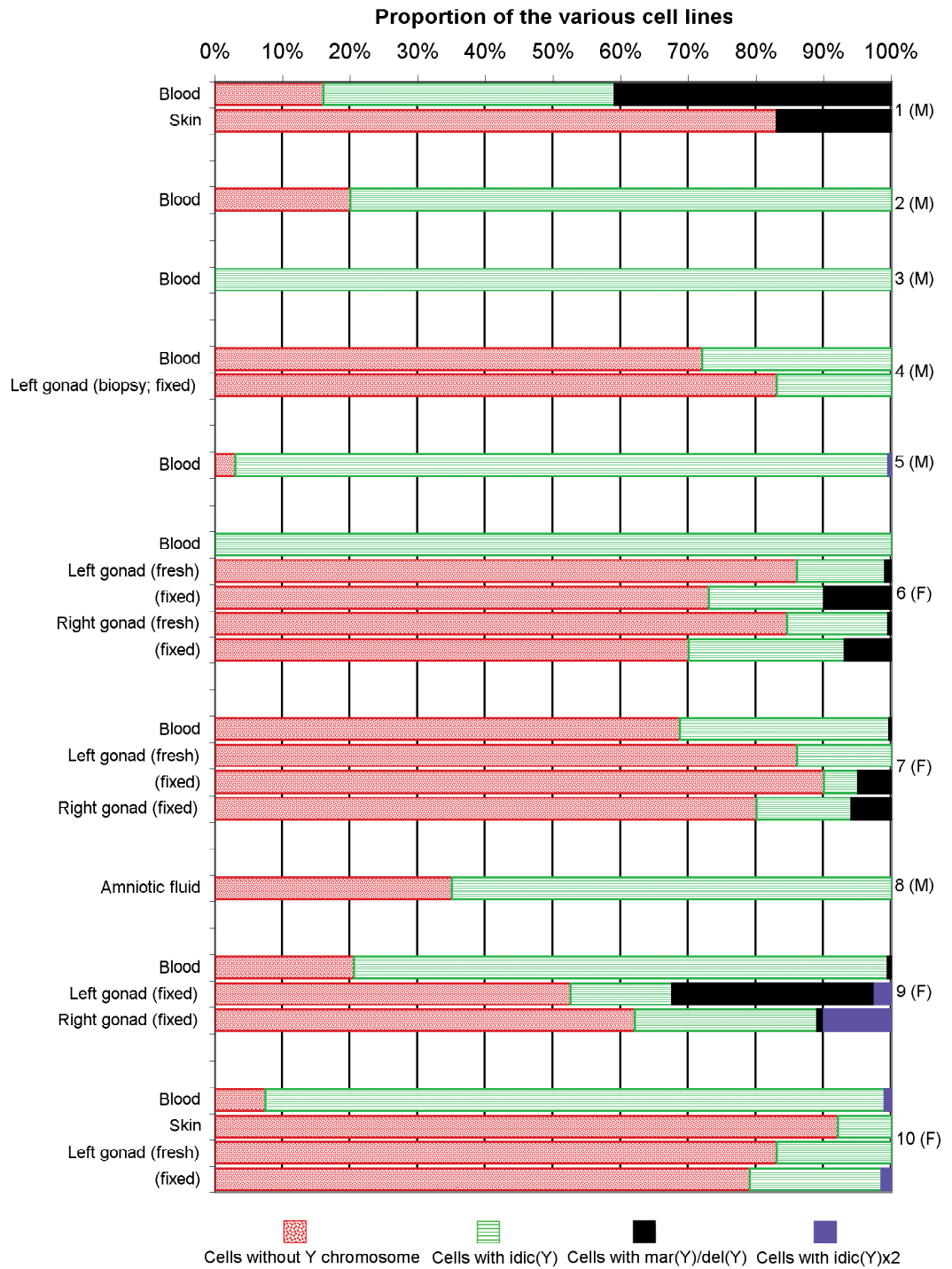


FIG. 3. Bar chart representing the proportion of various cell lines in blood lymphocytes, amniocytes, skin fibroblasts, fixed and/or fresh left and/or right gonadal tissue of all ten patients. Tissues are specified on the left; patients are indicated on the right with their sexual phenotype.

In the case of patient 6, she was found to have an homogeneous idic(Y) in her blood cells. BAC RP11-5C5 (Fig. 1J) hybridized on the idic(Y), whereas BAC RP11-140H23 (Fig. 1K) did not. Therefore, breakage occurred in the middle of Yq11.223, at 23,387-23,612 Mb. The idic(Y) was also found in 14-21% of her gonadal cells, whereas a subset of cells (0,5-2%) contained only one signal for the Y centromere, possibly indicating the presence of a del(Y). The remaining gonadal cells had lost the idic(Y) and were 45,X. As these del(Y) cells were found both on fresh and fixed tissue from both sides, this tends to confirm that this cell line really exist, albeit at a low proportion.

FISH with probes specific to the X and Y centromeres revealed the presence of an idic(Y) in 31% of the blood lymphocytes from patient 7, as well as in 65% of the amniocytes from patient 8. The remaining cells were 45,X in both patients. BAC RP11-1077O23 (Fig. 1L and N) was present on both idic(Y), but BAC RP11-945P24 was absent in both patients 7 (Fig. 1M) and 8 (not shown). The breakpoint thus lies at 26,856-27,001 Mb, in the very end of Yq11.23, in both patients. Furthermore, in the case of patient 7, one metaphase of blood lymphocytes showed a clear break of the idic(Y), resulting in two del(Y) (Fig. 1L subset). The idic(Y) was found in 12-14% of cells in both gonads, and a possible del(Y) was also found in approximately 2% of her gonadal cells. Unfortunately, no other tissue aside from amniotic fluid was available from patient 8.

As for patients 9 and 10, heterochromatin Yq12 was clearly present on the idic(Y) found in 79% and 93% of their respective blood cells. FISH with Yq subtelomeres was negative in both patients 9 (Fig. 1O) and 10 (not shown). Hybridization with cosmid clones for the PAR2 region was also negative on the idic(Y) of patient 10 (Fig. 1P), but could not be performed in patient 9 due to lack of material. The breakpoint is thus localized within Yq12 heterochromatin, proximal to the subtelomeres in both patients. An idic(Y) was also found in the patients' fibroblasts (patient 10) and gonadal tissue (patients 9 and 10), although in a minority of cells. In both patients, the 45,X cell line was predominant in the gonads. Furthermore, 30% of nuclei from the paraffin-embedded left gonad and 1% from the right gonad of patient 9 were found to contain only one signal for the Y centromere, suggesting the presence of a del(Y). However, hybridization proved to be very difficult on

the left gonad and only a small number of cells could be analyzed. Clear visualization of one cell showing a break in the Yq12 region of the idic(Y) of patient 9 (Fig. 1O subset) in blood lymphocytes, as well as another cell showing a fragility in the same region, confirms the presence of a del(Y) cell line in this patient. Finally, 10% of cells from the right gonad of patient 9 were found to have four signals for the Y centromere, suggesting the presence of two idic(Y) in these cells; this was not seen in blood. As for patient 10, two signals for the Yq12 heterochromatin, compatible with the presence of two idic(Y), were seen in a subset of gonadal cells. This was also found in a similar proportion in blood lymphocytes.

DISCUSSION

Although idic(Y) are one of the most common structure abnormality of the Y chromosome, breakpoints have been assigned to a specific cytogenetic band in only a third of published cases, more than half of these being published very recently by Lange et al. [2009]. In fact, Lange et al. [2009] not only characterized the molecular breakpoints of idic(Y), they found that 56 of the 78 idic(Y) they investigated had breakpoints in palindromes, which are susceptible to recombination. Similarly, in our study, palindromes and/or inverted repeats are found at or very near the breakpoint of four out of ten of our idic(Y) cases (patients 3, 6, 7 and 8; Fig. 2). However, palindromes are not implicated in the formation of all idic(Y), as indicated both by our results and those of Lange et al. [2009]. Regions of chromatin more prone to breakage are known to exist, such as common fragile sites that are characterized by the presence of AT-rich sequences [reviewed in Lulusu and Fryns, 2008]. As extremities of Yq12 heterochromatin are thought to be composed of DYZ2 repeats [Ludeña et al., 1993], which are made of an AT-rich sequence interspersed with Alu repeats [Cooke et al., 1982; Frommer et al., 1984], the Y chromosome may be more susceptible to breakage in that region. As a matter of fact, two of our patients (9 and 10) have breakpoints in Yq12, as well as two other patients also reported by Lange et al. [2009]. At least 9 other cases of idic(Y) with breakpoints in Yq12 have been published [reviewed in Hsu, 1994; Jakubowski et al., 2000; DesGroseilliers et al., 2002; Hsieh et al., 2002]. Furthermore, several direct repeats are found on the Y

chromosome, whether at the distal end of both the short and long arms or at the centromere (Fig. 2). The breakpoint in our patients 1 and 2 was found in the terminal region of Yp, which contains a direct repeat (Fig. 2), but we could not determine the exact location of the breakpoint within a 264 kb interval due to lack of specific cytogenetic probes. It is possible that these repeats are prone to breakage and sometimes go through a simple U-type exchange. Indeed, Codina-Pascual et al. [2004] also reported a case where the breakpoint lies between the subtelomeres and telomeres. In addition, Lange et al. [2009] reported a few cases of Y isochromosomes which seem to have breakpoints in or around the direct repeats found at the Y centromere. For the two remaining patients (4 and 5) of our cohort, no repeats were found in the breakpoint region of patient 5 (Fig. 2) that could have been more susceptible to breakage. As for patient 4, the last BAC present on the idic(Y) of this patient overlaps with the distal border of palindrome 6 (Fig. 2), indicating that the breakpoint lies very close to a palindrome; whether or not this played a role in the formation of the chromosome rearrangement remains unclear. Therefore, although regions such as the Yq12 heterochromatin, palindromes and direct repeats might confer susceptibility to the formation of idic(Y), these sequences are not implicated in all cases. This was also found by Lange et al. [2009], as 20 of their 78 idic(Y) had breakpoints outside of such sequences.

Although idic(Y) have been showed to be unstable during mitosis [Cohen et al., 1973; Buchanan et al., 1976], further rearrangements of these chromosomes due to breakage-fusion-bridge (BFB) cycles are not frequently seen. In fact, presence of a marker, ring, deleted or isochromosome Y aside from the idic(Y) has rarely been reported [Tuck-Muller et al., 1995; Bouayed Abdelmoula and Amouri, 2005a]. In this paper, we report that four of our ten cases (patients 1, 6, 7, and 9) presented a further rearrangement of their idic(Y) in their blood, fibroblast and/or gonads. These results indicate that idic(Y) are indeed unstable and can be further rearranged, although rarely in a great proportion of cells, making it difficult to be detected. Furthermore, the proportion of these cell lines can vary greatly among tissues and generally seems higher in gonads than in blood, which might explain why few cases have been reported since gonads are not frequently analyzed. On the

contrary, complete loss of the idic(Y) is more frequent, especially in females, in all types of tissues (Figs. 3 and 4).

As we knew the location of the breakpoint after FISH analyses, we were able to estimate the intercentromeric distance for all patients (Table I). Although we only have a small number of patients, our results suggest that the intercentromeric distance influences the stability of idic(Y). The female patients of our cohort have a significantly greater intercentromeric distance than males (Pearson's correlation $r = 0.615$; $p = 0.001$), all female patients having an intercentromeric distance of more than 20 Mb (Fig. 4). This is in agreement with the observations of Lange et al. [2009]. Greater intercentromeric distance could predispose both to loss and breakage of the idic(Y). Indeed, centromeres of the same chromatid may bind to spindles from opposite mitotic poles, generating abnormal tension of the idic(Y), as originally proposed by Ying and Ives [1971]. Greater the distance between centromeres, greater are the chances of reorientation of the idic(Y) on the metaphase plate [Buchanan et al., 1976]. This could result in breakage [del(Y) or mar(Y) cell line] or anaphase lag, with subsequent loss of the idic(Y) in a micronucleus [45,X cell line] or migration of both copies in the same daughter cell [45,X/47,X,idic(Y)x2 cell lines]. As pointed out by Lange et al. [2009], stabilization of idic(Y) through centromere inactivation would therefore be of greater importance as intercentromeric distances increase, since only active centromeres bind to mitotic spindles. In our study, all patients with a mar(Y) or del(Y) cell line (patients 1, 6, 7, and 9) have an intercentromeric distance of more than 20 Mb on their idic(Y) (Table I).

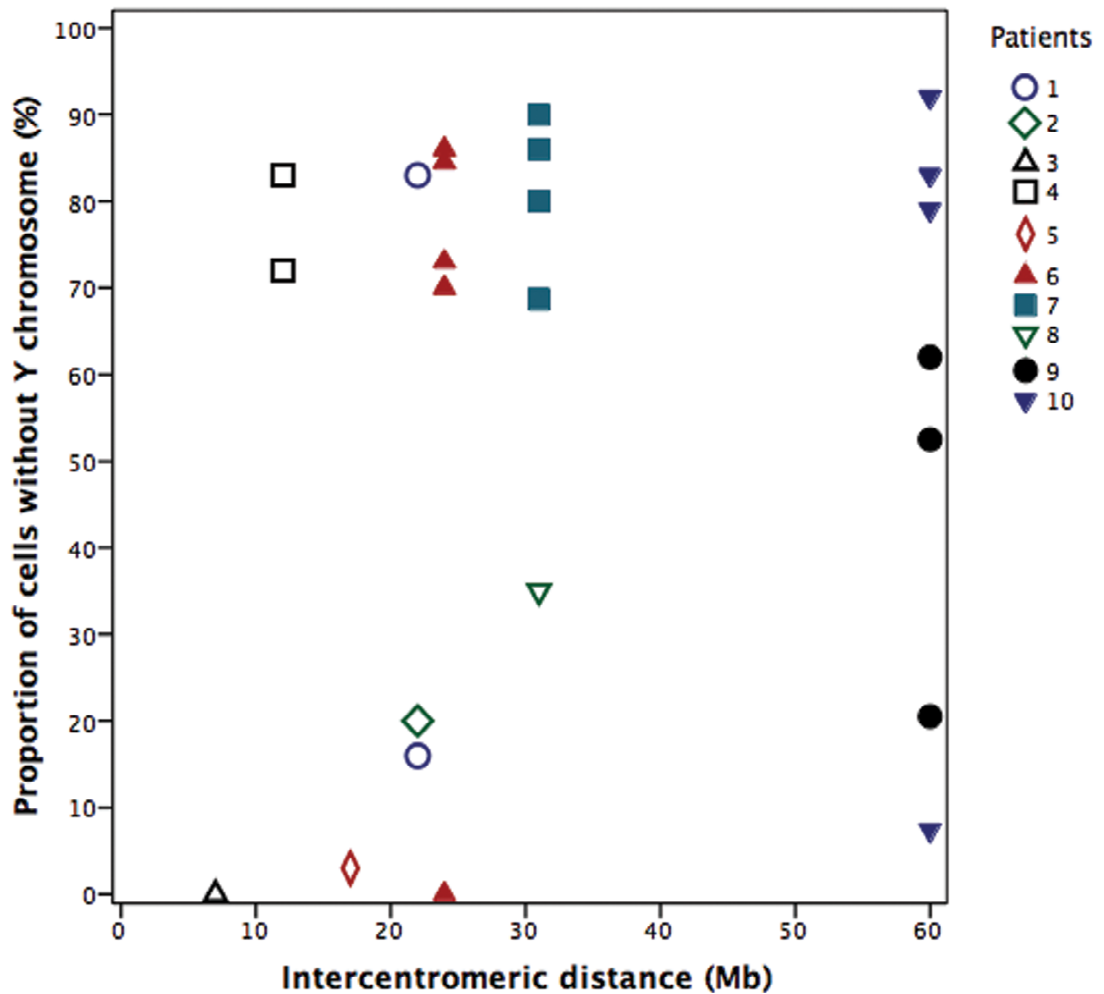


FIG. 4. Correlation between the proportion of cells which lost the Y chromosome in various tissues for each patient and the intercentromeric distance. Each patient is represented by a specific symbol: males by open symbols and females by filled ones.

Approximately 50% of patients with an $\text{idic}(Y)$ develop as females, whereas 20% of patients have ambiguous genitalia. Thus, gonadal 45,X mosaicism was hypothesized to be responsible for the disorder of sex development of many patients bearing an $\text{idic}(Y)$ [reviewed in Hsu, 1994; Tuck-Muller et al., 1995; Bouayed Abdelmoula and Amouri, 2005b]. However, gonads have been studied in only a subset of cases [reviewed in Bouayed Abdelmoula and Amouri, 2005b; DesGroseilliers et al., 2006] and tissue mosaicism was

unfortunately not studied by Lange et al. [2009]. In our cohort of ten *idic(Y)* patients, all four females had 45,X mosaicism in 50% or more of their gonadal cells, both fresh or fixed, as well as an intercentromeric distance of more than 20 Mb (Figs. 3 and 4). As for patient 4, who has a 47,XX,*idic(Y)*/46,XX karyotype in his blood with a predominant (72%) 46,XX cell line, FISH analyses performed on a biopsy of his left gonad revealed that the 46,XX cell line was predominant at 83% (Fig. 3). Gonadectomy performed later revealed the presence of both ovarian and dysgenetic testicular tissue. Although this patient has a dysgenetic testis with ovarian tissue, he nonetheless has a male phenotype. The absence of a more feminized phenotype in spite of the predominance of a 46,XX cell line is puzzling; this suggests that other factors have played a role in the sexual development of this patient. When performing a Spearman's rank correlation between the intercentromeric distance and 45,X mosaicism in blood or fixed gonads, the two most common tissues in our cohort, a statistical trend ($r = 0.472$; $p < 0.1$) was observed after exclusion of patient 4 due to his particular sexual phenotype. Further studies on larger cohort are necessary to confirm our data.

In conclusion, our results indicate that *idic(Y)* breakpoints often occur near palindromes or regions containing repeats, suggesting that these sequences play a role in the formation, or at least confer susceptibility to these structural abnormalities. Our data also suggests that intercentromeric distance has a negative influence on the stability of *idic(Y)*, as a greater proportion of cells with breakage or loss of the *idic(Y)* were found in *idic(Y)* with an intercentromeric distance of more than 20 Mb. Our female patients were found to have a significantly greater intercentromeric distance than men, as well as increased loss of the *idic(Y)*, especially in their gonads. Therefore, this suggests that patients with an intercentromeric distance greater than 20 Mb on their *idic(Y)* are at increased risk of having a female phenotype due to extensive 45,X gonadal mosaicism.

SUPPLEMENTAL DATA

Clinical findings for all ten patients are summarized in Supplemental Table I available online. A table with the final karyotype of each tissue and FISH results for every patient is available online as Supplemental Table II. FISH results of all probes for each patient are listed in Supplemental Table III also available online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Fléchère Fortin and Claude Potvin for their help and support, as well as Dr Bruno Maranda, of the Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CHUQ), for his collaboration. We are grateful to Dr Christopher Tyler-Smith for providing us with probe DYZ4/DYZ5, and to Drs Werner Schempp and Rainer Wimmer for cosmid clones LLYcos130G04 and cos37C09. MBB received grants from Le Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ), La Fondation du CHU Sainte-Justine and La Fondation des Étoiles. Purchase of BACs was financed in part by Le Réseau de Médecine Génétique Appliquée (RMGA).

REFERENCES

- Adachi Y, Sasagawa I, Tomaru M, Ishigooka M, Kubota Y, Nakada T. 1997. Short-arm dicentric Y chromosome associated with Sertoli-cell-only tubule. *Scand J Urol Nephrol* 31:459-461.
- Álvarez-Nava F, Soto M, Martínez MC, Prieto M, Álvarez Z. 2003. FISH and PCR analysis in three patients with 45,X/46,X,idic(Y) karyotype: Clinical and pathologic spectrum. *Ann Genet* 46:443-448.
- Atkins KE, Gregg A, Spikes AS, Bacino CA, Bejjani BA, Kirkland J, Shaffer LG. 2000. Identification of Y chromatin directly in gonadal tissue by Fluorescence in situ Hybridization (FISH): Significance for Ullrich-Turner syndrome screening in the cytogenetics laboratory. *Am J Med Genet* 91:377-382.

- Bettio D, Venci A, Rizzi N, Negri L, Levi Setti P. 2006. Clinical and molecular cytogenetic studies in three infertile patients with mosaic rearranged Y chromosomes. *Hum Reprod* 21:972-975.
- Bouayed Abdelmoula N, Amouri A. 2005a. Les chromosomes Y dicentriques. Première partie: Les aspects cytogénétiques et moléculaires. *Ann Biol Clin* 63:263-278.
- Bouayed Abdelmoula N, Amouri A. 2005b. Les chromosomes Y dicentriques. Deuxième partie: Corrélation phénotype-génotype. *Ann Biol Clin* 63:363-375.
- Bruyère H, Speevak MD, Winsor EJT, de Fréminville B, Farrell SA, McGowan-Jordan J, McGillivray B, Chitayat D, McFadden D, Adouard V, Terespolsky D, Prieur F, Pantzar T, Hrynychak M. 2006. Isodicentric Yp: Prenatal diagnosis and outcome in 12 cases. *Prenat Diagn* 26:324-329.
- Buchanan PD, Wyandt HE, D'Ercole AJ, Rao KW, Hartsell ML. 1976. A mitotically unstable human dicentric Y chromosome in a male pseudohermaphrodite. *Cytogenet Cell Genet* 17:42-50.
- Codina-Pascual M, Oliver-Bonet M, Navarro J, Starke H, Liehr T, Gutiérrez-Mateo C, Sánchez-García JF, Arango O, Egozcue J, Benet J. 2004. FISH characterization of a dicentric Yq (p11.32) isochromosome in an azoospermic male. *Am J Med Genet Part A* 127A:302-306.
- Cohen MM, MacGillivray MH, Capraro VJ, Aceto TA. 1973. Human dicentric Y chromosomes: Case report and review of the literature. *J Med Genet* 10:74-79.
- Cooke HJ, Schmidtke J, Gosden JR. 1982. Characterisation of a human Y chromosome repeated sequence and related sequences in higher primates. *Chromosoma* 87:491-502.
- Daniel A, Lyons N, Casey JH, Gras L. 1980. Two dicentric Y isochromosomes, one without the Yqh heterochromatic segment: Review of the Y isochromosomes. *Hum Genet* 54:31-39.
- DesGroseilliers M, Beaulieu Bergeron M, Brochu P, Lemyre E, Lemieux N. 2006. Phenotypic variability in isodicentric Y patients: Study of nine cases. *Clin Genet* 70:145-150.
- DesGroseilliers M, Lemyre E, Dallaire L, Lemieux N. 2002. Tetrasomy by structural rearrangement: Clinical report. *Am J Med Genet* 111:401-404.

- Dundar M, Lowther G, Acar H, Kurtoglu S, Demiryilmaz F, Kucukaydin M. 2001. A case of ambiguous genitalia presenting with a 45,X/46,X,r(Y)(p11.2;q11.23)/47,X,idic(Y)(p11.2),idic(Y)(p11.2) karyotype. *Ann Genet* 44:5-8.
- Fernandez R, Pasaro E. 2006. Molecular analysis of an idic(Y)(qter-p11.32::p11.32-qter) chromosome from a female patient with a complex karyotype. *Genet mol Res* 5:399-406.
- Fernández-García R, García-Doval S, Costoya S, Pásaro E. 2000. Analysis of sex chromosome aneuploidy in 41 patients with Turner syndrome: A study of 'hidden' mosaicism. *Clin Genet* 58:201-208.
- Frommer M, Prosser J, Vincent PC. 1984. Human satellite I sequence include a male specific 2,47 kb tandemly repeated unit containing one Alu family member per repeat. *Nucleic Acid Res* 12:2887-2900.
- Fryns JP, Kleczkowska A, Lemmens P, Van den Berghe H. 1987. Unusual in vivo rearrangements of the Y chromosome in two males. *Clin Genet* 31:132-136.
- Giltay JC, Ausems MGEM, van Seumeren I, Zewald RA, Sinke RJ, Faas B, de Vroede M. 2000. Short stature as the only presenting feature in a patient with an isodicentric (Y)(q11.23) and gonadoblastoma: A clinical and molecular cytogenetic study. *Eur J Pediatr* 160:154-158.
- Gole LA, Lim J, Crolla JA, Loke KY. 2008. Gonadal mosaicism 45,X/46,X,psu dic(Y)(q11.2) resulting in a Turner phenotype with mixed gonadal dysgenesis. *Singapore Med J* 49:349-351.
- Guedes AD, Bianco B, Lipay MVN, Brunoni D, de Lourdes Chaufaille M, Verreschi ITN. 2006. Determination of the sexual phenotype of a child with 45,X/46,X,idic(Yp) mosaicism: Importance of the relative proportion of the 45,X line in gonadal tissue. *Am J Med Genet Part A* 140A:1871-1875.
- Hsieh YY, Lin W-C, Chang C-C, Tsai F-J, Yu M-T, Tsai H-D, Tsai C-H. 2002. Turner syndrome with pseudo-dicentric Y chromosome mosaicism. *J Assist Reprod Genet* 19:302-303.
- Hsu LYF. 1994. Phenotype/karyotype correlations of Y chromosome aneuploidy with emphasis on structural aberrations in postnatally diagnosed cases. *Am J Med Genet* 53:108-140.

- In't Veld PA, van Opstal D, Van den Berg C, van Ooijen M, Brandenburg H, Pijpers L, Jahoda MG, Stijnen TH, Los FJ. 1995. Increased incidence of cytogenetic abnormalities in chorionic villus samples from pregnancies established by in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET). *Prenat Diagn* 15:975-980.
- Iourov IY, Vorsanova SG, Liehr T, Monakhov VV, Soloviev IV, Yurov YB. 2008. Dynamic mosaicism manifesting as loss, gain and rearrangement of an isodicentric Y chromosome in a male child with growth retardation and abnormal external genitalia. *Cytogenet Genome Res* 121:302-306.
- ISCN 2009: An international system for human cytogenetic nomenclature. Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ, editors. 2009. Basel: S.Karger. 138 p.
- Jakubowski L, Jeziorowska A, Constantinou M, Kałuzewski B. 2000. Molecular analysis of Y chromosome long arm structural instability in patients with gonadal dysfunction. *Clin Genet* 57:291-295.
- Johnston WS, Speed RM, Klopper A, Robinson JA. 1974. A patient with a dicentric Y chromosome. *Clin Genet* 6:326-331.
- Kühl H, Röttger S, Heilbronner H, Enders H, Schempp W. 2001. Loss of the Y chromosomal PAR2-region in four familial cases of satellited Y chromosomes (Yqs). *Chromosome Res* 9: 215-222.
- Lange J, Skaletsky H, van Daalen SKM, Embry SL, Korver CM, Brown LG, Oates RD, Silber S, Repping S, Page DC. 2009. Isodicentric Y chromosomes and sex disorders as byproducts of homologous recombination that maintains palindromes. *Cell* 138:855-869.
- Lau Y-FC, Li Y, Kido T. 2009. Gonadoblastoma locus on the TSPY gene on the human Y chromosome. *Birth Defects Res C Embryo Today* 87:114-122.
- Lemieux N, Drouin R, Richer CL. 1990. High-resolution dynamic and morphological G-bandings (GBG and GTG): A comparative study. *Hum Genet* 85:261-266.
- Lemieux N, Dutrillaux B, Viegas-Pequignot E. 1992. A simple method for simultaneous R- or G-banding and fluorescence in situ hybridization of small single-copy genes. *Cytogenet Cell Genet* 59:311-312.
- Ludeña P, Fernández-Piqueras J, Sentis C. 1993. Distribution of DYZ2 repetitive sequences on the human Y chromosome. *Hum Genet* 90:572-574.

- Lukusa T, Fryns J-P. 2008. Human chromosome fragility. *Biochim Biophys Acta* 1779:3-16.
- Málková J, Michalová K, Chrz R, Kobilková J, Motlik K, Stárka L. 1975. Dicentric Yp chromosome in a patient with gonadal dysgenesis and gonadoblastoma. *Humangenetik* 27:251-253.
- Marcus-Soekarman D, Hamers G, Mulder ALM, Offermans J, Offermans J, Engelen J, van Lent-Albrechts JCM, Robben SGF, de Muinck Keizer-Schrama S, Wolffenbuttel KP, Looijenga LHJ, Oosterhuis JW, Schrandt-Stumpel C, Nijhuis J. 2005. Sonographic genital ambiguity in a fetus due to a mosaic 45,X/46,X,idic(Y)(qter-p11.32::p11.32-qter) karyotype. *Prenat Diagn* 25:279-282.
- Morillo-Cucci G, German J. 1971. Abnormal Y chromosomes and monosomy 45,X: A concept derived from the study of three patients. *Birth Defects Orig Artic Ser* 7:210-214.
- Polani PE, Alberman E, Alexander BJ, Benson PF, Berry AC, Blunt S, Daker MG, Fensom AH, Garrett DM, McGuire VM, Fraser Roberts JA, Seller MJ, Singer JD. 1979. Sixteen years' experience of counseling, diagnosis, and prenatal detection in one Genetic Centre: Progress, results, and problems. *J Med Genet* 16:166-175.
- Quiapo G, Nieto K, Grether P, Frías S, Álvarez R, Palma I, Eraña L, Peña YR, Korman-Alfaro S. 2005. Unusual mixed gonadal dysgenesis associated with Müllerian duct persistence, polygonadia, and a 45,X/46,X,idic(Y)(p) karyotype. *Am J Med Genet Part A* 136A:386-389.
- Quilter CR, Nathwani N, Conway GS, Stanhope R, Ralph D, Bahadur G, Serhal P, Taylor K, Delhanty JDA. 2002. A comparative study between infertile males and patients with Turner syndrome to determine the influence of sex chromosome mosaicism and the breakpoints of structurally abnormal Y chromosomes on phenotypic sex. *J Med Genet* 39:e80 available at www.jmedgenet.com/cgi/content/full/39/12/e80
- Reddy KS, Sulcova V, Ho CK, Conner ED, Khurana A. 1996. An infant with a mosaic 45,X/46,X,psu dic(Y)(pter-q11.2::q11.2-pter) karyotype and mixed gonadal dysgenesis studied for extent of mosaicism in the gonads. *Am J Med Genet* 66:441-444.

- Robinson DO, Dalton P, Jacobs PA, Mosse K, Power MM, Skuse DH, Crolla JA. 1999. A molecular and FISH analysis of structurally abnormal Y chromosomes in patients with Turner syndrome. *J Med Genet* 36:279-284.
- Rooney DE, Szepulkowski BH. 1992. Prenatal Diagnosis and Tissue Culture. In: Rooney DE, Szepulkowski BH, editors. *Human Cytogenetics: A Practical Approach*, Vol. 1 Constitutional Analysis. New York, NY: Oxford University Press, 55-89.
- Schwartz S, Depinet TW, Leana-Cox J, Isada NB, Karson EM, Park VM, Pasztor LM, Sheppard LC, Stallard R, Wolff DJ, Zinn AB, Zurcher VL, Zackowski JL. 1997. Sex chromosome markers: Characterization using fluorescence in situ hybridization and review of the literature. *Am J Med Genet* 71:1-7.
- Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, Repping S, Pyntikova T, Ali J, Bieri T, Chinwalla A, Delehaunty A, Delehaunty K, Du H, Fewell G, Fulton L, Fulton R, Graves T, Hou SF, Latrielle P, Leonard S, Mardis E, Maupin R, McPherson J, Miner T, Nash W, Nguyen C, Ozersky P, Pepin K, Rock S, Rohlfsing T, Scott K, Schultz B, Strong C, Tin-Wollam A, Yang SP, Waterston RH, Wilson RK, Rozen S, Page DC. 2003. The male-specific region on the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 423:825-837.
- Sloan MS, Rosenberg SM, Brown JA. 1984. Primary amenorrhea and virilization in a true hermaphrodite with a rare dicentric Y chromosome. *Obstet Gynecol* 64:64S-67S.
- Stankiewicz P, Hélias-Rodzewicz Z, Jakubów-Durska K, Bocian K, Obersztyn E, Rappold GA, Mazurczak T. 2001. Cytogenetic and molecular characterization of two isodicentric Y chromosomes. *Am J Med Genet* 101:20-25.
- Tuck-Muller CM, Chen H, Martinez JE, Shen C-C, Li S, Kusyk C, Batista DAS, Bhatnagar YM, Dowling E, Wertelecki W. 1995. Isodicentric Y chromosome: Cytogenetic, molecular and clinical studies and review of the literature. *Hum Genet* 96:119-129.
- Tyler-Smith C, Taylor L, Muller U. 1988. Structure of a hypervariable tandemly repeated DNA sequence on the short arm of the human Y chromosome. *J Mol Biol* 203:837-848.
- Willis MJH, Bird LM, Dell'Aquila M, Jones MC. 2006. Natural history of prenatally diagnosed 46,X,isodicentric Y. *Prenat Diagn* 26:134-137.

- Wu H-H, Lee T-H, Chen C-D, Yeh K-T, Chen M. 2007. Delineation of an isodicentric Y chromosome in a mosaic 45,X/46,X,idic(Y)(qter-p11.3::p11.3-qter) fetus by SRY sequencing, G-banding, FISH, SKY and study of distribution in different tissues. *J Formos Med Assoc* 106:403-410.
- Ying KL, Ives EJ. 1971. Mitotic behavior of a human dicentric Y chromosome. *Cytogenetics* 10:208-218.

SUPPLEMENTAL TABLE I. Clinical findings in all 10 patients at their latest clinical evaluation

Patient	Sex	Age	Physical Examination	Appearance of genitalia, and histology of gonads and adnexal tissue (when possible)
1 idic(Y) (p11.32)	M	4 y	Short stature (3 rd percentile).	Genitalia: Membrane at the urinary meatus Gonads: Undescended left testis; right testis in normal position (NA).
2 idic(Y) (p11.32)	M	10 y	Weight at 50-75 th percentile, height at 25 th percentile, OFC at 25 th percentile, high forehead, long eyelashes, blue sclerae, high arched palate, mild camptodactyly of PIP joint of 4 th left finger, persistent fetal pads on finger tips, increased space between 1 st and 2 nd toe, ADHD.	Genitalia: Normal Gonads: Normally positioned, normal testicular and epididymis morphology at ultrasound (NA).
3 idic(Y) (q11.221)	M	16 y	Dysmorphic features (large ears, high arched palate), high growth parameters, learning disabilities, ADHD, dyspraxia.	Genitalia: Normal Gonads: NA
4 idic(Y) (q11.221)	M	3 y	Epicanthal folds, bilateral vesico-urethral reflux.	Genitalia: Bifid scrotum, perineal hypospadias, feminized urethra, chordea. Gonads: Left gonad with ovarian and dysgenetic testicular tissue; right gonad not found at surgery.
5 idic(Y) (q11.222)	M	6 y	Global developmental delay, language delay, behavioral problems (aggressive and hyperactive), small forehead, deep set eyes, epicanthal folds, long palpebral fissures, thick eyebrows, large mouth, hypertrophic gums, hypoplastic mid-face, small nose, spaced teeth, strabismus, mild cubitus valgus.	Genitalia: Normal Gonads: NA
6 idic(Y) (q11.223)	F	7 y	Turner stigmata: webbed neck, low set ears, antimongoloid palpebral fissures, blue sclerae, high arched palate, widely spaced nipples, low posterior hairline, short stature, bicuspid aortic valve, aberrant right sub-clavian artery. ADHD.	Genitalia: Small uterus Gonads and adnexa: Bilateral Fallopian tubes, Wolffian remnants, streak gonads, and hilar cells.
7 idic(Y) (q11.23)	F	18 y	Turner stigmata: low set ears, webbed neck, high arched palate, multiple naevi, cubitus valgus. Primary amenorrhea.	Genitalia: Small uterus Gonads and adnexa: Bilateral Fallopian tubes, Wolffian remnants, streak gonads, and hilar cells.
8 idic(Y) (q11.23)	M	8 m	Normal	Genitalia: Normal Gonads: NA
9 idic(Y) (q12)	F	19 y	Turner stigmata: small ears, high arched palate, multiple naevi, cubitus valgus, short stature, obesity. Spontaneous adrenarache at 12, spontaneous thelarche at 14-15, primary amenorrhea.	Genitalia: Normal uterus Gonads and adnexa: Bilateral Fallopian tubes; gonadoblastoma on the right side.
10 idic(Y) (q12)	F	9 y	Turner stigmata: high arched palate, low set and posteriorly rotated ears, low posterior hairline, pectus excavatum, naevi, slight cubitus valgus, bicuspid aorta, systolic murmur II/VI. Clinodactyly of 5 th finger, bicuspid aortic valve, learning disability.	Genitalia: Small uterus Gonads and adnexa: Bilateral Fallopian tubes, Wolffian remnants, and streak gonads; nests of microscopic gonadoblastoma and sexual cord structures on the left side.

M: male; F: female; y: years; m: months; OFC: occipitofrontal circumference; PIP: proximal interphalangeal; ADHD: attention deficit hyperactivity disorder; NA: not available

SUPPLEMENTAL TABLE II. Detailed karyotypes with all FISH results for the idic(Y) patients

Patient	Karyotype
1	<p>Blood lymphocytes: 46,X,mar[28]/46,X,idic(Y)(p11.32)[30]/45,X[11].ish idic(Y)(tel-,DXYS129+,SRY++,DYZ3++,DYZ1++,ESTCdy16c07++,tel++) del(Y)(q11)(tel-,DXYS129+,DYZ3+,DYZ1-,ESTCdy16c07-,tel-)</p> <p>Fibroblasts: nuc ish(DXZ1x1,DYZ3x0,DYZ1x0)[206]/(DXZ1x1,DYZ3x1,DYZ1x0)[42]</p>
2	<p>Blood lymphocytes: 46,X,idic(Y)(p11.32)[183]/45,X[47].ish idic(Y)(tel-,DXYS129+,SRY++,DYZ3++,ESTCdy16c07++,tel++)</p>
3	<p>Blood lymphocytes: 46,X,idic(Y)(q11.21)[140].ish idic(Y)(q11.221)(SRY++,DYZ4/DYZ5++,DYZ3++,RP11-145K2+,RP11-702H14+,RP11-117L2-,RP11-1077B13-,RP11-148G1-,RP11-652A7-,RP11-80C13-,DYZ1-)</p>
4	<p>Blood lymphocytes: 47,XX,idic(Y)(q11.2)[108]/46,XX[274].ish idic(Y)(q11.221)(SRY++,DYZ3++,RP11-702H14enh,RP11-148G1+,RP11-80C13+,RP11-91A13+,RP11-1122B19+,RP11-78A5-,RP11-360H3-,RP11-80M6-,RP11-462A19-,RP11-20H21-)</p> <p>Fixed left gonad (biopsy): nuc ish(DXZ1x2,DYZ3x2)[25]/(DXZ1x2,DYZ3x0)[125]</p>
5	<p>Blood lymphocytes: 46,X,idic(Y)(q11)[193]/45,X[6]/47,X,idic(Y)(q11)x2[1].ish idic(Y)(q11.222)(SRY++,DYZ3++,RP11-117L2++,RP11-107B13++,RP11-462A19+,RP11-601J1+,RP11-138F16-,RP11-914P19-,RP11-483G19-,RP11-356K22-,RP11-5I7-,RP11-256K9-,RP11-120E18-)</p>
6	<p>Blood lymphocytes: 46,X,idic(Y)(q11.23)[183].ish idic(Y)(q11.223)(SRY++,DYZ3++,RP11-117L2++,RP11-120E18++,RP11-95B23+,RP11-5C5+,RP11-140H23-,RP11-102I15-,RP11-141N4-,RP11-214M24-,DYZ1-)</p> <p>Fresh left gonadal adnexa: 45,X[122]/46,X,idic(Y)(q11)[19]/46,X,del(Y)(q11)[1].ish idic(Y)(q11)(DYZ3++) del(Y)(q11)(DYZ3+)</p> <p>Fixed left gonad: nuc ish(DXZ1x1,DYZ3x0)[30]/DXZ1x1,DYZ3x2[7]/(DXZ1x1,DYZ3x1)[4]</p> <p>Fresh right gonadal adnexa: 45,X[169]/46,X,idic(Y)(q11)[30]/46,X,del(Y)(q11)[1].ish idic(Y)(q11)(DYZ3++) del(Y)(q11)(DYZ3+)</p> <p>Fixed right gonad: nuc ish(DXZ1x1,DYZ3x0)[49]/(DXZ1x1,DYZ3x2)[16]/(DXZ1x1,DYZ3x1)[5]</p>
7	<p>Blood lymphocytes: 46,X,idic(Y)(q11.22~11.23)[72]/45,X[160]/46,X,del(Y)(q11)[1].ish idic(Y)(q11.23)(SRY++,DYZ3++,RP11-5I7+,RP11-140H23+,RP11-761P22+,RP11-214M24+,RP11-1077O23+,RP11-945P24-,DYZ1-) del(Y)(q11)(DYZ3+,RP11-1077O23-)</p> <p>Fresh left gonadal adnexa: nuc ish(DXZ1x1,DYZ3x0)[262]/(DXZ1x1,DYZ3x2)[42]</p> <p>Fixed left gonad: nuc ish(DXZ1x1,DYZ3x0)[90]/(DXZ1x1,DYZ3x2)[5]/(DXZ1x1,DYZ3x1)[5]</p> <p>Fixed right gonad: nuc ish/(DXZ1x1,DYZ3x0)[80]/(DXZ1x1,DYZ3x2)[14]/(DXZ1x1,DYZ3x1)[6]</p>
8	<p>Amniocytes: 46,X,idic(Y)(q11.2)[41]/45,X[22].ish idic(Y)(q11.23)(SRY++,DYZ3++,RP11-117L2++,RP11-5I7+,RP11-140H23+,RP11-761P22+,RP11-214M24+,RP11-1077O23+,RP11-945P24-,DYZ1-)</p>
9	<p>Blood lymphocytes: 46,X,idic(Y)(q12)[138]/45,X[36]/46,X,del(Y)(q12)[1].ish idic(Y)(q12)(DXYS129++,SRY++,DYZ3++,DYZ1enh,ESTCdy16c07-) del(Y)(q12)(SRY+)</p> <p>Fixed left gonad and adnexa: nuc ish(DXZ1x1,DYZ3x0)[21]/(DXZ1x1,DYZ3x1)[12]/(DXZ1x1,DYZ3x2)[6]/(DXZ1x1,DYZ3x4)[1]</p> <p>Fixed right gonad and adnexa: nuc ish(DXZ1x1,DYZ3x0)[62]/(DXZ1x1,DYZ3x2)[27]/(DXZ1x1,DYZ3x4)[10]/(DXZ1x1,DYZ3x1)[1]</p>
10	<p>Blood lymphocytes: 46,X,idic(Y)(q12)[260]/45,X[21]/47,X,idic(Y)(q12)x2[3].ish idic(Y)(q12)(DXYS129++,SRY++,DYZ3++,DYZ1enh,LLycos130G04-,LLycos37C09-,ESTCdy16c07-)</p> <p>Fibroblasts: 45,X[46]/46,X,idic(Y)(q12)[4]</p> <p>Fresh left gonad: nuc ish(DXZ1x1,DYZ3x0)[150]/(DXZ1x1,DYZ3x2)[30]</p> <p>Fixed left gonad: nuc ish(DXZ1x1,DYZ1x0)[158]/(DXZ1x1,DYZ1x1)[39]/(DXZ1x1,DYZ1x2)[3]</p>

SUPPLEMENTAL TABLE III. Results of all hybridized FISH probes for each idic(Y) patient

Location	Patient Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		Yp11.32	Pan-telomeres	-	-						
	Yp subtelomeres	+	+							++	++
Yp11.31	SRY	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Yp11.2	DYZ4/DYZ5			++							
Yp11q11	Y centromere	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Yq11.221	RP11-145K2			+							
	RP11-702H14			+	+						
	RP11-117L2			-		++	++		++		
	RP11-1077B13			-		++					
	RP11-148G1			-	+						
	RP11-652A7			-							
	RP11-80C13			-	+						
	RP11-91A13				+						
	RP11-1122B19				+						
	RP11-78A5				-						
	RP11-360H3				-						
	RP11-80M6				-						
	RP11-462A19				-	+					
	Yq11.222	RP11-20H21				-					
RP11-601J1						+					
RP11-138F16						-					
RP11-914P19						-					
RP11-483G19						-					
RP11-356K22						-					
RP11-5I7						-		+	+		
RP11-256K9						-					
Yq11.223	RP11-120E18					-	++				
	RP11-95B23						++				
	RP11-5C5						+				
	RP11-140H23						-	+	+		
	RP11-102I15						-				
	RP11-141N4						-				
	RP11-761P22							+	+		
	RP11-214M24						-	+	+		
Yq11.23	RP11-1077O23							+	+		
	RP11-945P24							-	-		
Yq12	Heterochromatin	++		-			-	-	-	+	+
	PAR2										-
	Yq subtelomeres	++	++							-	-
	Pan-telomeres	++	++								

++ is only indicated when two distinct signals were clearly observed on chromosomes.

Article 3 - *Sexual Development* 2011; 5: 1-6.

**Identification of new susceptibility regions for X;Y
translocations in patients with testicular disorder of sex
development.**

Mélanie Beaulieu Bergeron ^{a,c,e}, Emmanuelle Lemyre ^{b,d,e} and Nicole Lemieux ^{a,c,e}

^aDépartement de pathologie et biologie cellulaire, ^bDépartement de pédiatrie,
Université de Montréal, Montréal, Qué., Canada

^cDépartement de pathologie, ^dService de génétique, ^eCentre de recherche, Centre
Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, Montréal, Qué., Canada

Corresponding author: Nicole Lemieux, Ph.D.
Département de pathologie et biologie cellulaire
Université de Montréal

Accepted September 13, 2010 by M.Schmid; published online November 17, 2010.

© 2011 by S. Karger AG, Basel. Beaulieu Bergeron *et al.* *Sex Dev* 2011; 5: 1-6.

Testicular disorder of sex development in the presence of a 46,XX karyotype is a rare condition. In most instances, it is caused by an X;Y translocation in the paternal gametes, causing *SRY* to be transferred on the X chromosome. An abnormal recombination event between homologous genes *PRKX* and *PRKY* is implicated in approximately one third of cases. In this study, we report the characterization by fluorescence in situ hybridization of four patients with a 46,X,der(X)t(X;Y) constitution: two monozygotic adult twins, one adult male and a young boy. Molecular cytogenetic analyses using BAC clones specific to the X and Y chromosomes revealed that the translocation is not mediated by an abnormal *PRKX-PRKY* recombination event in any of our patients. On the other hand, the twins and the adult male have similar breakpoints, having almost the entire short arm of the Y chromosome translocated on their der(X). On their der(X) chromosome, breakpoints are located close to *PRKX*, in an interval of less than 200 kb. As for the young boy, his breakpoints are located approximately 300 kb proximal to *SRY*, in Yp11.31, and at the beginning of the pseudoautosomal region in Xp22.33. Our data suggest that some regions are prone to breakage on the sex chromosomes and that these regions represent possible hot spots for X;Y translocations that are not mediated by abnormal recombination.

Key Words

X;Y translocation • 46,XX testicular disorder of sex development • XX males • XX sex reversal • *PRKX-PRKY* recombination

Individuals with a 46,XX constitution and testicular disorder of sex development bear the *SRY* gene on one of their X chromosomes in approximately 90% of cases [McElreavey et al., 1995]. This rare abnormality, with an incidence estimated at 1 in 20,000-25,000 male newborns [de la Chapelle, 1981], arises in paternal gametes due to a translocation between the X and Y chromosomes. In the remaining 10% of patients, the cause of abnormal sexual development is unknown. However, duplication or overexpression of *SOX9*, a gene activated by *SRY* and playing a role in the normal male sexual development [Sekido and Lovell-Badge, 2008], is reported in a few patients [Huang et al., 1999; Kojima et al., 2008]. Furthermore, mutations of *RSPOI*, a gene normally implicated in female sexual development, were found in a family with members suffering from 46,XX testicular disorder of sex development, palmoplantar hyperkeratosis, and a susceptibility to skin squamous cell carcinoma [Parma et al., 2006].

Schiebel et al. [1997] demonstrated that some X;Y translocations occurring in paternal gametes were secondary to an abnormal recombination between homologous genes *PRKX* and *PRKY*, which are outside the pseudoautosomal region on the short arm of both sex chromosomes. As *SRY* is located between the pseudoautosomal region and *PRKY* on the Y chromosome, *PRKX-PRKY* recombination leads to the transfer of *SRY* on the X chromosome. It also generates a Y chromosome lacking *SRY*, which leads to 46,XY pure gonadal dysgenesis. It is estimated that this abnormal recombination accounts for approximately 30% of individuals with 46,XX testicular disorder of sex development [Schiebel et al., 1997]. A 3.6-Mb polymorphic paracentric inversion on the short arm of the Y chromosome, placing *PRKY* in the same orientation as *PRKX*, was later identified as a risk factor for this abnormal recombination [Jobling et al., 1998; Sharp et al., 2005]. This inversion is mediated by recombination between inverted repeats found in the middle and near the centromere of the short arm of the Y chromosome [Tilford et al., 2001].

In this study, we report the molecular characterization by fluorescence in situ hybridization (FISH) of the breakpoints in four 46,X,der(X)t(X;Y) individuals with testicular disorder of sex development. This study was approved by our institutional Ethical Committee.

Materials and Methods

Case reports

Patients 1 and 2 are 45-year-old monozygotic twins presenting with hypoplastic testes, infertility and gynecomastia. Clinical details and GTG karyotypes of these patients were previously published by DesGroseilliers et al. [2006]. Patient 3 is a 51-year-old male presenting with hypoplastic testes, infertility, asthenia, osteopenia and alopecia. As for patient 4, he is 8 years old and presents with microcephaly (2nd percentile), facial hemangioma, high-arched palate, dental malocclusion, strabismus, hyperlaxicity, and learning difficulties. His left testis is hypoplastic, whereas the right one is normal.

Standard Cytogenetics and Fluorescence in situ Hybridization (FISH)

GTG banding was done as previously described [Lemieux et al., 1990]. FISH was performed with the following commercial probes as suggested by manufacturers: X centromere [CEP X (Vysis, Downers Grove, IL, USA) or DXZ1 (Oncor, Gaithersburg, MD, USA)], Y centromere [DYZ3 (Oncor) or CEP Y Alpha Satellite (Vysis)], the SRY-region [SRY (Vysis)], the AMELY-region [QuintY (Oncor)], and X/Y subtelomeric regions [TelVysion Xp/Yp (DXYS129) and Xq/Yq (ESTCdy16c07) (Vysis)]. Based on results obtained with GTG karyotypes and FISH with commercial probes, a 4.5-kb HindIII fragment of the DYZ5 repeat locus in Yp11.2 containing multiple copies of the *TSPY* gene [Tyler-Smith et al., 1988], and the following BAC clones from the human library RPCI-11 according to the UCSC Genome Browser 2006 hg18 assembly (<http://genome.ucsc.edu>), were also hybridized following modifications to a published protocol [Lemieux et al.,

1992]: RP11-91D5, RP11-800K15, RP11-261P4, and RP11-661P1 (Yp11.32 and Xp22.33); RP11-639O7, RP11-414C23, RP11-115E20, and RP11-1031E14 (Yp11.31); RP11-257F2, RP11-349O6, RP11-135B12, RP11-643P3, RP11-467C11, RP11-245G5 (*PRKY*), RP11-1151M7 (*PRKY*), RP11-1023O4, RP11-2P8, RP11-126H13, RP11-375P13, RP11-731O16, and RP11-155J5 (Yp11.2); RP11-802I24, RP11-418N20, RP11-809F20, RP11-1051N9, RP11-23N13, and RP11-631N21 (Xp22.33); RP11-315B16, RP11-177B22, and RP11-775E11 (Xp22.32); and RP11-247N8 (Xp22.31).

As illustrated in the Genome Browser, BACs RP11-1051N9 and RP11-23N13 hybridize on each side of the *PRKX* gene, in Xp22.33, whereas BACs RP11-245G5 and RP11-1151M7 both overlap with the *PRKY* gene in Yp11.2. BACs covering *PRKY* are specific to the Y chromosome and do not cross-hybridize to the X. The telomeric and centromeric ends of the polymorphic paracentric inversion region in Yp11.2 are respectively covered in part by BACs RP11-643P3 and RP11-437C11, and by BACs RP11-731O16 and RP11-155J5. Unfortunately, better coverage for these boundaries as well as the *PRKX* gene was not obtained due to unspecific hybridization of several BACs in these regions..

Results

Cytogenetic analyses revealed the presence of several cell lines in three of the patients. Patient 1 has a 46,X,der(X)t(X;Y)[249]/45,X[12]/45,der(X)t(X;Y)[11]/47,XX,der(X)t(X;Y)[1]/47,X,der(X)t(X;Y)x2[1]/50,XX,der(X)t(X;Y)x4[1]/46,XX[1] karyotype; on the other hand, his twin brother has a 46,X,der(X)t(X;Y)[108]/45,X[3]/47,XX,der(X)t(X;Y)[2]/45,der(X)t(X;Y)[1]/47,X,der(X)t(X;Y)x2[1] constitution, as previously reported by DesGroseilliers et al. [2006]. Patient 3 has a 46,X,der(X)t(X;Y)[109]/47,XX,der(X)t(X;Y)[7]/45,der(X)t(X;Y)[6]/46,der(X)t(X;Y)x2[4]/47,X,der(X)t(X;Y)x2[1] karyotype. As for patient 4, no mosaicism was found at karyotype; however, a smaller number of metaphases were analyzed due to lack of material. He has a 46,X,der(X)t(X;Y)[55] constitution.

FISH with the *SRY* probe confirmed the presence of *SRY* at the distal end of the der(X) in all patients, whereas hybridization with the Y centromere was negative in all cases. Results of hybridized probes for each patient are summarized in table 1.

For patients 1 and 2, the Y breakpoint is localized proximal to BAC RP11-155J5 in Yp11.2, in a 750-kb region above the Y centromere. Thus, the breakpoint is proximal to the centromeric boundary of the polymorphic paracentric inversion region in Yp11.2. Indeed, BACs RP11-731O16 (fig. 1a) and RP11-155J5, which both overlap in part with the centromeric end of the inverted repeat (fig. 2a), are still present on the der(X) (table 1). However, as the 750-kb region proximal to BAC RP11-155J5 lacks coverage in the Genome Browser, we could not further define the breakpoint. Regarding the X chromosome breakpoint, it was mapped in a 220-kb interval proximal to *PRKX*, since BAC RP11-23N13 (figs. 1b, 2b) is absent on the der(X) while BAC RP11-631N21 is present (table 1).

FISH analyses in patient 3 revealed that the Y breakpoint is localized in the same 750-kb interval in Yp11.2, BAC RP11-155J5 being present on the der(X) (table 1, fig. 1c). As for the breakpoint on the X chromosome, it is located in or around the *PRKY* gene, since BAC RP11-23N13 (fig. 1d), but not BAC RP11-1051N9, is still present on the der(X) (table 1, fig. 2b). The *PRKY* gene is not rearranged in this patient, as both BACs RP11-1151M7 and RP11-245G5 spanning the gene (fig. 2c) are present on the der(X) (table 1).

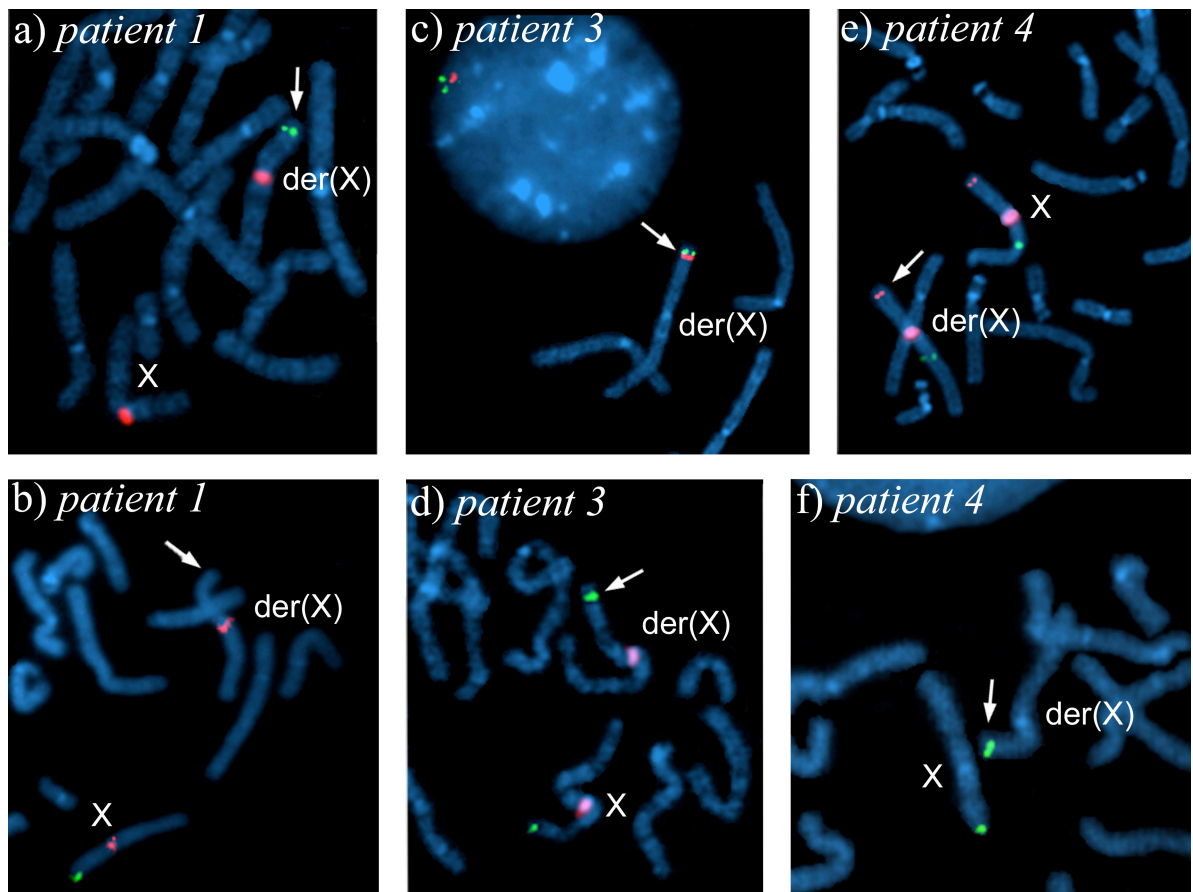


Fig. 1. Partial metaphases showing FISH results. X and der(X) chromosomes are also hybridized with a centromeric probe (red) in **a**, **b**, **d**, and **e**. Arrows point to the Y material on the der(X).

Patient 1: **a** presence of BAC RP11-731O16 (Yp11.2; green) but **b** absence of BAC RP11-23N13 (Xp22.33; green) on the der(X). Patient 3: **c** presence of BACs RP11-639O7 (Yp11.31; green) and RP11-155J5 (Yp11.2; red) on the der(X), as well as **d** BAC RP11-23N13 (Xp22.33; green). Patient 4: **e** absence of BAC RP11-115E20 (Yp11.31; green), which cross-hybridizes in Xq21.3, at the distal end of the der(X) and presence of BAC RP11-775E11 (red) in Xp22.32 on the der(X); **f** presence of a BAC RP11-802I24 (green) in Xp22.33 on the der(X).

Table 1. Results for all probes hybridized on the der(X) in patients 1 to 4. Commercial probes are in *italic*; breakpoints are shaded in grey.

Location	Probe	Patients 1 and 2	Patient 3	Patient 4
Yp11.32	<i>Subtelomeres</i>		+	
	RP11-91D5 ^a		+	+
	RP11-800K15 ^a	+	+	+
	RP11-261P4 ^a	+		+
	RP11-661P1 ^a			+
Yp11.31	RP11-639O7	+	+(fig. 1c)	+
	<i>SRY</i>	+	+	+
	RP11-414C23			+
	RP11-115E20 ^b			-(fig. 1e)
	RP11-1031E14 ^b			-
Yp11.2	RP11-257F2 ^b			-
	RP11-349O6 ^b			-
	RP11-135B12 ^b	+	+	
	RP11-643P3 ^b	+	+	
	RP11-467C11 ^{b, c, d}	+	+	
	<i>QuintY</i> (AMELY)	+		
	RP11-245G5 (PRKY)		+	
	RP11-1151M7 (PRKY)		+	
	RP11-1023O4		+	
	RP11-2P8		+	
	RP11-126H1		+	
	RP11-375P13		+	
	DYZ5 ^c	+		
	RP11-731O16 ^d	+(fig. 1a)	+	
	RP11-155J5	+	+(fig. 1c)	
Yp11.1-q11.1	<i>DYZ3</i>	-	-	
Xp22.33	<i>Subtelomeres</i>		-	
	RP11-91D5 ^a		-	-
	RP11-800K15 ^a	-	-	-
	RP11-261P4 ^a	-		-
	RP11-661P1 ^a			-
	RP11-802I24		-	+(fig. 1f)
	RP11-418N20		-	+
	RP11-809F20		-	+
	RP11-1051N9 ^e	-	-	
	RP11-23N13 ^c	-(fig. 1b)	+(fig. 1d)	+
	RP11-631N21	+		+
Xp22.32	RP11-315B16	+	+	
	RP11-177B22			
	RP11-775E11		+	+(fig. 1e)
Xp22.31	RP11-247N8	+	+	+
Xp11.1-q11.1	<i>DXZI</i>	+	+	+

^a Located in the Xp/Yp pseudoautosomal region.

^b Cross-hybridizes in Xq21.3, as seen in XY controls.

^c Polymorphic deletion boundaries.

^d Polymorphic inversion boundaries.

^e PRKX lies between these two probes.

As for patient 4, the Y breakpoint was mapped approximately 300 kb proximal to the *SRY* gene, probably within the 170-kb long BAC RP11-115E20 which is not present at the distal end of the der(X) (table 1, fig. 1e). A cross-hybridization signal was however observed in the homologous region Xq21.3 on both the normal and derivative X chromosomes (fig. 1e). A similar pattern of cross-hybridization was seen in XY controls. The X breakpoint was mapped at the very beginning of the pseudoautosomal region in Xp22.33, as all BACs specific to the X chromosome and not cross-hybridizing to the Y chromosome are still present on the der(X), including BAC RP11-802I24 (table 1, fig. 1f) which maps just centromeric to the pseudoautosomal region boundary. FISH with BAC RP11-661P1, which maps in the pseudoautosomal region, revealed only 2 signals in interphase nuclei, suggesting that there is no interstitial signal (Xp22.33) on the der(X) (table 1). However, this BAC is 800-kb away from the pseudoautosomal region boundary; unfortunately, FISH with BACs located between BACs RP11-802I24 and RP11-661P1 failed. Therefore, data suggest that the X chromosome breakpoint is located somewhere in the first 800 kb of the pseudoautosomal region in Xp22.33.

Discussion

We did not find evidence of a *PRKX-PRKY* recombination in any of our patients. Indeed, although the breakpoint on the X chromosome of patient 3 is either in or around *PRKX*, the *PRKY* gene is not rearranged in this patient. Had a recombination event been the cause of the translocation, the signal for either one of the probes covering *PRKY* (fig. 2c) would have been lost as none of the probes recognizes the X homolog *PRKX*. As for patients 1 and 2, the X breakpoint is proximal to *PRKX*, since BAC RP11-23N13 which has its telomeric end mapping 50 kb centromeric to the gene (fig. 2b) is not present on the der(X) (table 1). Regarding the Y chromosome breakpoint, patients 1, 2 and 3 have most of the short arm of the Y translocated on the der(X). Indeed, the breakpoint was found in a 750-kb interval without any genes above the centromere, but lack of coverage in the Genome Browser did not allow for a better characterization or investigation of the mechanisms implicated in these rearrangements. As for patient 4, his translocation is not

due to a recombination between homologous sequences either. The X breakpoint is in the pseudoautosomal region in Xp22.33, whereas the Y breakpoint maps in Yp11.31 to a region 300 kb proximal of *SRY* and with known homology to Xq21.3. Therefore, our data suggest that patients 1, 2 and 3 have similar breakpoints, both on the X and Y chromosomes. However, further analysis is required to precise the Y breakpoint within the 750-kb interval above the centromere. A similar Y breakpoint was found in one of the fifteen 46,X,der(X) patients reported by Sharp et al. [2005], although it could not be further refined. As for the X breakpoint in or around *PRKX*, Klink et al. [1995] reported the case of a t(X;Y) and one case of del(X)(p) involving a breakpoint in *PRKX*. The authors suggested that this gene may have a structure somewhat prone to breaks [Klink et al., 1995]. To our knowledge, no homology between *PRKX* and the 750-kb interval in Yp11.2 is documented in the Genome Browser nor has been reported in the literature.

Regarding the sexual development of patients with a 46,X,der(X)t(X;Y) constitution, Sharp et al. [2005] suggested that patients with breakpoints close to *SRY* may have increased risk of suffering from ovotesticular disorder of sex development if regulatory sequences of the gene are disrupted. He reported the case of 3 patients (1-3) with an ovotesticular disorder of development who have a breakpoint less than 70 kb proximal to *SRY*. Our patient 4 does not present with ambiguous genitalia; however, histological analysis of his gonads was not performed. As his breakpoint is located approximately 300 kb proximal to *SRY*, the impaired expression regulation of this gene, if any, is possibly minimal.

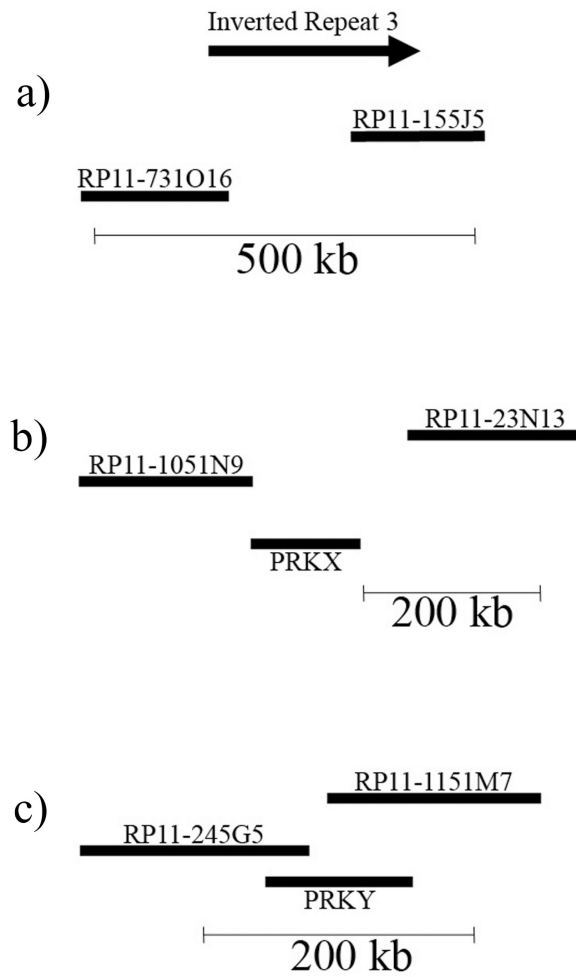


Fig. 2. Details of probe coverage of **a** the centromeric boundary of the polymorphic paracentric inversion region in Yp11.2, as well as **b** *PRKX* and **c** *PRKY* genes. All regions are shown according to the reference telomeric→centromeric (left to right) orientation of the Genome Browser.

Aside from some facial dysmorphisms and hyperlaxicity seen in patient 4, all of our patients present the usual phenotype seen in testicular disorder of sex development despite having very different amount of Y chromatin translocated to one of their X chromosomes. This is in line with the findings of Sharp et al. [2005], who reported no obvious phenotypic variability, other than a variable male phenotype, in a series of fifteen cases of 46,X,der(X)t(X;Y) individuals with various Yp breakpoints. Furthermore, three groups published cases of 46,XY patients with an interstitial deletion of approximately 3 Mb in Yp11.2 and no phenotypic abnormalities [Santos et al., 1998; Jobling et al., 2007; Yong et al., 2007]. This deletion is mediated by recombination between arrays of *TSPY* repeats, which are localized within the telomeric inverted repeat 3 and in the *DYZ5* locus respectively, in Yp11.2 (table 1). This polymorphic deletion region is located within the polymorphic inversion region in Yp11.2. The polymorphic deletion is found on many haplotypes of the Y chromosome in various populations [Santos et al., 1998; Jobling et al., 2007; Yong et al., 2007]. This region is still present in our patients 1, 2 and 3, as well as in patients 7-15 of Sharp et al. [2005], but not in our patient 4 or patients 1-6 of Sharp et al. [2005]. Altogether, this suggests that other than the degree of male sexual development, which can be influenced by the presence of a breakpoint close to *SRY*, the Y chromosome breakpoint is unlikely to have an impact on the general phenotype of patients with a 46,X,der(X)t(X;Y) constitution.

As said earlier, patient 4 exhibits more phenotypic features than usually seen in patients with testicular disorder of sex development, and has a very small duplication of the Xp/Yp pseudoautosomal region. However, patients described by both Sharp et al. [2005] (patient 3) and Chagnon et al. [2006] (proband) do not have similar features, although presenting a duplication of a similar and larger segment of the pseudoautosomal region, respectively. Therefore, the abnormal phenotype seen in our patient 4, except for his male sexual development, is probably not related to his X;Y translocation.

Conclusion

We have characterized by FISH the breakpoints in four 46,X,der(X)t(X;Y) males, including a pair of homozygous twins. None of the patients presents evidence of a *PRKX-PRKY* recombination event. On the other hand, three of the patients present with similar breakpoints in or around *PRKX*, in Xp22.33, and in a 750-kb region just above the Y centromere, in Yp11.2. Although further analyses are required to refine the Y breakpoint, this suggests that there may be regions more prone to breakage on the sex chromosomes, creating hot spots for X;Y translocations that are not mediated by abnormal recombination.

References

- Chagnon P, Schneider R, Hébert J, Fortin PR, Provost S, et al: Identification and characterization of an Xp22.33;Yp11.2 translocation causing a triplication of several genes of the pseudoautosomal region 1 in an XX male patient with severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 54:1270-1278 (2006).
- de la Chapelle A: The etiology of maleness in XX men. *Hum Genet* 58:105-116 (1981).
- DesGroseilliers M, Fortin F, Lemyre E, Lemieux N: Complex mosaicism in sex reversed SRY+ male twins. *Cytogenet Genome Res* 112:176-179 (2006).
- Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb AN, Bartley J: Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *Am J Med Genet* 87:349-353 (1999).
- Jobling MA, Lo ICC, Turner DJ, Bowden GR, Lee AC, et al: Structural variation on the short arm of the human Y chromosome: Recurrent multigene deletions encompassing Amelogenin Y. *Hum Mol Genet* 16:307-316 (2007).
- Jobling MA, Williams G, Schiebel K, Pandya A, McElreavey K, et al: A selective difference between human Y-chromosomal DNA haplotypes. *Curr Biol* 8:1391-1394 (1998).
- Klink A, Schiebel K, Winkelmann M, Rao E, Horsthemke B, et al: The human protein kinase gene PKX1 on Xp22.3 displays Xp/Yp homology and is a site of chromosomal instability. *Hum Mol Genet* 4:869-878 (1995).

- Kojima Y, Hayashi Y, Mizuno K, Sasaki S, Fukui Y, et al: Up-regulation of SOX9 in human sex-determining region on the Y chromosome (SRY)-negative XX males. *Clin Endocrinol* 68:791-799 (2008).
- Lemieux N, Drouin R, Richer CL: High-resolution dynamic and morphological G-bandings (GBG and GTG): A comparative study. *Hum Genet* 85:261-266 (1990).
- Lemieux N, Dutrillaux B, Viegas-Péquignot E: A simple method for simultaneous R- and G-banding and fluorescence in situ hybridization of small single-copy genes. *Cytogenet Cell Genet* 59:311-312 (1992).
- McElreavey K, Barboux S, Ion A, Fellous M: The genetic basis of murine and human sex determination: A review. *Heredity* 75:599-611 (1995).
- Parma P, Radi O, Vidal V, Chaboissier MC, Dellambra E, et al: R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet* 38:1304-1309 (2006).
- Santos FR, Pandya A, Tyler-Smith C: Reliability of DNA-based sex tests. *Nature* 18:103 (1998).
- Schiebel K, Winkelmann M, Mertz A, Xu X, Page DC, et al: Abnormal XY interchange between a novel isolated protein kinase gene, PRKY, and its homologue, PRKX, accounts for one third of all (Y+)XX males and (Y-)XY females. *Hum Mol Genet* 6:1985-1989 (1997).
- Sekido R, Lovell-Badge R: Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature* 453:930-934 (2008).
- Sharp A, Kusz K, Jaruzelska J, Tapper W, Szarra-Czapnik M, et al: Variability of sexual phenotype in 46,XX(SRY+) patients: The influence of spreading of X inactivation versus position effects. *J Med Genet* 42:420-427 (2005).
- Tilford CA, Kuroda-Kawaguchi T, Skeletsky H, Rozen S, Brown LG, et al: A physical map of the human Y chromosome. *Nature* 409:943-945 (2001).
- Tyler-Smith C, Taylor L, Müller U: Structure of a hypervariable tandemly repeated DNA sequence on the short arm of the human Y chromosome. *J Mol Biol* 203:837-848 (1988).

Yong RYY, Gan LSH, Chang YM, Yap EPH: Molecular characterization of a polymorphic 3-Mb deletion at chromosome Yp11.2 containing the AMELY locus in Singapore and Malaysia populations. *Hum Genet* 122:237-249 (2007).

Chapitre 2

Facteurs de risque et étiologie des tumeurs gonadiques chez les patients avec une anomalie du développement sexuel

Dans ce deuxième chapitre, nous avons analysé le tissu gonadique des patients avec une anomalie du développement sexuel afin d'identifier des facteurs de risque pour la tumorigenèse et de mieux comprendre l'étiologie des tumeurs gonadiques que ces patients développent. Nous avons également évalué le mosaïcisme chromosomique dans ces tissus pour tenter d'expliquer leur phénotype sexuel.

De façon plus spécifique, l'article 4 intitulé « *Co-existence of a choriocarcinoma and a gonadoblastoma in the gonad of a 46,XY female: A SNP array analysis* » présente le premier cas publié de choriocarcinome analysé par micropuces et discute de l'implication des anomalies génétiques retrouvées sur la pathogenèse de cette tumeur rare.

Dans l'article 5 « *Undifferentiated gonadal tissue, Y chromosome instability and gonadal tumors in XY gonadal dysgenesis* », nous discutons des implications du tissu gonadique indifférencié et de la pathogenèse des tumeurs gonadiques dans les gonades de patients avec une anomalie du développement sexuel. Nous démontrons également que l'instabilité des chromosomes Y remaniés dans les gonades peut expliquer le développement sexuel anormal des patients, mais que ce mécanisme n'est pas impliqué chez les patients avec un chromosome Y normal.

En ce qui a trait à l'article 4, l'histoire clinique et les analyses histologiques ont été faites par Antonio Maietta, Ph.D., sous la supervision de Dorothée Bouron-Dal Soglio, M.D., M.Sc., Jean-Christophe Fournet, M.D., Ph.D., et Pierre Brochu, M.D. Mélanie Beaulieu Bergeron a rédigé le manuscrit et réalisé les analyses cytogénétiques, sous la supervision de Nicole Lemieux, Ph.D.

Mélanie Beaulieu Bergeron a exécuté les analyses cytogénétiques et la rédaction de 60% du manuscrit de l'article 5. Pierre Brochu, M.D., a effectué les analyses histologiques et immunohistochimiques, et a participé à la rédaction (40%). Nicole Lemieux, Ph.D., a supervisé la rédaction du manuscrit et les techniques cytogénétiques.

**Article 4 - *Pediatric and Developmental Pathology* 2010;
13: 66-71.**

**Co-existence of a choriocarcinoma and a gonadoblastoma in the
gonad of a 46,XY female: A SNP array analysis.**

Mélanie Beaulieu Bergeron^{1,2,3}, Dorothée Bouron-Dal Soglio², Antonio Maietta⁴, Jean-Christophe Fournet^{1,2,3}, Miriam Blumenkrantz⁵, Pierre Brochu² and Nicole Lemieux^{1,2,3*}

¹Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, 2900 boul. Édouard-Montpetit, Montréal, Québec, H3T 1J4, Canada

²Département de pathologie, ³Centre de recherche, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, 3175 ch. Côte Ste-Catherine, Montréal, Québec, H3T 1C5, Canada

⁴Département de pathologie, Hôpital Notre-Dame du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, 1560 rue Sherbrooke Est, Montréal, Québec, H2L 4M1, Canada

⁵Département de pathologie, Hôpital de Montréal pour Enfants du Centre Universitaire de Santé McGill, 2300 Tupper, Montréal, Québec, H3H 1P3, Canada

***Corresponding author:** Nicole Lemieux, Ph.D.
Département de pathologie et biologie cellulaire
Université de Montréal

Received February 3, 2009; accepted April 3, 2009; published online May 8, 2009.

© 2010 by the Society for Pediatric Pathologists, Allen Press Inc. Beaulieu Bergeron *et al.*
Ped Dev Pathol 2010; 13: 66-71.

ABSTRACT

Females with 46,XY complete gonadal dysgenesis are at significant risk of developing germ cell tumors, mostly gonadoblastomas. We present here the case of two half-sisters, sharing the same father, diagnosed with 46,XY complete gonadal dysgenesis. The first sister developed a gonadoblastoma and an invasive dysgerminoma, whereas the second sister developed a gonadoblastoma and an invasive choriocarcinoma within the same gonad. No *SRY* mutation, chromosome abnormalities or mosaicism were detected in blood. SNP profiling of the choriocarcinoma revealed a complex hyperdiploid pattern with gains of 1 to 4 copies of material from several autosomes, as well as the loss of the Y chromosome and a homozygous SNP profile without copy number change for the X chromosome. Our results are in agreement with the recurrent chromosome gains and losses previously published in germ cell tumors, and the co-existence of both tumors within the same gonad suggests that choriocarcinomas may derive from gonadoblastomas.

Key words: choriocarcinoma, dysgerminoma, familial XY gonadal dysgenesis, gonadoblastoma, SNP profiling

INTRODUCTION

XY gonadal dysgenesis is a heterogeneous condition that includes complete gonadal dysgenesis (Swyer syndrome or XY sex reversal), partial gonadal dysgenesis (sexual ambiguity), and mixed gonadal dysgenesis. Patients with complete or partial XY gonadal dysgenesis present with female external genitalia, streak gonads, and Müllerian ducts [1]. Germ cell tumors occur in approximately 30% of cases [2]; prophylactic gonadectomy is suggested in these patients.

Deletions or mutations of *SRY* can be found in approximately 25% of patients with gonadal dysgenesis [3]. Duplications of *DAX1* in Xp21.2 [4] and deletions of the terminal 9p region (including *DMRT* genes) [5] have also been implicated in a small number of patients with isolated gonadal dysgenesis.

Gonadoblastomas, first described by Scully [6] in 1953, are rare type II germ cell tumors (type II GCTs) that arise almost exclusively in patients with 46,XY gonadal dysgenesis. They are composed of well-formed nests of germ cells admixed with sex-cord derivatives resembling immature Sertoli or granulosa cells. Although considered benign, patients with such tumors are at an increased risk of developing malignant germ cell tumors. Of the latter, the seminomatous (SE) type II GCT dysgerminomas are by far the most frequent, being associated with 50% of gonadoblastomas [7]. Nonseminomatous (NS) type II GCTs such as embryonal carcinomas, yolk sac tumors or choriocarcinomas, can also arise from gonadoblastomas in up to 8% of cases [7, 8].

In this report, we document for the first time the co-existence of a choriocarcinoma and a gonadoblastoma in the same gonad from one of two half-sisters with 46,XY complete gonadal dysgenesis. Also, we performed the first high resolution SNP genomic profiling on a choriocarcinoma.

CASE REPORT

Proband 1 is a young woman who presented with a large abdominal mass at the age of 11. She had normal external female genitalia and a normal prepubertal uterus. Her karyotype was found to be 46,XY. Biopsy of the abdominal mass was consistent with a stage III dysgerminoma of gonadal origin, and she underwent tumor resection with bilateral salpingo-oophorectomy. Histological examination of the gonads confirmed the presence of streak gonads associated with dysgerminoma and the patient was diagnosed with 46,XY complete gonadal dysgenesis. She then received three rounds of chemotherapy and hormones to induce puberty. She is now 21 years old and has no sign of disease recurrence.

Proband 2 is the younger half-sister of proband 1, born after their father remarried. At the age of 12, 8 years after her half-sister was diagnosed, she presented with a voluminous and inoperable pelvic mass infiltrating the sigmoid colon and rectum. She had normal female genitalia, scarce pubic hair and no axillary hair, and had experienced two episodes of menses. Cytogenetic analyses revealed that she also had a 46,XY karyotype. After a first round of chemotherapy, she underwent bilateral salpingo-oophorectomy and left hemicolectomy. The left gonad was completely replaced by a largely necrotic tumor invading the bowel wall, while the right gonad contained a calcified nodule. She was diagnosed with 46,XY complete gonadal dysgenesis and underwent a second round of chemotherapy. She developed local tumoral recurrence as well as metastatic disease of the lungs and liver. She received a bone marrow transplant and underwent chemotherapy again, but died 19 months following her initial diagnosis, at the age of 14.

MATERIALS AND METHODS

For routine histological examination, selected samples from both sisters were fixed in formaldehyde and embedded in paraffin. 3 µm-thick sections were stained with hematoxylin-phloxine-saffron (HPS). Immunohistochemical evaluation was performed, including the following antigens: placental alkaline phosphatase (PLAP) (Dako, Globstrup,

Denmark), CD 117 (ID Labs TM Inc., London, Ontario, Canada), human placental lactogen (HPL) (Dako), cytokeratin 7 (CKN7) (Dako), alpha-fœtoprotein (Dako), beta-human chorionic gonadotropin (b-HCG) (Dako), carcinoembryonic antigen (CEA) (Lab Vision, Fremont, CA, USA), glial fibrillary acidic protein (GFAP) (Dako), cytokeratin AE1/AE3 (CKN) (Dako), CD 30 (Dako), and epithelial membrane antigen (EMA) (Dako). Briefly, deparaffinized and rehydrated sections were treated using a pressure cooker (citrate buffer, pH6, 1:10) for antigen retrieval. Then the sections were mounted in the DAKO autostainer, covered with H₂O₂ for 5 minutes. Following a 5 minutes application of Ultra V block (Lab Vision), the slides were incubated for 60 minutes with the diluted antibody. This step was followed by application of the labelled streptavidin-biotin method according to the manufacturer's instructions (LSAB System HRP Kit; Dako). Diaminobenzidine (DAB) (Dako) was used as a chromogen.

Karyotypic analyses were performed on peripheral blood lymphocytes after standard GTG-banding. 75 (proband 1) and 100 (proband 2) cells were analysed. Fluorescence in situ hybridization was also performed on 220 (proband 1) and 115 (proband 2) additional cells, using the CEPX/LSI SRY probe (Vysis, Downers Grove, IL, USA), as well as bacterial artificial chromosome RP11-143M15 and RP11-153D5 (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) covering a part of the 9p24.3 (*DMRT*) and Xp21.2 (*DAXI*) regions.

A mouth-swab specimen from proband 2 was sent to an independent diagnostic laboratory for complete bi-directional sequence analysis of the entire coding sequence of the *SRY* gene. Unfortunately, DNA from proband 1 was not available. High-resolution SNP genomic profiling was also performed on a frozen specimen of the choriocarcinoma (metastases in the liver) of proband 2. Validity of the tumor specimen was assessed by a hematoxylin-eosin stained frozen section. A high-resolution genomic profiling of chromosomal aberrations was performed on DNA extracted from the liver metastases using the Infinium Sentrix Human-1 Genotyping BeadChip containing over 109,000 exon-centric

SNPs (Illumina, San Diego, CA, USA) [9]. No other tumor specimen, in either sisters, was well enough preserved to allow further analysis. This study was approved by the Ethics Board of our institution, and an informed consent was obtained from both probands.

RESULTS

For proband 1, the left gonad was totally replaced by a voluminous mass measuring 18x18x11.5cm. Weight of this mass was 2200g. The right gonad contained a yellow-white to tan nodule measuring 9x8x4cm. Weight of the gonad with nodule was 241.3g. Other identical nodules were observed in retroperitoneal and in the epiplon. These masses did not show any haemorrhage or necrosis. Microscopic examination of the right gonad revealed that the nodule consisted of nests of epithelioid-shaped proliferative cells with a monotonous appearance separated by a fibrous stroma. Cells were atypical with a pale cytoplasm and a regular nucleus. There was a mild chronic inflammatory infiltrate. This was consistent with a dysgerminoma (Fig. 1A). Moreover, space areas of gonadoblastoma were identified, consisting of nests of germ and sex cord derivatives cells, and surrounded by fibrous tissue (Fig. 1B). The histopathological appearance of the nodules found in the retroperitoneal and epiplon was the same. Microscopic examination of the left gonad revealed that the ovarian stroma was totally replaced by a dysgerminoma.

Tumoral cells were positive for PLAP and CD 117, but negative for HPL, CKN7, CEA, GFAP, alpha-fœtoprotein, and beta-HCG. There was no evidence of embryonal carcinoma or yolk sac tumors.

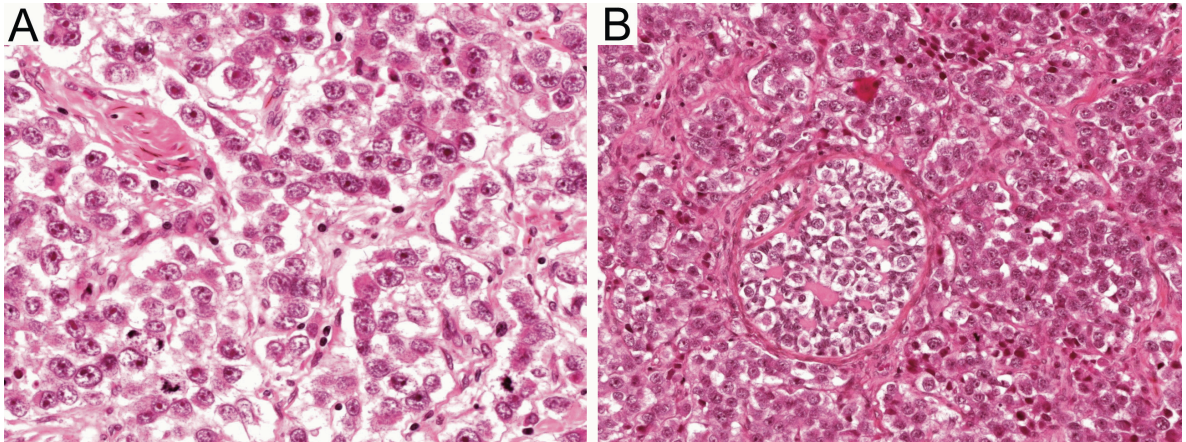


Figure 1. Microscopical appearance of the right gonad of proband 1 showing (A) the epithelioid-shaped proliferative cells with a monotonous appearance characteristic of a dysgerminoma (hematoxylin-phloxine-saffron [HPS], original magnification x400) and (B) a nest of gonadoblastoma within the dysgerminoma (HPS, original magnification x250).

Macroscopically, the left gonad of proband 2 was completely replaced by a largely necrotic tumor measuring 11 X 9.5 X 5.0 cm and invading the bowel wall. The right gonad measured 3.5 X 2.5 X 1.5 cm and contained a calcified nodule. The fallopian tubes were uninvolved. Microscopic examination of the left gonad revealed that the tumor mass was severely necrotic. At the periphery of the tumor, a streak gonad harboring viable gonadoblastoma was found. The latter consisted of well-formed nests of germ cells admixed with immature Sertoli and granulosa cells modified by calcification and hyalinization (Fig. 2A, B). The stroma surrounding the tumor nests was of ovarian-type. Adjacent to the gonadoblastoma, malignant trophoblastic cells of cytotrophoblastic and syncytiotrophoblastic appearance, characteristic of choriocarcinoma, were found (Fig. 2A). No evidence of dysgerminoma was found. The malignant germ cell neoplasm had also infiltrated the muscularis propria of the bowel wall. As for the right gonad, microscopic examination revealed that it was completely replaced by a gonadoblastoma. No malignant germ cell tumor was found.

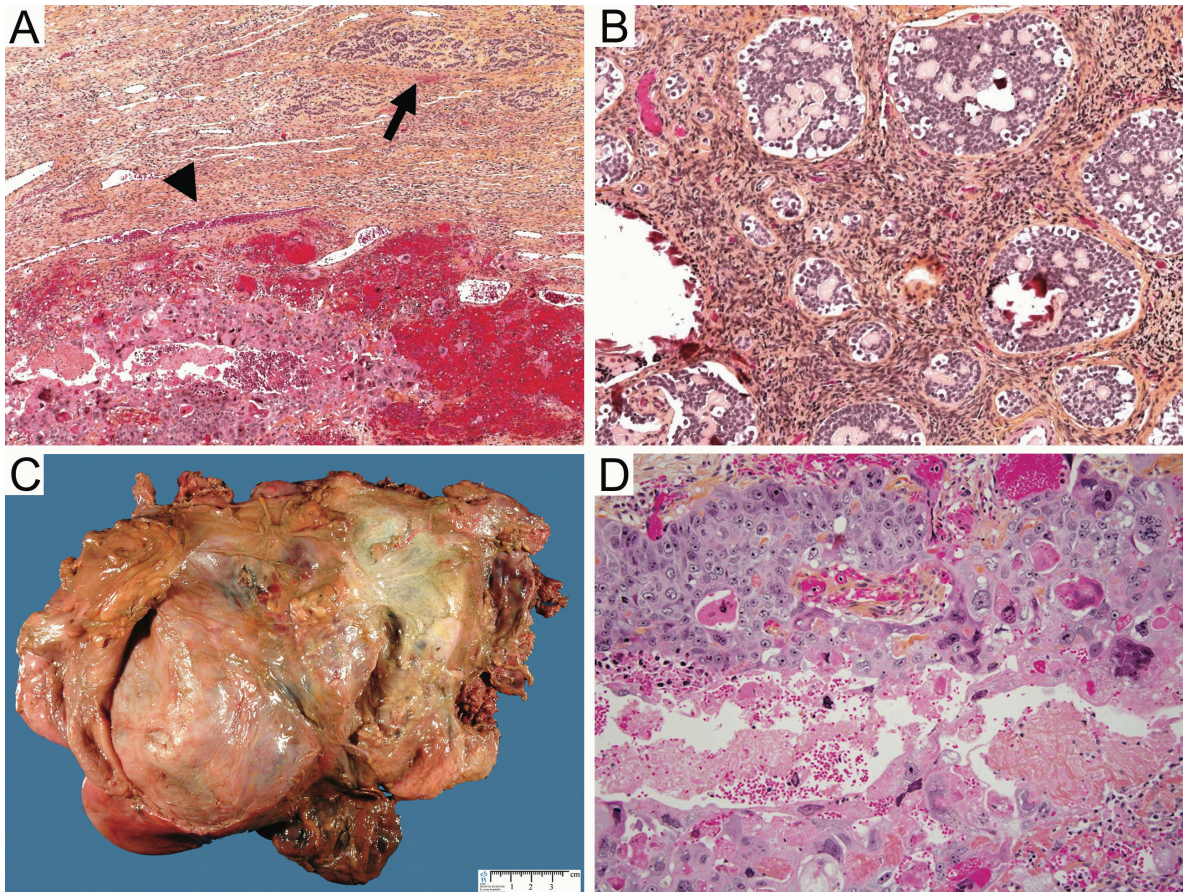


Figure 2. Microscopical appearance of the left gonad of proband 2 showing (A) the adjacent gonadoblastoma (arrow) and choriocarcinoma (arrowhead) (hematoxylin-phloxine-saffron [HPS], original magnification x50), and (B) nests of germ cells admixed with immature Sertoli and granulosa cells modified by calcification and hyalinization of the gonadoblastoma (HPS, original magnification x200). The necrotic pelvic mass found in the abdominal cavity is shown in (C) along with (D) the malignant trophoblastic cells of cytotrophoblastic and syncytiotrophoblastic appearance characteristic of a choriocarcinoma (HPS, original magnification x400).

Despite a second bout of aggressive chemotherapy, the patient died 19 months following her initial diagnosis. At autopsy, which was restricted to the abdominal cavity, a necrotic pelvic mass (Fig. 2C) weighing 1542g, as well as liver and splenic metastases of choriocarcinoma (Fig. 2D) were found. The metastatic tumor cells of the liver showed

strong cytoplasmic staining for beta-HCG and CKN, and cell membrane staining for EMA, and were negative for PLAP, CD 117, and inhibin.

Cytogenetic analyses in blood lymphocytes in both probands did not revealed any chromosomal abnormalities, cryptic deletion of the 9p24.3 region containing the *DMRT* genes, or cryptic duplication of the Xp21.2 region containing the *DAX1* gene. The *SRY* probe was present on the Y chromosome in both probands, and no mutation of the *SRY* gene was found in proband 2. No 45,X mosaicism was found in either probands.

The DNA extracted from the tumoral sample of proband 2 was studied after PCR amplification and hybridization on a 109,000 SNP-microarray (Sentrix Human-1) provided by an Illumina® platform. High-resolution SNP genomic profiling of the tumor demonstrated a complex hyperdiploid pattern with gains of 1 to 4 copies of material from several autosomes, at the exception of chromosomes 8, 9, 18, 20 and 22, for which no copy number changes were detected. A loss implicating the Y chromosome and a gain of the X chromosome with a homozygous SNP profile were also found (Fig. 3).

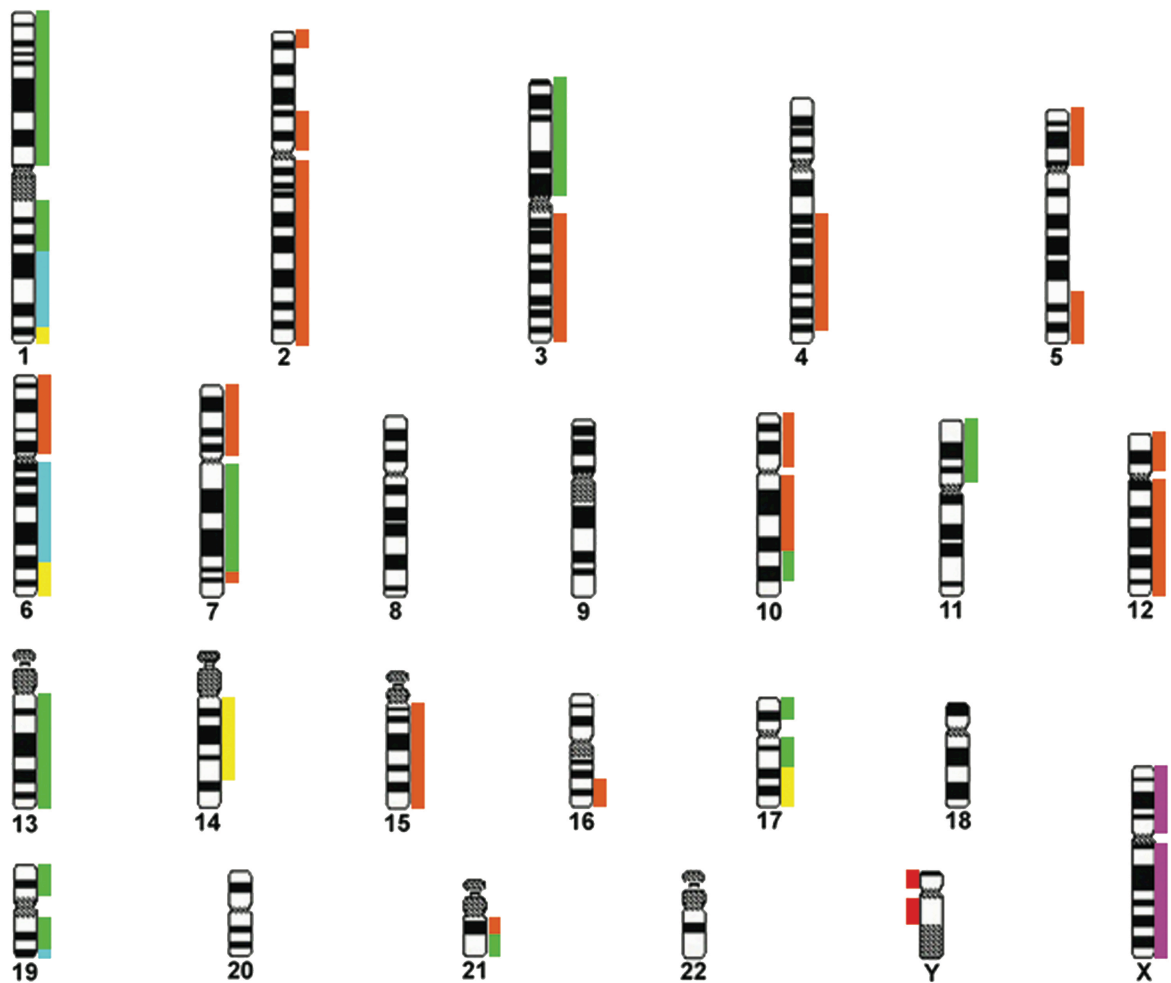


Figure 3. Schematic representation of the SNP profiling results. Red bars indicate losses of 1 copy; orange bars indicate gains of 1 copy; yellow bars indicate gains of 2 copies; green bars indicate gains of 3 copies; blue bars indicate gains of 4 copies; pink bars indicate copy neutral losses of heterozygosity.

DISCUSSION

Choriocarcinoma in association with gonadoblastoma has rarely been described in dysgenetic gonads of 46,XY females. Two cases have been reported so far, where the choriocarcinoma and gonadoblastoma were found in opposite gonads of 46,XY females with gonadal dysgenesis [10, 11]. A third case of choriocarcinoma admixed with malignant teratoma in a dysgenetic gonad, in the absence of gonadoblastoma, has also been described

[12]. We report here for the first time the presence of a choriocarcinoma and a gonadoblastoma in the same dysgenetic gonad in a 46,XY female. SNP profiling of liver metastases arising from the choriocarcinoma revealed a complex hyperdiploid pattern with multiple autosomal gains and losses, as well as the loss of the Y chromosome and a homozygous SNP profile suggesting a duplication of the remaining X chromosome (copy neutral loss of heterozygosity).

To our knowledge, identification of chromosomal abnormalities and/or copy number changes has never been attempted on cases of gonadal choriocarcinoma. However, a comparison with the cytogenetic abnormalities reported in series of NS type II GCTs can be made. The most cited recurrent chromosome anomaly is the gain of a short arm of chromosome 12, mostly as an isochromosome [i(12p)], although gains of complete chromosome 12 are also reported [13-15]. The i(12p) is thought to promote invasive growth of cancer cells [13]. The critical region on 12p thought to be responsible for the progression of type II GCTs, 12p11.2-p12.1, contains multiple candidate genes [13, 14]. Losses of the Y chromosome and gains of material from chromosomes 1, 2p/2q, 6q, 7, 13q, 17, 21 and X are also reported in NS type II GCTs [14, 15], which is consistent with our analysis. Gains of material from chromosomes 2 and X may be of particular interest for the development of these tumors, since two genes from the *MYC* pathway, *NMYC* and *CDCA7*, are found in 2p24.1 and 2q31 respectively, whereas Klinefelter patients are at increased risk of having GCTs [14, 15]. On the other hand, the gains of 4q, 5p/5q and 11p found in our SNP analysis are usually reported as losses in the literature on NS type II GCTs [14], although they have been shown as gains in some instances [15]. Additionally, no copy number changes on chromosomes 8 and 18 were observed in our tumor specimen, although these regions are often gained and lost, respectively, in NS type II GCTs [14].

Gonadoblastomas are thought to be precursor lesions giving rise to type II GCTs in dysgenetic gonads [13]. Furthermore, both SE and NS subtypes of type II GCTs are thought to have a similar genetic pathogenesis [14, 15]. Therefore, one can hypothesize that the gonadoblastoma observed in proband 2 might have given rise to her choriocarcinoma [7, 8, 15], suggesting that precursor lesions can be genetically unstable.

As the two siblings who presented with 46,XY complete gonadal dysgenesis shared the same father, we suspected that the Y chromosome was implicated in their sex reversal. However, no cytogenetic abnormality of the Y chromosome was detected in either proband, and no mutation of the *SRY* gene was found in proband 2. Although it seems likely that a *SRY* mutation is not the cause for the similar phenotype observed in proband 1, we cannot rule it out as no constitutional DNA was available to perform mutation analysis. FISH analyses, performed prior to the discovery that the two patients shared the same father, excluded cryptic rearrangements of *DAX1* and *DMRT* genes, in Xp21.2 and 9p24.3 respectively, in both probands.

At the present time, the exact cause of the 46,XY complete gonadal dysgenesis found in the two half-sisters remains unknown, as in most XY females. Schmitt-Ney and colleagues [16] reported a familial case very similar to ours, where two sisters and one of their half-sisters had 46,XY gonadal dysgenesis. However, their father was shown to have gonadic mosaicism for a novel *SRY* mutation that he transmitted to three of his four children (the fourth child was found to be a normal 46,XX female) [16].

In conclusion, the SNP array analysis performed in this paper has confirmed that many of the recurrent chromosome gains and losses reported in NS type II GCTs are also found in our patient's choriocarcinoma. Furthermore, the co-existence of both a gonadoblastoma and a choriocarcinoma within the same gonad in this patient suggests that gonadoblastomas are genetically unstable and can give rise to NS type II GCTs such as choriocarcinomas. Finally, whatever the cause of sex reversal in these two half-sisters may be, the present case report strongly argues in favor of bilateral gonadectomy in patients with 46,XY gonadal dysgenesis and familial screening of all phenotypic female siblings.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Stéphane Dédelis for the photographic work, Chantal Bernard for her help with the histological examination, and Niang Ching and Alexandre Montpetit (Génome Québec) for the high-resolution SNP genomic profiling.

REFERENCES

1. Forest MG. Diagnosis and Treatment of Disorders of Sexual Development. In: DeGroot LJ, Jameson JL, eds. *Endocrinology*, 5th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006;2779-2829.
2. Cools M, Stoop H, Kersemaekers AF, et al. Gonadoblastoma arising in undifferentiated gonadal tissue within dysgenetic gonads. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:2404-2413.
3. Scherer G, Held M, Erdel M, et al. Three novel SRY mutations in XY gonadal dysgenesis and the enigma of XY gonadal dysgenesis cases without SRY mutations. *Cytogenet Cell Genet* 1998;80:188-192.
4. Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, et al. A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nature Genet* 1994;7:497-501.
5. McDonald MT, Flejter W, Sheldon S, Putzi MJ, Gorski JL. XY sex reversal and gonadal dysgenesis due to 9p24 monosomy. *Am J Med Genet* 1997;73:321-326.
6. Scully RE. Gonadoblastoma. A gonadal tumor related to the dysgerminoma (seminoma) and capable of sex-hormone production. *Cancer* 1953;15:445-463.
7. Talerman A, Schwartz P. Mixed germ cell-sex cord-stromal tumours. In: Tavassoli FA, Devilee P, eds. *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of the Breast and Female Genital Organs*. Lyon: IARC Press, 2003;176-179.
8. Scully RE. Gonadoblastoma. A review of 74 cases. *Cancer* 1970; 25:1340–1356.
9. Peiffer DA, Le JM, Steemers FJ, et al. High-resolution genomic profiling of chromosomal aberrations using Infinium whole-genome genotyping. *Genome Res* 2006;16:1136-1148.
10. Gallager HS, Lewis RP. Sequential gonadoblastoma and choriocarcinoma. *Obstet Gynecol* 1973;41:123-128.
11. Liu Y-C, Wei T-C, Hsu Y-H, Fang JS, Lee MI. Gonadoblastoma and choriocarcinoma in dysgenetic gonads : Report of a case. *J Formos Med Ass* 1995;94:568-571.
12. Seraj IM, Chase DR, Chase RL, King A, Jacones A. Malignant teratoma arising in a dysgenetic gonad. *Gynecol Oncol* 1993;50:254-258.

13. Looijenga LHJ, Gillis ADJM, Stoop HJ, et al. Chromosomes and expression in human testicular germ-cell tumors. Insight into their cell of origin and pathogenesis. *Ann NY Acad Sci* 2007;1120:187-214.
14. McIntyre A, Summersgill B, Lu YJ, et al. Genomic copy number and expression patterns in testicular germ cell tumours. *Br J Cancer* 2007;97:1717-1712.
15. Summersgill B, Goker H, Weber-Hall S, et al. Molecular cytogenetic analysis of adult testicular germ cell tumours and identification of regions of consensus copy number change. *Br J Cancer* 1998;77:305-313.
16. Schmitt-Ney M, Thiele H, Kaltwaber P, Bardoni B, Cisternino M, Scherer G. Two novel *SRY* missense mutations reducing DNA binding identified in XY females and their mosaic fathers. *Am J Hum Genet* 1995;56:862-869.

Article 5 - *Accepté avec corrections mineures pour publication dans Pediatric and Developmental Pathology.*

Undifferentiated gonadal tissue, Y chromosome instability and gonadal tumors in XY gonadal dysgenesis.

Mélanie Beaulieu Bergeron^{1,2,3}, Nicole Lemieux^{1,2,3} and Pierre Brochu²

¹Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

²Département de pathologie, ³Centre de recherche, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada

Corresponding author: Pierre Brochu, M.D.
Département de pathologie
Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine

Abstract

Patients with XY gonadal dysgenesis are at increased risk of developing gonadal tumors. The etiology of several cases of XY gonadal dysgenesis remains unknown, but X/XY gonadal mosaicism has been hypothesized to play a role. At the histological level, presence of persistent primitive sex cords containing immature germ cells in dysgenetic gonads (an entity called undifferentiated gonadal tissue or UGT) was recently described, and these immature germ cells are thought to be at risk of neoplastic transformation. To further investigate these aspects, we retrospectively studied the gonads from 30 patients with pure (22) and mixed (8) gonadal dysgenesis. Cytogenetic analyses performed on 35 gonads revealed that structurally abnormal Y chromosomes were lost in a majority of cells from the gonads, explaining the gonadal dysgenesis of patients bearing a rearranged Y chromosome. On the other hand, normal Y chromosomes were less often lost in gonads of patients with gonadal dysgenesis. At the histological level, 43 of the 51 gonads presented areas characteristic of a streak; 13 of these streak gonads also presented areas of UGT. Structures resembling sex cords but without germ cells were found in some of the streaks not containing UGT, suggesting that UGT was initially present. Of the 13 gonads containing both UGT and a streak, 9 developed a tumor. The proximity of UGT with the tumors as well as the immunostaining patterns (PLAP+, OCT3/4+, and CD117/KIT+) suggests that germ cells found in UGT are a risk factor for gonadal tumors.

Key words: XY gonadal dysgenesis - gonadoblastoma - dysgerminoma - gonadal tumors - undifferentiated gonadal tissue - XY gonadal mosaicism

Introduction

Sexual development and differentiation are very complex processes regulated by gene expression and hormone secretions. Both processes can be disrupted in many ways, giving rise to disorders of sex development (DSD) in either a XX or XY constitution. Two of the most frequent DSD are pure (complete) gonadal dysgenesis and mixed gonadal dysgenesis. Pure gonadal dysgenesis is defined by the presence of bilateral streak gonads, Müllerian structures such as Fallopian tubes and a uterus, and the absence of well-differentiated Wolffian ducts [1]. In addition to *SRY* mutations or deletions [2,3], duplications of *NROB1* (*DAX1*) in Xp21.2 [4] and *WNT4* duplications in 1p36.12 [5] have been reported in some XY patients with a DSD. Moreover, deletions of *DMRT* genes, in 9p24.3 [6,7] have also been suggested to cause rare cases of XY pure gonadal dysgenesis. 45,X/46,XY gonadal mosaicism has been hypothesized to be implicated, especially in cases of a structurally abnormal Y chromosome [1]. However, gonads are rarely studied cytogenetically and published series usually involve few patients [8-20]. The etiology of pure gonadal dysgenesis thus remains unknown in a vast majority of patients.

As for mixed gonadal dysgenesis, also known as asymmetrical gonadal dysgenesis, it is characterized by the presence of a dysgenetic testis and a contralateral streak gonad in variable combinations or no contralateral gonad at all [21,22]; both Müllerian and Wolffian ducts derivatives are present. Bilateral dysgenetic testes can also be found in rare cases [1]. External genitalia are often asymmetric since only one testis is often descended in the scrotum or palpable in the inguinal area. In most cases, a 45,X/46,XY mosaic karyotype is found [1,23].

Gonadal tumors, mostly gonadoblastomas, are seen in approximately 30% of patients with pure gonadal dysgenesis [24] and 15% of patients with mixed gonadal dysgenesis [25]. Gonadoblastoma, although benign, is at increased risk of giving rise to malignant tumors in 60% of cases; of these malignant tumors, dysgerminoma is found in over 80% of instances [26]. The extremely rare occurrence of gonadoblastoma in patients with dysgenetic gonads without Y chromosomal material has led to the suggestion that a

Y chromosome gene, referred to as *GBY* (gonadoblastoma locus on the Y chromosome), may be involved in the neoplastic transformation of dysgenetic gonads [27]. The main candidate for this locus, *TSPY*, has numerous repeats on the short arm of the Y chromosome, in Yp11.2 [28-31], and is thought to play a role in mitotic proliferation of spermatogonia [31-33]. Recent work suggests that germ cell tumors arise from primordial germ cells with high levels of TSPY proteins and prolonged expression of *OCT3/4* within the dysgenetic gonads [25,34,35]. Cools et al. [35] also recently described a new pattern of gonadal differentiation in dysgenetic gonads of both pure and mixed gonadal dysgenesis: undifferentiated gonadal tissue (UGT). In contrast to streak gonads, UGT contains germ cells distributed randomly within the gonad or found in clusters with pre-Sertoli/granulosa cells, but not organized in either seminiferous tubules or primordial follicles. This new pattern can be present in specific zones of dysgenetic gonads and is in association with other differentiation patterns (streak or testis) in the same gonad [36]. According to the model proposed by Cools et al. [35], germ cells abnormally expressing *TSPY* and *OCT3/4* in UGT either die (the gonad thus ending in a streak) or evolve into a gonadoblastoma.

Given this new data and model, we sought to study the gonads of 30 patients with XY gonadal dysgenesis: 22 females with pure gonadal dysgenesis, as well as 2 females, 4 males and 2 individuals with ambiguous genitalia presenting mixed gonadal dysgenesis (Table I). All patients with XY gonadal dysgenesis seen in a pediatric hospital of Montreal, the Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Sainte-Justine, between 1982 and 2009, for whom cytogenetic studies and gonadal tissue were available, were included in this study. Cases with androgen resistance were excluded.

Materials and Methods

Cytogenetics

Peripheral blood lymphocytes of all patients were prepared according to standard protocols [37], as was G-banding [38]. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was performed with one or several of the following probes, according to standard protocols

[39]: the SRY-region [SRY (Vysis, Downers Grove, IL, USA)], X centromere [CEP X (Vysis) or DXZ1 (Oncor, Gaithersburg, MD, USA)], Yq12 heterochromatin [DYZ1 (Oncor) or CEP Y Satellite III (Vysis)], Y centromere [CEP Y Alpha Satellite (Vysis) or DYZ3 (Oncor)], and a 4.5 kb Hind III fragment of the DYZ4/DYZ5 repeat locus in Yp11.2 containing the *TSPY* gene [28,30].

Paraffin-embedded gonadal tissues were analyzed for 18 patients (1, 4-10, 12, 14-17, 20, 23, 27-30) when possible (not fixed in Bouin's solution). Suspensions of nuclei were obtained from 15 µm sections of whole-mount gonads of macroscopically dissected testes or streaks using proteinase K and 30% sodium bisulfite, as previously described [40], in order to maximize the proportion of unsliced nuclei. In cases of unsuccessful hybridization, one or several of the following modifications were made: additional 15 minutes pretreatment in 2XSSC heated at 80°C, use of 0.25% pepsin instead of proteinase K, and 10 minutes denaturation in 70% formamide/2XSSC rather than on a slide baker. Fresh perigonadal tissues, mainly Fallopian tubes and meso of the streaks, were also studied (patients 6, 7, 9, 15, 23, 24, 27, 28, 30), and prepared according to standard protocols [37]. In both instances, FISH was performed with a probe recognizing the X centromere in combination with a probe specific for either the Y centromere or the Yq12 heterochromatin.

Immunohistochemistry

For routine histological examination, 3-4 µm sections of paraffin-embedded gonadal tissue were stained with hematoxylin-phloxin-saffron (HPS). Immunohistochemical evaluation was performed when possible with the following antigens: anti-Müllerian hormone (AMH 1/20; AbD Serotec, Raleigh, NC, USA), placental alkaline phosphatase (PLAP 1/50; Dako, Globstrup, Denmark), CD117 (also known as KIT 1/50; ID Labs TM Inc., London, ON, Canada), cytokeratin AE1/AE3 (1/50; Dako), OCT3/4 [also known as POU5F1 (POU class 5 homeobox 1) 1/50; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA], and inhibin (1/100; AbD Serotec). Antigen retrieval was performed by treating the deparaffinized and rehydrated sections in a Ventana autostainer using the Tris buffer provided by Ventana Medical Systems (Tucson, AZ, USA). Sections were then covered

with H₂O₂ for 5 minutes and incubated for 60 minutes with the diluted antibody. Detection was performed with the *ultraView* Universal DAB Detection Kit (Ventana) according to the manufacturer's instructions.

Results

Cytogenetics

Among the 30 patients, 14 were found to have a structurally abnormal Y chromosome (Table I): 12 patients (1-12) had an isodicentric Y chromosome [*idic*(Y)], one had an unbalanced X;Y translocation [*t*(X;Y)] (patient 13), and another had a ring Y chromosome [*r*(Y)] (patient 14). In 13 of these 14 patients, the breakpoint did not lead to loss of the *SRY* region, as shown by FISH; furthermore, all these patients were *TSPY*⁺. As for patient 2, although she was *SRY*⁻, FISH with a probe specific to the Yp11.2 region containing *TSPY* revealed that this region was still present on the rearranged Y chromosome.

The remaining 16 patients were found to have a normal Y chromosome by G-banding (Table I). Hybridization with the *SRY*-region probe was performed in 11 cases, which were all found to be positive. The other 5 patients (21, 22, 24-26) were not tested due to lack of material. However, three of them exhibited a male phenotype, indicating that the *SRY* was present in these patients.

Table I Overview of patients and histology of their gonads, as well as combined cytogenetics results on blood, gonads and/or adnexa when available.

Case	Sex/ Age at surgery	Karyotype			Histology of gonads			Tumors and other descriptions	Type of gonadal dysgenesis
		Blood	Left gonad or adnexa	Right gonad or adnexa	Testis	Streak	UGT		
1 ^a (D7)	F 19 y	45,X[90]/ 46,X,indic(Y)[57]/ 46,X,del(Y)[2]	45,X[31]/ 46,X,del(Y)[16]/ 46,X,indic(Y)[4]	45,X[65]/ 46,X,del(Y)[13]/ 46,X,indic(Y)[1]		L;R	L	Left GB with early DG	Pure
2 ^a (D9)	F 22 y	46,X,indic(Y)[134]/ 45,X[40]	--	--		L; R		Left burned-out GB Few calcifications on the right	Pure
3 ^a (D4)	F 17 y	45,X[45]/ 46,X,indic(Y)[30]	--	--		L; R	L	Left GB	Pure
4 ^a (D6)	A (F) 2 m	46,X,indic(Y)[192]/ 45,X[138]/ 46,X,del(Y)[22]	45,X[25]	45,X[20]/ 46,X,indic(Y)[5]	R		R	No left gonad found; bilateral Fallopian tubes	Mixed
5 ^a (D5)	F 53 y	45,X[298]/ 46,X,indic(Y)[164]	45,X[42]/46,X,indic(Y)[3]			U		Only one gonad found	Pure
6 ^b (6)	F 3 ^{6/12} y	46,X,indic(Y)[183]	45,X[152]/ 46,X,indic(Y)[26]/ 46,X,del(Y)[5]	45,X[218]/ 46,X,indic(Y)[46]/ 46,X,del(Y)[6]		L; R			Pure
7 ^a (D8) ^b (10)	F 5 y	46,X,indic(Y)[226]/ 45,X[21]/ 47,X,indic(Y)x2[3]	45,X[308]/ 46,X,indic(Y)[69]	--		L	L	Left GB; histology of right gonad unavailable	Pure
8	F 19 y	46,X,indic(Y)[139]/ 45,X[36]	45,X[21]/ 46,X,del(Y)[12]/ 46,X,indic(Y)[6]	45,X[62]/ 46,X,indic(Y)[27]/ 46,X,del(Y)[1]		L; R	R	Right GB	Pure
9 ^b (7)	F 18 y	45,X[160]/ 46,X,indic(Y)[72]	45,X[352]/ 46,X,indic(Y)[47]/ 46,X,del(Y)[5]	45,X[80]/ 46,X,indic(Y)[14]/ 46,X,del(Y)[6]		L; R			Pure
10	F 17 y	45,X[138]/ 46,X,indic(Y)[37]	45,X[23]/ 46,X,indic(Y)[9]/ 46,X,del(Y)[8]	45,X[20]/ 46,X,indic(Y)[9]/ 46,X,del(Y)[6]		L; R			Pure
11	M 15 m	45,X[125]/ 46,X,indic(Y)[51]/ 47,X,indic(Y)x2[1]	--	--	L; R	R	R	Right testis-streak with right Fallopian tube Left dysgenetic testis (Bx)	Mixed

Table I (continued) Overview of patients and histology of their gonads, as well as combined cytogenetics results on blood, gonads and/or adnexa when available.

Case	Sex/ Age at surgery	Karyotype			Histology of gonads			Tumors and other descriptions	Type of gonadal dysgenesis
		Blood	Left gonad or adnexa	Right gonad or adnexa	Testis	Streak	UGT		
12 ^b (4)	A (M) 26 m	46,XX[274]/ 47,XX,idel(Y)[108]	46,XX[125]/ 47,XX,idel(Y)[25]	--	L			No right gonad found; left dysgenetic testis (Bx). Left testis removed 1 year later.	Mixed with ovotestis
13	F 17 m	46,X,der(Y)t(X;Y)[36]	--	--		L; R	R	Few calcifications on the right	Pure
14	F 10 y	45,X[92]/ 47,X,r(Y),+r2(Y)[29]/ 46,X,r2(Y)[4]/ 46,X,r(Y)[3]/ 48,X,r(Y),+r2(Y)x2[1]/ 47,X,r(Y)x2[1]	45,X[55]/46,X,r(Y)[8]/ 47,X,r(Y),r2(Y)[2]	45,X[46]/46,X,r(Y)[3]/ 47,X,r(Y),r2(Y)[2]		L; R			Pure
15	F 18 y	46,XY[228]/45,X[3]	46,XY[130]/45,X[55]	--		L		Many sclerotic nests and few calcifications on the left Right DG	Pure
16	F 18 y	46,XY[256]	46,XY[135]/45,X[15]	46,XY[153]/45,X[32]		L; R		Leydig cells nodular hyperplasia with serous cysts on both sides	Pure
17	F 18 y	46,XY[70]	46,XY[35]/45,X[5]			U		Only one gonad found	Pure
18 [*] ^c (1)	F 11 y	46,XY[100]	--	--		R	R	Bilateral GB + DG	Pure
19 [*] ^c (2)	F 12 y	46,XY[103]	--	--		L; R	L; R	Bilateral GB Right CHC	Pure
20	F 3 y	46,XY[49]	46,XY[132]/45,X[119]	46,XY[236]/45,X[164]	L; R	R		Right Fallopian tube Right testis-streak; left normal testis	Mixed
21	F 16 y	46,XY[35]	--	--		L; R			Pure

Table I (continued) Overview of patients and histology of their gonads, as well as combined cytogenetics results on blood, gonads and/or adnexa when available.

Case	Sex/ Age at surgery	Karyotype			Histology of gonads			Tumors and other descriptions	Type of gonadal dysgenesis
		Blood	Left gonad or adnexa	Right gonad or adnexa	Testis	Streak	UGT		
22	M 3 y	46,XY[20]	--	--		L		Right testis in scrotum Left Fallopian tube with mesonephric tubules	Mixed
23	F 3 ^{6/12} y	46,XY[521]/45,X[101]	45,X[398]/46,XY[104]/ 46,XX[32]/ 48,XXYY[11]	45,X[75]/46,XY[23]		L; R			Pure
24	F 3 m	45,X/46,XY	45,X	46,XY	R	L	L; R	Florid hyperplasia of germ cells in left UGT	Mixed
25	M 18 m	46,XY[85]/45,X[40]	--	--	L	R		Uterus Biopsy of left testis	Mixed
26	M 19 m	45,X[30]/46,XY[14]	--	--		R	R	Left testis in scrotum Uterus and vagina; right Fallopian tube	Mixed
27*	F 14 y	46,XY[30]	46,XY[381]/45,X[19]	48,XXYY[171]/ 46,XY[110]/45,X[10]		L;R	R	Right GB + DG	Pure
28*	F 16 y	46,XY[140]	46,XY[283]/45,X[13]/ 47,XXYY[4]	46,XY[286]/45,X[9]/ 47,XXYY[5]		L; R			Pure
29	F 17 y	46,XY[100]	46,XY[91]/45,X[9]	46,XY[92]/45,X[8]		R	R	No left gonad found Right GB + DG	Pure
30	F 23 y	46,XY[30]	46,XY[196]/45,X[8]/ 48,XXYY[6]/ 47,XXY[4]	46,XY[91]/48,XXY[9]/ 47,XXY[5]/47,XXYY[1]		L		No right gonad found	Pure

F: female; M: male; A: ambiguous genitalia; y: years; m: months; L: left gonad; R: right gonad; U: unspecified side;

UGT: undifferentiated gonadal tissue; GB: gonadoblastoma; DG; dysgerminoma; CHC: choriocarcinoma; Bx: biopsy

* Sisters (18&19 and 27&28); Patients also described by ^a [40] (patients D4-D9); ^b [46] (patients 4, 6, 7, 10); ^c [47] (patients 1, 2).

Except for patient 13, all patients with a rearranged Y chromosome were found to have extensive mosaicism in their blood and/or gonads. Among the 11 individuals with female or ambiguous genitalia and an idic(Y), 9 (patients 1, 4-10, 12) lost the idic(Y) in a majority of their gonadal cells, as well as the female (patient 14) who lost her r(Y). As streak gonads were found in 8 of these 10 patients, gonadal mosaicism is a probable cause for their sex development disorder. Patient 4, also bearing an idic(Y), was found to have a dysgenetic testis with UGT in spite of a predominant 45,X cell line in that gonad. Patients 3 and 11 also had a predominant 45,X cell line following the loss of their idic(Y) in blood lymphocytes; unfortunately, their gonads could not be studied. This was especially puzzling for patient 11 as he had a male phenotype, with mixed gonadal dysgenesis. Patient 12 with ambiguous genitalia was found to have only one gonad, containing both dysgenetic testicular tissue and ovarian tissue, which is consistent with the presence of a 46,XX cell line in both his gonad and blood. Furthermore, the female phenotype of patient 2, who bore an idic(Y) in most of her blood lymphocytes, is explained by the absence of *SRY* on her rearranged Y chromosome [40]. As for patient 13, her unbalanced t(X;Y) lead to an Xp disomy involving duplication of *NROB1*, which is known to cause XY DSD [4].

On the other hand, as seen in table I, patients with a normal Y chromosome less often have significant blood or gonadal mosaicism. In fact, in our study, most patients with mosaicism present a 45,X cell line in 15% or less of their blood lymphocytes or gonadal cells, except for patients 15, 20, 23, 25, and 26 who had a 45,X cell line in 30-76% of their cells (blood or gonads). In the 8 patients (6, 7, 9, 15, 23, 27, 28, 30) for whom both fresh and fixed gonadal tissue or adnexa could be studied, similar proportions of cells containing a Y chromosome were found in both instances (Table II).

Table II Comparison of cytogenetics results obtained on fresh and fixed gonads or adnexa.

Case	Blood	Left gonad or adnexa		Right gonad or adnexa	
		Fresh	Fixed	Fresh	Fixed
6 ^b (6)	46,X,idic(Y)[183]	45,X[122]/	45,X[30]/	45,X[169]/	45,X[49]/
		46,X,idic(Y)[19]/	46,X,idic(Y)[7]/	46,X,idic(Y)[30]/	46,X,idic(Y)[16]/
		46,X,del(Y)[1]	46,X,del(Y)[4]	46,X,del(Y)[1]	46,X,del(Y)[5]
7 ^a (D8) ^b (10)	46,X,idic(Y)[226]/ 45,X[21]	45,X[158]/	45,X[150]/	--	--
		46,X,idic(Y)[39]	46,X,idic(Y)[30]		
9 ^b (7)	46,X,idic(Y)[139]/ 45,X[36]	45,X[262]/	45,X[90]/	--	45,X[80]/
		46,X,idic(Y)[42]	46,X,idic(Y)[5]/ 46,X,del(Y)[5]		46,X,idic(Y)[14]/ 46,X,del(Y)[6]
15	46,XY[228]/ 45,X[3]	46,XY[17]/45,X[8]	46,XY[113]/ 45,X[47]	--	--
23	46,XY[521]/ 45,X[101]	45,X[272]/ 46,XY[80]/ 46,XX[32]/ 48,XXYY[11]	45,X[126]/ 46,XY[24]	--	45,X[75]/ 46,XY[23]
27 [*]	46,XY[30]	46,XY[200]	46,XY[181]/ 45,X[19]	48,XXYY[171]/ 46,XY[20]	46,XY[90]/ 45,X[10]
28 [*]	46,XY[140]	46,XY[196]/ 47,XXYY[4]	46,XY[87]/ 45,X[13]/	46,XY[195]/ 47,XXYY[5]	46,XY[91]/ 45,X[9]
30	46,XY[30]	46,XY[94]/ 48,XXYY[6]/ 47,XXY[4]	46,XY[102]/ 45,X[8]	46,XY[91]/ 48,XXY[9]/ 47,XXY[5]/ 47,XXYY[1]	--

* Sisters; Patients previously described by ^a [40] (patient D8); ^b [46] (patients 6, 7, 10).

Histological findings and immunohistochemistry

Gonadal tumors

Gonadoblastomas, 7 unilateral and 2 bilateral, were observed in 9 of the 30 patients. Five cases of dysgerminoma (4 unilateral and 1 bilateral) were also observed, always adjacent to gonadoblastomas, except for a dysgerminoma that was detected and removed 8 years prior to a streak gonadectomy in patient 15. Review of the slides revealed no residual gonadoblastoma in that dysgerminoma. In patient 19, a choriocarcinoma was found adjacent to a gonadoblastoma (Table I).

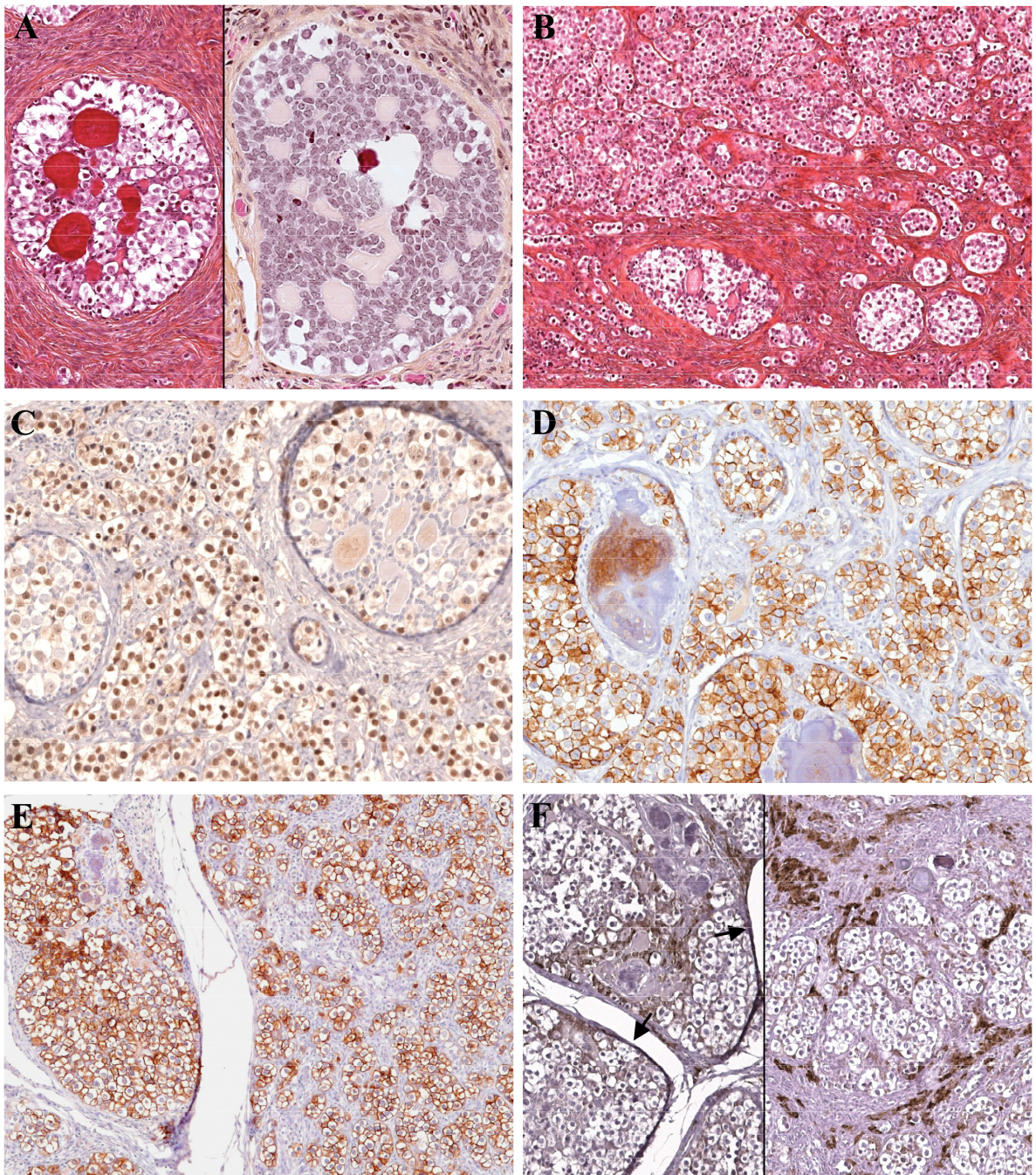


Figure 1 Histological and immunohistochemical findings in gonadal tumors.

A left: Patient 27; gonadoblastoma nest with numerous germ cells, as well as a layer of Sertoli cells at its periphery and around hyaline globules (HPS, original magnification x 400). **A right:** Patient 19; gonadoblastoma nest post-chemotherapy with numerous Sertoli cells and a few germ cells at the periphery. Many hyaline globules and a calcification can also be seen (HPS, original magnification x 400). **B:** Patient 27; gonadoblastoma nests (bottom) with a dysgerminoma (top), as well as dysgerminoma cords in between (HPS, original magnification x 100). **C:** Patient 27; nests of gonadoblastoma and cords of dysgerminoma after immunostaining with OCT3/4 (OCT3/4, original magnification x 200). **D:** Patient 27; five peripheral gonadoblastoma nests with dysgerminoma cords at the center and periphery after immunostaining with PLAP (PLAP, original magnification x 200). **E:** Patient 29; immunostaining with CD117/KIT of a gonadoblastoma nest (left) and dysgerminoma cords (right) (CD117/KIT, original magnification x 125). **F left:** Patient 29; immunostaining with inhibin on gonadoblastoma nests; Sertoli cells are seen at the periphery of nests (arrows) and around hyaline globules (inhibin, original magnification x 125). **F right:** Patient 29; dysgerminoma nests and cords not stained by inhibin (inhibin, original magnification x 125).

All tumours found were among the 22 patients with pure gonadal dysgenesis, whereas no typical gonadoblastoma nor any other tumor was found in the 8 patients with mixed gonadal dysgenesis (Table I).

Histology of gonadoblastomas and dysgerminomas was typical (Figure 1A), although less germ cells were observed post-chemotherapy in one gonadoblastoma (Figure 1B). Immunohistochemistry with PLAP, CD117/KIT and OCT3/4 stained germ cells in gonadoblastoma nests as well as in dysgerminomas. Staining with OCT3/4 was strictly nuclear (Figure 1C), with greater than 95% of stained germ cells in dysgerminoma compared to an average of 80% in gonadoblastomas. Staining with PLAP (Figure 1D) and CD117/KIT (Figure 1E) was very similar, with marked staining of cytoplasmic membranes and variable intra-cytoplasmic staining in some germ cells. In addition, gonadoblastoma nests were rimmed by Sertoli cells usually positive with inhibin whereas dysgerminoma

nests and cords were not (Figure 1F). On the other hand, Leydig cells were well stained with inhibin and were often present between dysgerminoma cords (Figure 1F) and also between gonadoblastoma nests.

Undifferentiated gonadal tissue

UGT was found in 15 gonads (13 patients), being associated with a streak in 12 gonads (including 9 with a tumor), 2 dysgenetic testes, and a dysgenetic testis adjacent to a streak area (testis-streak; Table I). UGT was seen at the periphery or admixed with the nests of 9 gonadoblastomas. When a dysgerminoma was also present, UGT was sometimes seen adjacent to nests of gonadoblastoma (Figure 2A), or was predominantly found between gonadoblastoma nests and dysgerminoma cords. The UGT was made of relatively thin sex cords with germ cells sometimes lined up in a row (Figure 2B), and/or of thicker cords that contained a variable number of germ cells, sometimes with rare invaginations of basal membrane (hyaline globules). The appearance of these thicker sex cords was similar to that of nests of early gonadoblastoma (Figure 2C), so that there was a continuum between the sex cords and the gonadoblastoma nests.

Although no signs of genuine gonadoblastoma or dysgerminoma were found in patient 24, who has mixed gonadal dysgenesis, he presented with UGT at the periphery of his left dysgenetic testis, while the contralateral gonad was made up of a gonadal streak with many persistent large primitive sex cords and several germ cells (Figure 2D), some of these in mitosis (Figure 2D, insert). We did not consider this histological picture characteristic of either intratubular germ cell neoplasia unclassified (IGCNU) or gonadoblastoma, as there were no well-formed testicular tubules or actual islands containing hyaline globules or calcifications.

When not present adjacent to a tumor, UGT presentation was variable, depending on whether it was found in gonadal streaks of dysgenetic testes. In gonadal streaks, UGT consisted of thin sex cords made up of a few layers of pre-Sertoli/granulosa cells and containing rare germ cells (Figure 2E, insert). Sometimes, these sex cords were difficult to recognize as they were blended into the fibrous tissue of the streak. Occasionally, germ cells were found directly in the fibrous tissue of the streak without apparent supporting cells (Figure 2E). In one instance, a germ cell was surrounded by a few supporting cells, giving the appearance of a primordial follicular structure (Figure 2F).

When associated with a dysgenetic testis, UGT was found in the hilus (Figure 2G) or under the tunica albuginea, and sometimes in both, as part of a continuum. When in the hilus, sex cords looked primitive with few germ cells and blended in some areas with the Leydig cells and tubules of the rete testis. When under the tunica albuginea, sex cords were sometimes present in an ovarian-like stroma. In one of our cases of dysgenetic testis-streak (patient 11), the UGT was found in the streak. Investigations with PLAP, inhibin, AMH and OCT3/4 revealed that the sex cords found in the UGT were slightly positive with inhibin and positive or negative with AMH, in contrast to the high positivity for both markers of the Sertoli cells found in the nearby testicular tissue (Table III). Several germ cells were positive with both PLAP (Figure 2H) and OCT3/4, either in the testis or sex cords, although a double immunostaining that would have confirmed that some of the germ cells were positive with both markers could not be performed.

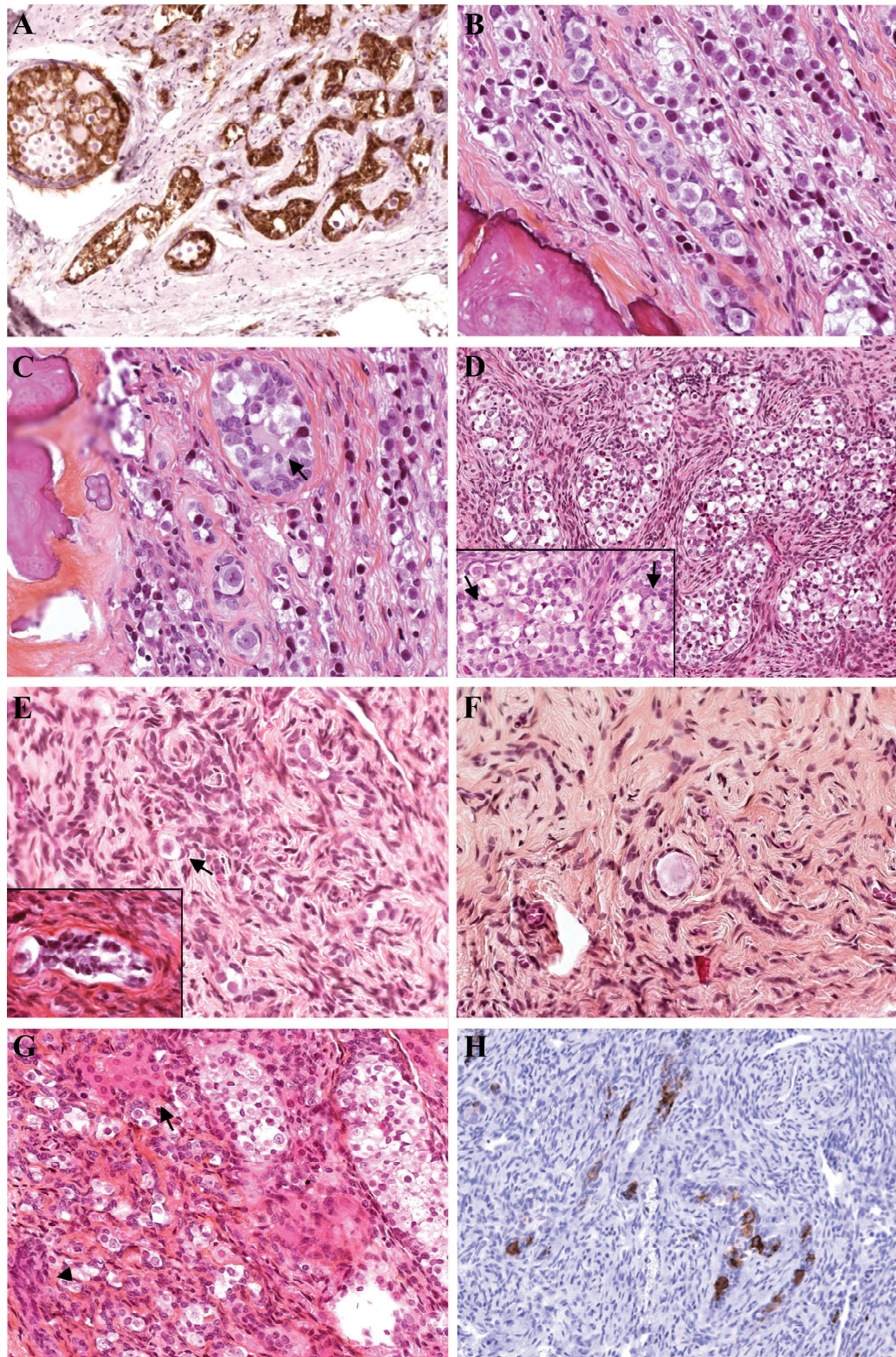


Figure 2 Histological and immunohistochemical findings in undifferentiated gonadal tissue (UGT).

A: Patient 1; inhibin immunostaining on gonadoblastoma nests and sex cords of UGT, the latter showing a few dispersed germ cells (inhibin, original magnification x 200). **B:** Patient 27; thin sex cords of UGT with many germ cells lined up in a row of pre-Sertoli/granulosa cells and surrounded by cords of dysgerminoma (HPS, original magnification x 400). **C:** Patient 27; sex cords of UGT mixed with strands of dysgerminoma, and an oval-shaped nest with one invagination (arrow) of basal membrane with early gonadoblastoma (HPS, original magnification x 400). **D:** Patient 24; streak gonad containing thick sex cords filled with germ cells (HPS, original magnification x 125). **Insert:** Patient 24; mitoses (arrows) can also be observed in some of the sex cords (HPS, original magnification x 400). **E:** Patient 26; thin sex cords of UGT sometimes embedded in the stroma and containing a few germ cells; germ cells are sometimes found loose in the stroma (arrow) and not in a cord (HPS, original magnification x 400). **Insert:** Patient 13; well-defined sex cord of UGT (HPS, original magnification x 400). **F:** Patient 26; UGT showing a germ cell with a primordial follicle-like appearance (HPS, original magnification x 400). **G:** Patient 4; dysgenetic testis with seminiferous tubules (right) and adjacent small sex cords with germ cells (left) in the hilus. A tubule from the rete testis (arrowhead) and an aggregation of Leydig cells (arrow) are also visible (HPS, original magnification x 400). **H:** Patient 11; UGT in the streak area of a testis-streak; a few germ cells are positive with PLAP (PLAP, original magnification x 250).

Streak gonads

A total of 43 gonads were characterized as streaks. In pure gonadal dysgenesis, 10 of the 37 streaks were associated with UGT, 9 of which contained a gonadoblastoma (including 4 with an additional dysgerminoma and 1 with also a choriocarcinoma). Another streak had a burned-out (calcified) gonadoblastoma without UGT. Calcifications without gonadal tumors were observed in a few streak gonads including that of patient 15 who had a dysgerminoma removed 8 years ago. After chemotherapy, the contralateral gonad, removed 8 years later, was found to consist of a gonadal streak with round sclerotic nests and a few mulberry calcifications (Figure 3A). Some of the nests contained a central hyalinized vessel (Figure 3A, insert). As for patients with mixed gonadal dysgenesis,

streaks were found in 6 gonads (including 2 testes-streaks), 3 of them being associated with UGT.

Outside regions containing UGT or tumors, all 43 streak gonads demonstrated a fibrous ovarian-like stroma. Invaginations of the surface epithelium could sometimes give rise to small elongated gland-like structures positive with cytokeratin (Figure 3B; Table III), but not with inhibin. In almost half of the streaks, sex cords without germ cells were observed. These cords were either short and very thin, almost disappearing in the fibrous stroma, or long and irregular, with two layers of cells (Figure 3C, left). In some instances, sex cords were thicker, looking like round, oval or more irregular nests. In 2 streaks, there was a large round island made of pre-Sertoli/granulosa cells also containing hyaline globules made of invaginations of the basal membrane (Figure 3D). None of the sex cords, irrespective of their size and shape, contained germ cells, as confirmed by negative staining with PLAP and OCT3/4. Immunostaining with inhibin was almost uniformly positive (Figure 3C, right; Table III).

Leydig cell aggregates were often present in the hilus or mesosalpynx, even in the fimbriae of the Fallopian tube, and were always strongly positive with inhibin. Large confluent hyperplastic nodules of Leydig cells surrounding a serous cyst in both streak gonads were found in patient 16. The nodules were not considered a tumor since they did not reach 1 cm in diameter, according to Scully et al. [41].

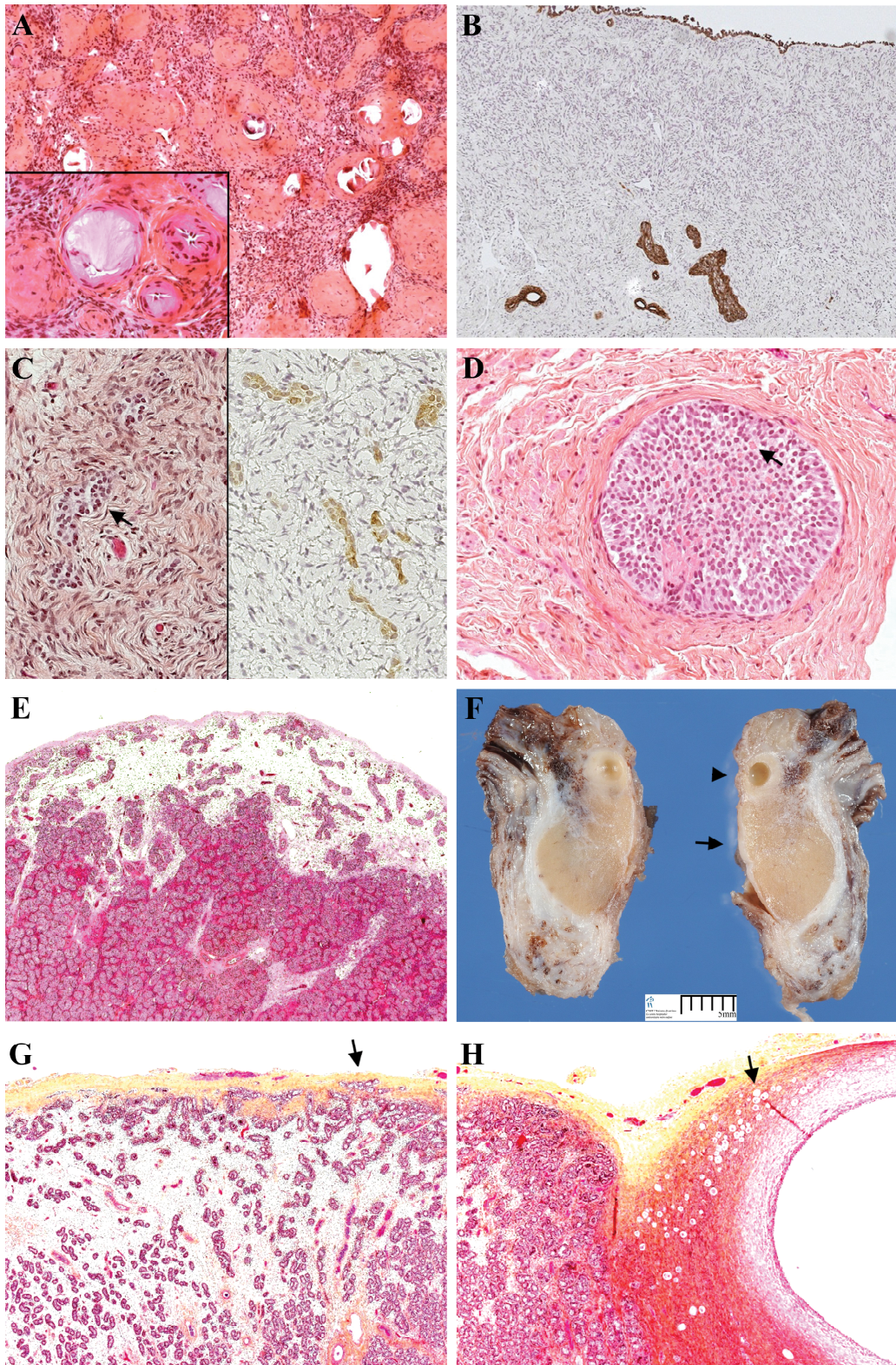


Figure 3 Histological and immunohistochemical findings in streak gonads and dysgenetic testes.

A: Patient 15; gonadal streak with numerous sclerous nodules and some calcifications (HPS, original magnification x 100). **Insert:** Sclerous nodules with a central hyalinized vessel (HPS, original magnification x 400). **B:** Patient 6; streak with small irregular gland-like structures invaginated from the surface (top) and tubules of rete ovarii (bottom) (cytokeratin, original magnification x 100). **C:** Patient 6; small sex cords (arrow) containing one or two layers of pre-Sertoli/granulosa cells (left) that are positive with inhibin (right) in the streak (left: HPS, original magnification x 400; right: inhibin, original magnification x 400). **D:** Patient 23; gonadal streak with a large round sex cord containing many tiny hyaline globules (arrow) (HPS, original magnification x 200). **E:** Patient 24; typical dysgenetic testis with abundant stroma in cortex, dispersed seminiferous tubules, irregular or ramified, with invasion of tunica albuginea by seminiferous tubules (HPS, original magnification x 30). **F:** Patient 12; bisection of left gonad (ovotestis) showing the predominant testicular portion (arrow) as well as the ovarian portion (arrowhead) located between the testis and testicular annexes. **G:** Patient 12; ovotestis showing a portion of testicular dysgenesis with abundant stroma, dispersed seminiferous tubules and invasion of the tunica albuginea by tubules (arrow) (HPS, original magnification x 30). **H:** Patient 12; ovotestis showing the junction between testicular (left) and ovarian tissue (right) containing several primordial follicles (arrow) and a secondary follicle (HPS, original magnification x 30).

Table III Intensity of immunohistochemistry stains in analyzed gonads. Patients are identified by their corresponding number in parentheses; side [right (R) or left (L)] is specified when necessary.

	Streak with sex cords	UGT	Dysgenetic testis	Gonadoblastoma	Dysgerminoma
		++ (1)		++ (1)	
		+++ (3)		+++ (3)	
		++ (4)	+++ (4)		
	+ /+++ (6)				
		+ /+++ (7)		+ /+++ (7)	
	+ (8)	++ (8)		+ (8)	
		+ (11)	+++ (11)		
			++ (12)		
Inhibin	+ /+++ (14R)				
	+ /+++ (14L)				
	+ (16R)				
	+ /+++ (16L)				
		+ /+++ (18)		+ /+++ (18)	- (18)
			++ /+++ (20)		
	+ (23)				
		+ /+++ (26)			
		- (27)		- /+ (27)	- (27)
		- (29)		+ /+++ (29)	- (29)
		+ /+++ (4)	++ (4)		
			++ (12)		
AMH		- /+ (18)		- /+ (18)	
		- (26)	+ /+++ (20)		
	++ (6R)				
Cytokeratin	++ (6L)				
	- (16)				
		++ (18)		++ (18)	+ /+++ (18)
CD117/KIT			++ (20)		
		- (26)		++ (29)	++ (29)
		++ (3)		++ (3)	
		+ /+++ (4)	+ /+++ (4)		
	- (6R)				
	- (6L)				
		++ (7)		++ (7)	
	- (8)	++ (8)		+ /+++ (8)	
		+ /+++ (11)	+ /+++ (11)		
PLAP	- (14R)				
	- (14L)				
	- (16)				
		++ (18)		++ (18)	++ (18)
			++ (20)		
	- (23R)				
	- (23L)				
		+ /+++ (26)			
		++ (27)		++ (27)	+ /+++ (27)
				++ /+++ (29)	++ /+++ (29)
		+ /+++ (4)	+ /+++ (4)		
		+ /+++ (11)	+ /+++ (11)		
		++ (18)		++ (18)	+++ (18)
OCT3/4			++ (20)		
		+ /+++ (26)			
				+ /+++ (27)	+ /+++ (27)
				+ /+++ (29)	+ /+++ (29)

Dysgenetic testes

The 7 dysgenetic testes biopsied or excised in patients with mixed gonadal dysgenesis (patients 4, 11L and R, 12, 20, 24, and 25; Table I) had a typical appearance (Figure 3E). Even when the testicular medulla had a normal appearance, evidence of UGT, entangled with tubules of the rete testis and Leydig cells, could be found in patients 4 and 24 (Figure 2G). In patient 12, the testis was removed a year after a cortical biopsy that showed testicular dysgenesis; surprisingly, an ovotestis in which the predominant testicular tissue was typically dysgenetic was found (Figure 3F, G and H). For patients 22 and 26, no testicular biopsy or excision was performed.

Discussion

Cytogenetics

We have studied gonadal mosaicism in our cohort of patients in an attempt to explain their gonadal dysgenesis and tumor development. In 10 of the 14 patients bearing a rearranged Y chromosome, we found extensive gonadal mosaicism that is probably the cause of their sex development disorder. Unfortunately, the gonads of the remaining 4 patients could not be studied. This mosaicism is most likely explained by the nature of the rearranged Y chromosome itself, the presence of two centromeres leading to problems during segregation of that chromosome. Indeed, the rearranged chromosome is literally torn between its two centromeres, sometimes either breaking to form further rearranged chromosomes, or not migrating in daughter cells before the end of anaphase and being lost, generating a 45,X cell line. No correlation between the presence of this 45,X cell and the presence of UGT or gonadal tumor was found.

On the other hand, gonadal mosaicism did not explain the gonadal dysgenesis of all patients with a normal Y chromosome. Several factors are likely explaining this. First, aneuploidy of a normal Y chromosome can be observed in various tissues (up to 10% of bone marrow cells) in normal 46,XY males, depending on their age, although the exact mechanisms involved in such phenomenon remain unknown [42]. Second, this level of

mosaicism is likely related to technical artefacts on fixed tissues, as a 7-13% 45,X mosaicism was found in the fixed tissues of patients 27, 28 and 30, although no such cell line was found in the fresh specimens (Table II). Finally, the heterogeneity of the gonadal tissue found in the sections may also have contributed to this mosaicism. In fact, by opting for 15 μ m sections, we minimized incomplete nuclei that would have occurred in thinner sections and could have skewed our 45,X mosaicism level. However, these thick sections made it impossible to analyze the distribution of the various cells lines in the sections. Consequently, one can consider that only a small number of 46,XY patients (5/16) had significant 45,X mosaicism in their blood lymphocytes (30-70%; patients 25 and 26) or gonads (30-76%; patients 15, 20 and 23). If 45,X gonadal mosaicism is likely to have contributed to the gonadal dysgenesis of patients 20 and 23 as it reaches 47% and 76% respectively, its implication in the sex development disorder of patient 15 (30% 45,X) remains uncertain. As for patients 25 and 26 with a male phenotype, the cytogenetic study of their gonads could unfortunately not be done. Therefore, gonadal mosaicism is unlikely to explain the gonadal dysgenesis of a majority of 46,XY patients, contrary to what is observed in patients with an abnormal Y chromosome. Indeed, a normal Y chromosome is not expected to fail proper segregation in a great proportion of cells as abnormal Y chromosomes can. Lack of significant gonadal mosaicism in 46,XY patients with gonadal dysgenesis was also reported in other published series [9-11,14,20].

Histology and immunohistochemistry

UGT was first reported in 2006 by Cools et al. [35] to designate the presence of sex cords made of pre-Sertoli/granulosa cells and containing germ cells, although these germ cells can also be found loose in the stroma without association with any visible sex cord. In 2009, Cools et al. [36] somewhat differentiated between primitive sex cords containing germ cells and UGT made of streak tissue with isolated germ cells. These germ cells are positively marked by OCT3/4, CD117/KIT, PLAP, and TSPY and are thus immature, their development being arrested at the fetal stage. This maturation delay is said to make germ cells prone to neoplastic transformation [25]. UGT does not, however, always lead to

formation of tumors, as it can also lose its germ cells through apoptosis and end up as a streak containing sex cords without germ cells [23,35]. In the 3 patients with pure gonadal dysgenesis of our cohort who underwent gonadectomy before the age of 4 years old (patients 6, 13, 23), 3 of the 6 streak gonads contained sex cords without germ cells, and in patient 13, the right streak contained UGT. This suggests, in concordance with Cools et al. [35], that some of the streak gonads of patients with pure gonadal dysgenesis initially contained UGT. This UGT can either persist and later evolve probably into a gonadoblastoma, or have its germ cells disappear through apoptosis and ultimately end up as a streak. Consequently, in our opinion, UGT is always present either in a streak or a testis and is not really a different kind of gonad.

The same kind of streak, as found in pure gonadal dysgenesis, is usually part of mixed gonadal dysgenesis in different combinations [21] although dysgenetic testes are sometimes found on both sides, associated or not with a streak (testis-streak). The streak may be absent [22]. Contrary to what was found in the series of Cools et al. [20,35], none of our patients showed actual ovarian tissue, except for patient 12 who showed an ovotestis in which the testicular portion was dysgenetic.

Half of our patients with mixed gonadal dysgenesis (50%) presented UGT in some areas of their gonads, whereas 36% of the patients with mixed gonadal dysgenesis described by Cools et al. [35] did. Nevertheless, our sample of mixed gonadal dysgenesis was smaller (only about a third of our 30 patients) compared to the study of Cools et al. [35] where nearly half of the 45 patients had this type of gonadal dysgenesis, which may explain the difference. As for our patients with pure gonadal dysgenesis, UGT was always found adjacent to a gonadoblastoma (with or without an adjacent dysgerminoma or choriocarcinoma), except for one case of isolated UGT (patient 13). As UGT was found at the periphery or admixed with 9 of the 12 tumors, as demonstrated by routine staining and immunohistochemistry with PLAP and OCT3/4, this suggests that UGT is indeed a risk factor for tumorigenesis. In patients 4, 11, 13, 24 and 26 (6 gonads) where UGT was found without clear evidence of tumors, gonadectomy had been performed before the age of 2 and prior to any neoplastic transformation. In the two instances of gonadoblastomas where no

UGT was found, one tumor was burned-out (patient 2) and the other was almost completely overgrown by a dysgerminoma (patient 18). A pure dysgerminoma without UGT was also found in patient 15.

Among the 22 patients with pure gonadal dysgenesis, 9 developed a gonadoblastoma, including 2 cases in which the tumor was bilateral. This is slightly higher than the 30% frequency reported in the literature. Among the 9 patients with a gonadoblastoma, 5 of them also developed a germ cell tumor: 3 unilateral dysgerminomas, 1 bilateral dysgerminoma, and 1 choriocarcinoma. This is similar to what is reported in the literature. Indeed, it has been said that 60% of patients with a gonadoblastoma develop a germ cell tumor, and that 80% of these germ cell tumors are dysgerminomas [26].

None of our patients with mixed gonadal dysgenesis developed a tumor, whether a gonadoblastoma or an IGCNU. Incidence of germ cell tumors in mixed gonadal dysgenesis is evaluated at 15% [25]; gonadoblastomas and dysgerminomas are mostly seen. In our cohort of 8 patients with mixed gonadal dysgenesis, 4 patients did present UGT, including a streak with thick sex cords filled with germ cells, some with mitoses, in a 3 month-old patient (24). A very similar finding of sex cords with numerous germ cells was previously reported in a 1 month-old patient with mixed gonadal dysgenesis [23,43]. At that time, this was considered to resemble a fetal ovary; when the gonad was removed 13 years later, only fibrous ovarian-like stroma was found. One may thus consider that the young age at which most patients with mixed gonadal dysgenesis undergo gonadectomy or orchidopexy, as they are diagnosed in infancy due to the asymmetric appearance of their genitalia, prevents malignant evolution. Indeed, all of our patients with mixed gonadal dysgenesis underwent gonadectomy or had a testicular biopsy before the age of 4. A few cases of gonadoblastomas in patients as young as 4 months and 1 year have however been reported by Cools et al. [35] in patients with pure and mixed gonadal dysgenesis respectively. In our study, the youngest patient with a gonadoblastoma was 5 and suffered from pure gonadal dysgenesis.

Regions of UGT are relatively easy to identify in streaks, thanks to the characteristic appearance of germ cells. Immunostaining with PLAP and OCT3/4 allows evaluation of the proportion of immature germ cells in the UGT. Such immunostaining is also useful in analysis of dysgenetic testes (in their entirety or in a biopsy), allowing for a precise evaluation of the number and localization of immature germ cells. Indeed, it has been suggested that immature germ cells associated with the basal membrane of seminiferous tubules are at risk of malignant transformation [36].

By using these markers in our cohort of patients with pure or mixed gonadal dysgenesis, we obtained similar results to those of Cools et al. [35] on gonadoblastomas and dysgerminomas. Furthermore, PLAP and OCT3/4 immunostaining was helpful in identifying pre-neoplastic UGT at the periphery of gonadoblastoma nests by staining sex cords rich in immature germ cells that did not yet have a characteristic gonadoblastoma appearance, something referred to as clonal expansion by Cools et al. [35]. We found that inhibin was especially useful when searching for sex cords in streak gonads, as well as for UGT in streaks or admixed with gonadoblastoma nests. It allowed distinction between UGT and the thin cords of an early dysgerminoma adjacent to a gonadoblastoma.

Two gonads presented with sclerotic nests. One patient (15) had undergone resection of a dysgerminoma 8 years prior to gonadectomy of the contralateral gonad without receiving any chemotherapy. This contralateral streak showed numerous completely fibrous nests associated with a few mulberry calcifications, and sometimes a central hyalinized vessel. These unusual findings in the streak are of unknown significance. The other case is that of a patient (19) who had a biopsy of her right choriocarcinoma and was then placed on a chemotherapy regimen appropriate to this tumor for 8 months; however, the tumor was resected 2 months after beginning chemotherapy. Histological examination showed the presence of UGT, gonadoblastoma and choriocarcinoma. Some of the gonadoblastoma nests were partially or completely fibrous. Overall, this suggests that gonadoblastomas can become fibrotic as answer to chemotherapy. The persistence of germ cells in some sex cords and gonadoblastoma nests in this patient may be due to the short course of chemotherapy between the biopsy and tumor resection.

Among the 8 patients with mixed gonadal dysgenesis, 4 exhibited a male phenotype, 2 presented with a female phenotype, and 2 had ambiguous genitalia. Of the latter, one was raised as a female (patient 4), and the other was raised as a male (patient 12). Among the 5 males, 4 had a left testis whereas the fifth patient had a right testis. All 5 testes were initially left or fixed in the scrotum; a biopsy was made in 3 cases and showed typical features of a dysgenetic testis. Immunohistochemistry could only be performed with success on one of the biopsies (patient 12), and no germ cells were found. The testis of this patient was removed a year later and still showed testicular dysgenesis with no evidence of germ cells in the seminiferous tubules. However, one fifth of the gonad consisted of ovarian tissue with primary and secondary follicles, indicating an ovotestis. An association of testicular dysgenesis as seen in mixed gonadal dysgenesis and ovotestis has not been mentioned neither in a recently reported series of 111 South African patients with an ovotestis whose gonads were removed and histologically examined, nor in a review of 283 cases published between 1980 and 1992 [44,45].

When patients with mixed gonadal dysgenesis present a male phenotype, testes are often preserved and fixed in the scrotum. As mentioned by Cools et al. [36], the risk of malignant transformation of germ cells in dysgenetic testes left in scrotal position remains unknown. Therefore, strict follow-up protocols should be implemented, especially when only a biopsy of the testis is available. Indeed, biopsies may not reflect the true nature of the entire testis, as regions with immature germ cells in the seminiferous tubules or UGT in the hilus may not have been selected by the surgeon. It has been suggested that in cases where a IGCNU is found, patients could possibly be treated with low doses of radiation, killing immature germ cells but preserving hormonal functions [25,36].

In conclusion, by retrospectively studying the gonads of 30 patients with gonadal dysgenesis, we demonstrated that gonadal mosaicism plays a role in the sex development disorder of XY patients with a rearranged Y chromosome. On the other hand, when a normal Y chromosome is present, this chromosome is less likely to be found in mosaic. Therefore, gonadal mosaicism is unlikely to play a similar role in the sex development

disorder of patients with a normal Y chromosome. We have also confirmed that UGT, a newly identified pattern of gonadal differentiation, is a risk factor for gonadal tumours. One should thus never overlook the presence of germ cells in gonadal streaks, as this is characteristic of UGT. Furthermore, our work provides evidence that several markers are very useful when performing histological analyses on dysgenetic gonads. Inhibin, PLAP and OCT3/4 should be used in streak gonads, as these markers will allow for identification of sex cords with germ cells; also, Leydig cells are more easily found. If epithelial structures without germ cells are present, immunostaining with inhibin should be performed to establish that these structures are indeed sex cords, not surface epithelial inclusions or rete ovarii. Presence of UGT should be confirmed with inhibin, PLAP and OCT3/4 to detect immature germ cells. These same markers, as well as CD117/KIT, should also be used when studying a gonadoblastoma or dysgerminoma in order to identify immature germ cells. As for dysgenetic testes, even when only a biopsy is available, immunohistochemistry with inhibin, AMH, PLAP and OCT3/4 should be performed in order to detect the presence of mature and immature germ cells and determine their position in the seminiferous tubules, as this is possibly helpful in evaluating the maturation delay and risk of tumorigenesis of these gonads.

Acknowledgements

We thank Claude Potvin, from the Département de Pathologie du CHU Sainte-Justine, for her valuable collaboration and help with preparation of paraffin-embedded formalin-fixed specimens for FISH studies, and Drs Chantal Bernard and Miriam Blumenkrantz, from the Montreal Children Hospital of the McGill University Health Center, for giving us access to the histological slides of patients 19 and 24. We also thank Dr Roland Auer, from the Département de Pathologie du CHU Sainte-Justine, for his careful revision of this manuscript.

References

1. Robboy SJ, Jaubert F. Disorders of sexual development. In: Robboy SJ, Mutter GL, Prat J, Bentley RC, Russell P, Anderson MC, eds. Robboy's pathology of the female reproductive tract, 2nd edition. London: Churchill Livingstone Elsevier, 2009;945-977.
2. McElreavey K, Barbaux S, Ion A, Fellous M. The genetic basis of murine and human sex determination: A review. *Heredity* 1995;75:599-611.
3. Cameron FJ, Sinclair AH. Mutations in SRY and SOX9: Testis-determining genes. *Hum Mut* 1997;9:388-395.
4. Bardoni, B, Zanaria E, Guioli S, et al. A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nature Genet* 1994;7:497-501.
5. Jordan BK, Mohammed M, Ching ST, et al. Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *Am J Hum Genet* 2001;68:1102-1109.
6. McDonald MT, Flejter W, Sheldon S, Putzi MJ, Gorski JL. XY sex reversal and gonadal dysgenesis due to 9p24 monosomy. *Am J Med Genet* 1997;73:321-326.
7. Veitia R, Nunes M, Brauner R, et al. Deletions of distal 9p associated with 46,XY male to female sex reversal: Definition of the breakpoints at 9p23.3-p24.1. *Genomics* 1997;41:271-274.
8. Sloan MS, Rosenberg SM, Brown JA. Primary amenorrhea and virilization in a true hermaphrodite with a rare dicentric Y chromosome. *Obstet Gynecol* 1984;64:64S-67S.
9. Bisat T, May K, Litwer S, Broecker B. Y chromosome mosaicism in the gonads, but not in the blood, of a girl with the Turner phenotype and virilized external genitalia. *Clin Genet* 1993;44:142-145.
10. Sultana R, Myerson D, Distèche CM. In situ hybridization analysis of the Y chromosome in gonadoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1995;13:257-262.
11. Petrusevska R, Beudt U, Schäfer D, et al. Distribution of marker-Y chromosome containing cells in different tissues of a Turner mosaic patient with mixed gonadal dysgenesis. *Clin Genet* 1996;49:261-266.

12. Costa T, Lambert M, Teshima I, Ray PN, Richer C-L, Dallaire L. Monozygotic twins with 45,X/46,XY mosaicism discordant for phenotypic sex. *Am J Med Genet* 1998;75:40-44.
13. Reddy KS, Sulcova V. Pathogenetics of 45,X/46,XY gonadal mosaicism. *Cytogenet Cell Genet* 1998;82:52-57.
14. Atkins KE, Gregg A, Spikes AS, et al. Identification of Y chromatin directly in gonadal tissue by fluorescence in situ hybridization (FISH): Significance for Ullrich-Turner syndrome screening in the cytogenetics laboratory. *Am J Med Genet* 2000;91:377-382.
15. Fernández-García R, García-Doval S, Costoya S, Pásaro E. Analysis of sex chromosome aneuploidy in 41 patients with Turner syndrome: A study of 'hidden' mosaicism. *Clin Genet* 2000;58:201-208.
16. Quilter CR, Nathwani N, Conway GS, et al. A comparative study between infertile males and patients with Turner syndrome to determine the influence of sex chromosome mosaicism and the breakpoints of structurally abnormal Y chromosomes on phenotypic sex. *J Med Genet* 2002;39:e80 available at: www.jmedgenet.com/cgi/content/full/39/12/e80
17. Chemes HE, Muzulin PM, Venara MC, Muhlmann MC, Martínez M, Gamboni M. Early manifestations of testicular dysgenesis in children: Pathological phenotypes, karyotype correlations and precursor stages of tumour development. *APMIS* 2003;111:12-24.
18. Bouayed Abdelmoula N, Amouri A. Les chromosomes Y dicentriques. Deuxième partie: Corrélation phénotype-génotype. *Ann Biol Clin* 2005;63:363-375.
19. Peña-Alonso R, Nieto K, Alvarez R, et al. Distribution of Y-chromosome bearing cells in gonadoblastoma and dysgenetic testis in 45,X/46,XY infants. *Mod Pathol* 2005;18:439-445.
20. Cools M, Boter M, van Gurp R, et al. Impact of the Y-containing cell line on histological differentiation patterns in dysgenetic gonads. *Clin Endocrinol* 2007;67:184-192.

21. Scully RE, Young RH, Clement PB. Tumors and tumor-like lesions associated with abnormal sexual development. In: Rosai J, Sobin LH, eds. Atlas of tumor pathology. Washington, USA: Armed Forces Institute of Pathology, under the Auspices of Universities Associated for Research and Education in Pathology, Inc., 1998:399-408.
22. Forest MG. Diagnosis and treatment of disorders of sexual development. In: DeGroot LJ, Jameson JL, de Krestor D, Grossman AB, Marshall JC, Melmed S, Potts JT, Weir GC, eds. Endocrinology, 5th edition. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2006;2779-2829.
23. Robboy SJ, Millert T, Donahoe PK, et al. Dysgenesis of testicular and streak gonads in the syndrome of mixed gonadal dysgenesis: Perspective derived from a clinicopathologic analysis of twenty-one cases. *Hum Pathol* 1982;13:700-716.
24. Verp MS, Simpson JL. Abnormal sexual differentiation and neoplasia. *Cancer Genet Cytogenet* 1987;25:191-218.
25. Cools M, Drop SLS, Wolffenbuttel KP, Oosterhuis JW, Looijenga LHJ. Germ cell tumors in the intersex gonad: Old paths, new directions, moving frontiers. *Endocrine Rev* 2006;27:468-484.
26. Scully RE, Young RH, Clement PB. Tumors of the ovary, maldeveloped gonads, Fallopian tubes, and broad ligament. In: Rosai J, Sobin LH, eds. Atlas of tumor pathology. Washington, USA: Armed Forces Institute of Pathology, under the Auspices of Universities Associated for Research and Education in Pathology, Inc., 1998:307-312.
27. Page DC. Hypothesis: A Y-chromosomal gene causes gonadoblastoma in dysgenetic gonads. *Development* 1987;101:151-155.
28. Tyler-Smith C, Taylor L, Muller U. Structure of a hypervariable tandemly repeated DNA sequence on the short arm of the human Y chromosome. *J Mol Biol* 1988;203:837-848.
29. Neil DL, Villasante A, Fisher RB, Vetrie D, Cox B, Tyler-Smith C. Structural instability of human tandemly repeated DNA sequences cloned in yeast artificial chromosome vectors. *Nucleic Acid Res* 1990;18:1421-1428.

30. Manz E, Schnieders F, Brechlin AM, Schmidtke J. TSPY-related sequences represent a microheterogeneous gene family organized as constitutive elements in DYZ5 tandem repeat units on the human Y chromosome. *Genomics* 1993;17:726-731.
31. Vogel T, Schmidtke J. Structure and function of TSPY, the Y-chromosome gene coding for the 'testis-specific protein'. *Cytogenet Cell Genet* 1998;80:209-213.
32. Schnieders F, Dork T, Arnemann J, Vogel T, Werner M, Schmidtke J. Testis-specific protein, Y-encoded (TSPY) expression in testicular tissues. *Hum Mol Genet* 1996;5:1801-1807.
33. Lau YF. Sex chromosomes genetics '99: Gonadoblastoma, testicular and prostate cancers, and the TSPY gene. *Am J Hum Genet* 1999;64:921-927.
34. Kersemaekers A-MF, Honecker F, Stoop H, et al. Identification of germ cells at risk for neoplastic transformation in gonadoblastoma: An immunohistochemical study for OCT3/4 and TSPY. *Hum Pathol* 2005;36:512-521.
35. Cools M, Stoop H, Kersemaekers AM, et al. Gonadoblastoma arising in undifferentiated gonadal tissue within dysgenetic gonads. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:2404-2413.
36. Cools M, Looijenga LHJ, Wolffenbuttel KP, Drop SLS. Disorders of sex development: Update on the genetic background, terminology and risk for the development of germ cell tumors. *World J Pediatr* 2009;5:93-102.
37. Rooney DE, Szepulkowski BH. Prenatal Diagnosis and Tissue Culture. In: Rooney DE, Szepulkowski BH, eds. *Human Cytogenetics: A Practical Approach, Vol. 1 Constitutional Analysis*. New York: Oxford University Press, 1992;55-89.
38. Lemieux N, Drouin R, Richer CL. High-resolution dynamic and morphological G-bandings (GBG and GTG): a comparative study. *Hum Genet* 1990;85:261-266.
39. Lemieux N, Dutrillaux B, Viegas-Pequignot E. A simple method for simultaneous R- or G-banding and fluorescence in situ hybridization of small single-copy genes. *Cytogenet Cell Genet* 1992;59:311-312.
40. DesGroseilliers M, Beaulieu Bergeron M, Brochu P, Lemyre E, Lemieux N. Phenotypic variability in isodicentric Y patients: Study of nine cases. *Clin Genet* 2006;70:145-150.

41. Scully RE, Young RH, Clement PB. Tumor-like lesions. In: Rosai J, Sobin LH, eds. Atlas of tumor pathology. Washington, USA: Armed Forces Institute of Pathology, under the Auspices of Universities Associated for Research and Education in Pathology, Inc., 1998:409-450.
42. Stone JF, Sandberg AA. Sex chromosome aneuploidy and aging. *Mutation Res* 1995;338:107-113.
43. Robboy SJ, Bentley RC, Russell P. Embryology of the female genital tract and disorder of abnormal sexual development. In: Kurman RJ, ed. Blaustein's pathology of the female genital tract, 5th edition. New York: Springer-Verlag, 2002;3-36.
44. Wiersma R, Ramdial PK. The gonads of 111 South African patients with ovotesticular disorder of sex differentiation. *J Ped Surg* 2009;44:556-560.
45. Krob G, Braun A, Kuhnle U. True hermaphroditism: Geographical distribution, clinical findings, chromosomes and gonadal histology. *Eur J Pediatr* 1994;153:2-10.
46. Beaulieu Bergeron M, Brochu P, Lemyre E, Lemieux N. Correlation Between Intercentromeric Distance, Mosaicism and Sexual Phenotype: Molecular Localization of Breakpoints in Isodicentric Y Chromosomes. *Am J Med Genet Part A* 2011; in press.
47. Beaulieu Bergeron M, Bouron-Dal Soglio D, Maietta A, et al. Coexistence of a choriocarcinoma and a gonadoblastoma in the gonad of a 46,XY female: A single nucleotide polymorphism array analysis. *Pediatr Dev Pathol* 2010;13:66-71.

Chapitre 3

**Altérations génétiques rares pouvant
causer un développement sexuel anormal**

Les cas de trois patients avec de rares anomalies génomiques ou cytogénétiques sont discutés dans ce troisième chapitre afin de mettre en lumière les mécanismes complexes impliqués dans les anomalies développement sexuel. Les trois articles de ce chapitre démontrent également qu'une mosaïque gonadique ne peut pas toujours expliquer le phénotype sexuel anormal des patients.

Dans un premier temps, l'article 6 « *Male pseudohermaphroditism and gonadal mosaicism in a 47,XY,+22 fetus* » discute des rôles possibles d'un faible mosaïcisme des gonosomes dans l'utérus et d'une duplication de *SOX10* dans le développement sexuel.

Dans un second temps, l'article intitulé « *Diagnosis of true hermaphroditism in a fetus with acampomelic campomelic dysplasia* » rapporte le second cas publié de désordre ovotesticulaire (hermaphrodisme vrai) chez un patient XY avec une mutation de *SOX9*. Il aborde également la question de la corrélation génotype-phénotype des patients avec une mutation de ce gène en discutant des mécanismes pouvant expliquer la variabilité du phénotype sexuel des patients.

Finalement, l'article 8 « *Functional Xp disomy and X;Y translocation in a female with gonadal dysgenesis: FISH and CGH array analyses* » présente le cas d'une fillette avec une translocation X;Y ayant causé une duplication du bras court du chromosome X et du gène *NROB1*. La corrélation génotype-phénotype de l'ensemble des cas de duplications Xp chez des individus XY est discutée.

Les co-auteurs des trois articles de ce chapitre se sont partagé les tâches comme suit :

- analyses histologiques et immunohistochimiques par Danh Tran-Thanh, Ph.D. (article 6), Jean-Christophe Fournet, M.D., Ph.D. (articles 6 et 7), Dorothée Bouron-Dal Soglio, M.D., M.Sc. (articles 6 et 7), et Pierre Brochu, M.D. (article 8);
- études radiographiques par Françoise Rypens, M.D. (article 7);
- recherche des mutations du gène *SOX9* par Gerd Scherer, Ph.D. (article 7);
- analyse des microsatellites par Catherine E. Hamelin (article 8);
- révision de l'histoire clinique par Emmanuelle Lemyre, M.D. (articles 6, 7 et 8) et Cheri Deal, M.D., Ph.D. (article 8);
- analyses cytogénétiques par Mélanie Beaulieu Bergeron
- rédaction des manuscrits par Catherine E. Hamelin (25% de l'article 8) et Mélanie Beaulieu Bergeron (100% des articles 6 et 7; 75% de l'article 8);
- supervision par Emmanuelle Lemyre, M.D., et Nicole Lemieux, Ph.D. (articles 6, 7 et 8).

**Article 6 - *American Journal of Medical Genetics Part A* 2006;
140A: 1768-1772.**

**Male pseudohermaphroditism and gonadal mosaicism in a
47,XY,+22 fetus.**

Mélanie Beaulieu Bergeron^{1,3,5}, Danh Tran-Thanh³, Jean-Christophe Fournet^{1,3,5},
Emmanuelle Lemyre^{2,4,5}, Nicole Lemieux^{1,3,5} and Dorothée Bouron-Dal Soglio^{1,3,5} *

¹Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, Montréal,
Québec, Canada

²Département de pédiatrie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

³Département de pathologie, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, Montréal,
Québec, Canada

⁴Service de génétique, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, Montréal, Québec,
Canada

⁵Centre de recherche, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, Montréal, Québec,
Canada

* **Correspondence to:** Dorothée Bouron-Dal Soglio, MD, M.Sc.
Département de pathologie
Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine

Received 23 February 2006; Accepted 6 May 2006

ABSTRACT

Trisomy 22 syndrome manifestations include cranial and facial anomalies. Ambiguous genitalia have been described in some fetus, but histological examination of the gonads has been rarely provided. We report here the first case of a male pseudohermaphrodite fetus with non-mosaic full trisomy 22 in amniocytes and presenting with ambiguous external genitalia, testes and a uterus. In this case, we have further analyzed cytogenetically gonadal and uterine tissues. FISH analyses on paraffin-embedded gonads and uterus indicated the presence of two cell lines: XY and monosomy X, with 22-50 % of uterine cells having monosomy X, while 85-100 % of right and 77-96 % of left testicular cells were XY. The distribution of sex chromosomes observed in these tissues could explain the sexual differentiation observed in this fetus. On the other hand, this phenotype could also have resulted from cryptic anomalies in one or several genes implicated in sexual differentiation. Further evidence is thus needed before identifying the true cause of pseudohermaphroditism in our patient.

Key words: trisomy 22; gonadal mosaicism; pseudohermaphroditism; sexual ambiguity; FISH; mos 47,XY,+22/46,X,+22

INTRODUCTION

Trisomy 22 is the second most common autosomal anomaly found in early spontaneous abortions after trisomy 16 [Hassold et al., 1980]. It has been described in two forms, each with a slightly different phenotype and natural history. Complete non-mosaic trisomy 22 generally results in intrauterine death. Liveborn children have been reported, but they have a limited life expectancy. Mosaic trisomy 22, although rare, is more compatible with prolonged survival [Crowe et al., 1997; Tinkle et al., 2003].

Trisomy 22 manifestations are variable and well described [Bacino et al., 1995; Crowe et al., 1997; Kukulich et al., 1989; Tinkle et al., 2003]. Anomalous genitalia have been reported in about 15 cases [Crowe et al., 1997; Tinkle et al., 2003]. However, in most of these, histologic examination of the gonads was not reported. The sole published case of complete trisomy 22 with histologic evaluation of gonads documented testicular tissue in a 47,XX,+22 infant [Nicholl et al., 1994]. We present a case of a completely non-mosaic trisomy 22 fetus of 21 weeks gestation, with ambiguous external genitalia, female internal genitalia and histologically confirmed testicular tissue in both gonads. To our knowledge, this represents the first reported case of a 47,XY,+22 fetus with histologically proven abnormal sex differentiation.

CLINICAL REPORT

A 31-year-old woman, with unremarkable medical history and mother of a healthy child, was referred during her second pregnancy for amniocentesis at 19 weeks of gestation after a second trimester ultrasound study showed oligohydramnios with intrauterine growth restriction (IUGR), and suspicion of heart malformation. Ultrasonography confirmed presence of complex heart anomalies (right ventricular and pulmonary artery hypoplasia, ventricular septal defect and transposition of great vessels). An ultrasound study at 21 weeks of gestation confirmed severe oligohydramnios and IUGR. Pregnancy was terminated at 21 weeks of gestation.

At autopsy, weight (174g) and crown-to-lump length (22cm) were consistent with 19 weeks of gestation, confirming the presence of symmetrical IUGR. There was generalized edema. Facial anomalies included dolichocephaly, hypertelorism, severe retrognathism, macrostomia, cleft palate, low-set and posteriorly angulated ears, and a pterygium colli (Fig. 1A and B). There was bilateral clinodactyly of 5th fingers, simian crease and proximally set thumbs, and rocker bottom feet (Fig. 1C). External genitalia were ambiguous with presence of either a hypertrophied clitoris or a penis with hypospadias, labia majora or scrotum with medial fissure. Anus was anteriorly positioned (Fig. 1D).

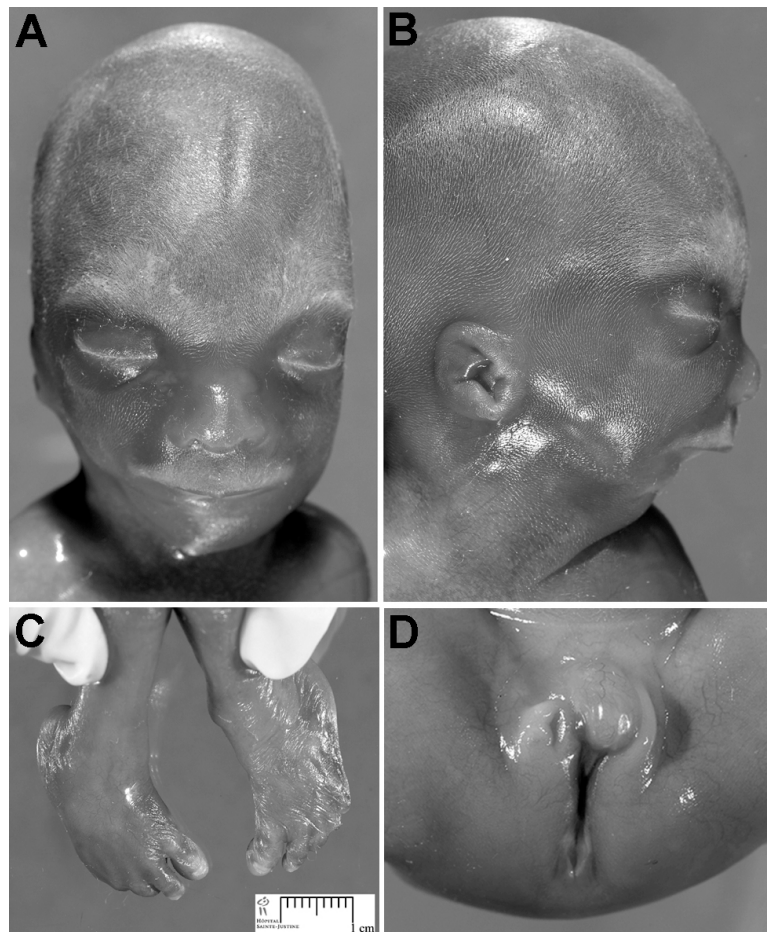


FIG. 1. **A:** Face, **(B)** profile, **(C)** rocker bottom feet and **(D)** external genitalia of the fetus.

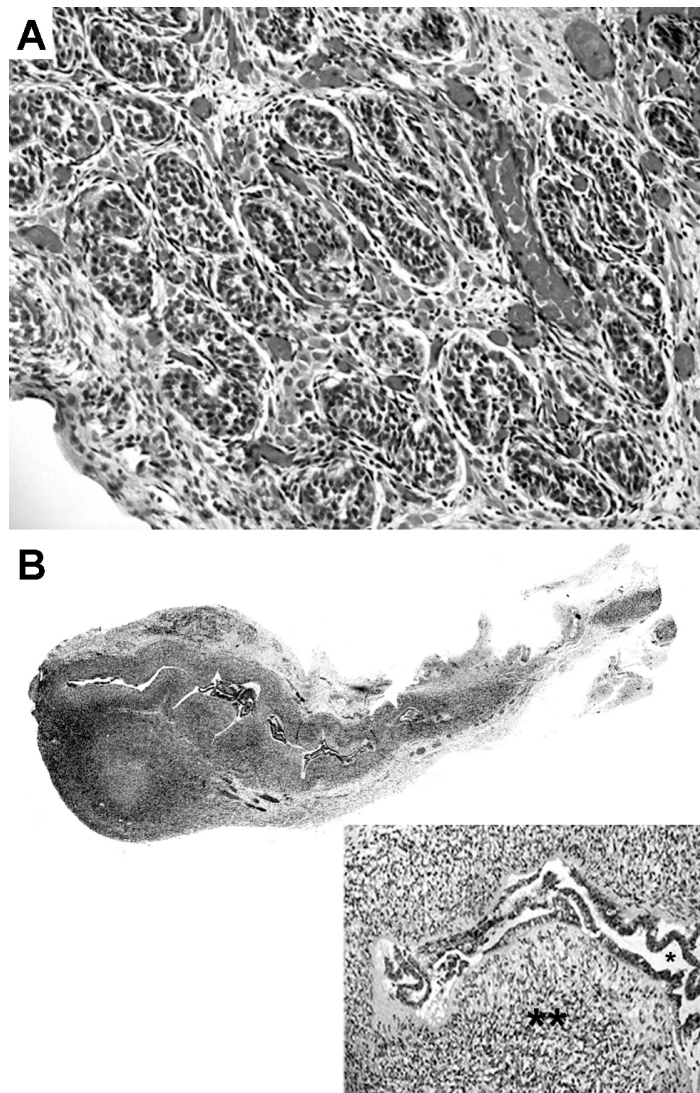


FIG. 2. Histological aspect of (A) testicular seminiferous tubules [HPSx400], and (B) fetal uterus [whole-mount view], revealing the endometrium (*) and myometrium (**) [insert, HPS X 400].

Cardiac anomalies included persistent left superior vena cava, pulmonary artery hypoplasia with tricuspid valve, right ventricular atresia, and large atrioventricular canal. There was thymic hypoplasia, a hypoplastic left kidney and absence of the right kidney. The left ureter was bifid with a para-ureteral cyst. A small uterus and two gonads were located in the pelvis. Histologic examination documented normal testicular tissue in both

gonads (Fig. 2A) and presence of a uterus (Fig. 2B). Gonads and uterus tissue were sent for further cytogenetic analysis.

MATERIALS AND METHODS

Cytogenetics and fluorescence in situ hybridization (FISH)

Amniotic fluid was cultured and fetal chromosomes were studied according to standard *in situ* protocols. Blood lymphocyte chromosomes from the parents, GTG- and C-banding were done following standard procedures. A total of 22 amniotic cells from 22 colonies were counted and analyzed; 30 metaphases were analyzed on each parent.

Chromosomes from amniocytes and blood lymphocytes from the mother were hybridized with probe D14Z1/D22Z1 (centromeres of chromosomes 14 and 22) (Roche Diagnostics, Laval, Qc, Canada); 10 metaphases in each were analyzed. Interphase FISH was performed on uncultured amniocytes using the AneuVysion probe mixture #1 CEP 18, X, Y-alpha satellite (centromeres of chromosomes 18, X and Y) (Vysis, Downers Grove, IL, USA); 40 nuclei were scored. FISH studies on paraffin-embedded gonads and the uterus of the fetus, and testicular tissue from a normal male were also performed in order to evaluate the X/Y mosaicism in these tissues. Suspensions of nuclei were obtained from 15 µm thick sections of formalin-fixed and paraffin-embedded gonadal and uterine tissues according to Kuchinka et al. [1995]. Hybridization and detection with probes CEP X (DXZ1)/Y (DYZ3) (X and Y centromeres) and CEP Y (DYZ1) (Yq12 heterochromatin) (Vysis) were performed as suggested by the manufacturer. LSI EWRS1 probe (*EWRS1* gene on 22q12) from Vysis was used as control. 65 to 110 cells were analyzed for each tissue.

RESULTS

Amniocentesis showed a homogenous cell line: 47,XY,+22. One chromosome 22 showed increase in length of the stalks on the short arm (Fig. 3A). Paternal karyotype was normal, but the mother had the same increase of the stalks on one of her chromosomes 22.

C-banding confirmed that the extra material in 22p in mother and fetus was heterochromatin; FISH with probe D14Z1/D22Z1 demonstrated that this extra material did not contain any alphoid sequences (Fig. 3B). FISH on uncultured amniocytes with the AneuVysion probe mixture showed that both sex chromosomes were present.

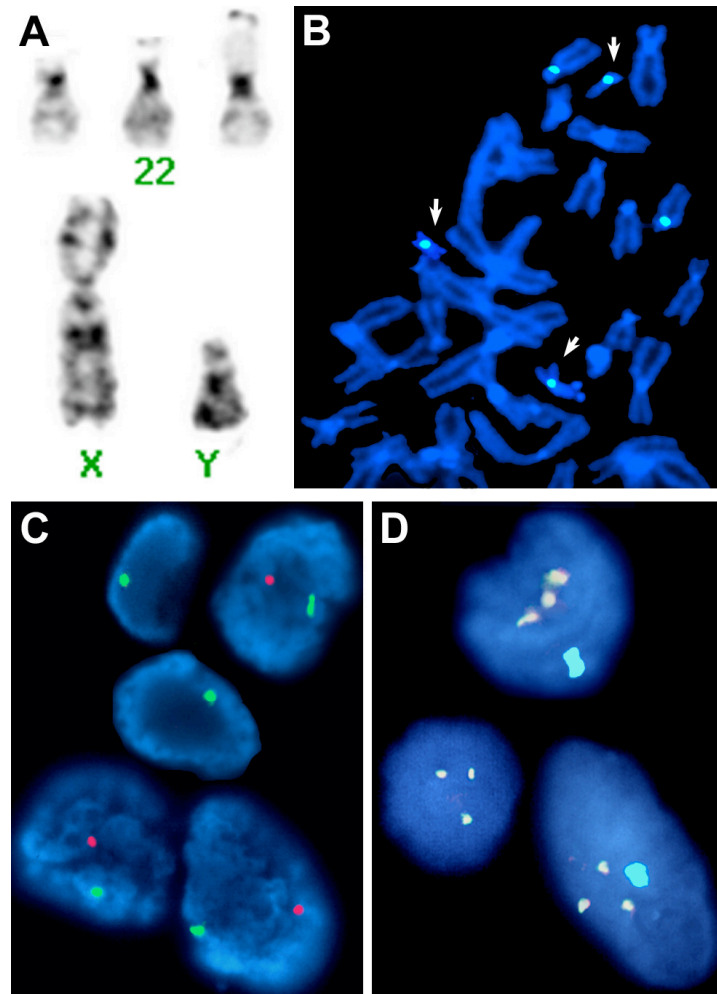


FIG. 3. **A:** Partial karyotype of fetal chromosomes 22, X, and Y. **B:** FISH on amniocytes with probe D14Z1/D22Z1 specific to the centromere of chromosomes 14 and 22: chromosomes 22 are indicated by arrows. Interphase FISH on nuclei of uterine cells using **(C)** the CEP X (DXZ1)/Y (DYZ3) probe specific for the X (green) and Y (red) centromeres, and **(D)** probe CEP Y (DYZ1) specific to the Yq12 heterochromatin (aqua). Probe LSI EWSR1 (*EWSR1* gene in 22q12) (yellow) was used as control.

On the other hand, FISH on gonads and uterus demonstrated the presence of two cell lines: XY and monosomy X. Most testicular cells had a signal for X and Y centromeres (85% in the left testis, and 77% in the right testis), while cells from the uterus showed a monosomic X signal in 50% of nuclei analyzed (Fig. 3C). 85% of nuclei in the male control were XY, while the remaining cells were monosomic for the X chromosome. FISH using probe CEP Y (Yq12) showed that 78% of uterine cells were positive for the Yq12 heterochromatin (Fig. 3D) compared to 96% (right) and 100% (left) of testicular cells. Unfortunately, no more gonadal tissues were available for further analyses.

DISCUSSION

The most common manifestations in complete non-mosaic trisomy 22 are cranial and facial anomalies, including apparently low-set ears, hypertelorism, retro/micrognathia, short nose and flat nasal bridge. Congenital heart defects and malformed kidneys are also well documented in many patients [Bacino et al., 1995; Crowe et al., 1997; Kukolich et al., 1989; Tinkle et al., 2003]. Genital anomalies have also been described, although well documented in less than 15 cases, as seen in Table I. As chromosome 22 may be implicated in sexual differentiation [Fleming and Vilain 2004; Seeherunvong et al., 2004], it is important to further characterize the nature of sexual ambiguity in patients with anomalies of this chromosome. In our case, we confirmed histologically the gonads as testes and the presence of a uterus. Thus, the fetus is a male pseudohermaphrodite.

TABLE I. Karyotype and description of genitalia and gonads of patients with anomalies of chromosome 22 and abnormal sexual differentiation

Karyotype	Genitalia	Left gonad	Right gonad	Adnexa	Reference
46,XX,rec(22)dup(22q)inv(22)(p13q13.1)	Ambiguous, small phallus	Ovarian tissue	Testis	Uterus, vagina, left tube	Aleck et al., 1999
46,XX,rec(22)dup(22q)inv(22)(p13q13.1)	Mild hypoplastic labia		---	---	Boyd et al., 2005
46,XX,rec(22)dup(22q)inv(22)(p13q12)	Hypoplastic labiaes	Ovarian dysgenesis		---	Cantu et al., 1981
46,XX,i(22),(qter→q10::q10→qter),+22	Ambiguous, clitoris/micropenis without urethral opening	Testicular tissues		Uterus, vaginal opening close to the anus, vesico-vaginal fistula	Manasse et al., 2000
46,XX,dup(22)(q11.2q13)	Male with hypospadias	Palpable gonads in the scrotum		---	Seeherunvong et al., 2004
46,XY,der(6)t(6;22)(q27;q13)	Male with hypospadias, short penis, bifid scrotum	Palpable testes in the inguinal regions		---	2 patients Schinzel 1981
47,XY,+der(22)t(11;22)(q23;q11)	Male, micropenis, glandular hypospadias	Testes in the inguinal rings		---	Schinzel et al., 1981
47,XY,+der(22)t(11;22)(q23;q11)	Male, micropenis, hypoplastic scrotum	No palpable testes		---	2 patients Schinzel et al., 1981
47,XY,+der(22)t(13;22)(q22;q12)	Male, small scrotum and penis	Abdominal testes		Rudimentary uterus, vagina	Kim et al., 1977
46,X,+22p/46,XY	Penis-like protuberance without urethral opening	Undifferentiated testis (30% XY)	Ovotestis (57% XY)	Uterus, right inguinal hernia, gynecoid urethral opening with urethral-vaginal fistula	Takano et al., 2003
47,XX,+22	Male, micropenis, fused scrotum	Abdominal testicular tissues		Rudimentary uterus and vagina	Nicholl et al., 1994
47,XY,+22	Ambiguous, overdeveloped vulva	None found (gonadal agenesis?)		---	Ladonne et al., 1996
47,XY,+22	Ambiguous, hypertrophied clitoris/penis with hypospadias	Abdominal testis (85-100% XY)	Abdominal testis (77-96% XY)	Rudimentary uterus (50-78% XY)	This report

Sexual differentiation and duplication 22q

Sexual differentiation is a complex phenomenon involving many genes. Additional chromosomal anomalies implicating no known causative genes have also been reported in cases of sex reversal, such as duplications of 22q and 10q26-qter, and deletions of bands 2q31 and 12q24.31 to 12q24.33 [Fleming and Vilain 2004]. Ambiguous genitalia or abnormal sexual differentiation are known in several syndromes involving mutations or deletions of such genes [Fleming and Vilain 2004; Mendonca et al., 2005; Migeon and Wisniewski 2003]. Recent evidence suggests that in cases of XX hermaphroditism or “sex reversal” with partial or full trisomy 22q, this phenotype could be caused by over-expression of *SOX10*, located at 22q13.1 [Seeherunvong et al., 2004]. This gene is related to the *SRY* (Yp11.3) and *SOX9* (17q24.3-q25.1) genes, which are implicated in male sexual differentiation [Fleming and Vilain 2004; Seeherunvong et al., 2004]. In fact, *SOX9* seems to be sufficient to induce male differentiation and could substitute for *SRY* in mice [Vidal et al., 2001], and a duplication of *SOX9* in a *SRY*-negative 46,XX male has been reported in humans [Huang et al., 1999]. Thus, *SOX10* could play a similar role to that of *SOX9* by substituting for *SRY*. Over-expression of this gene in a 46,XY *SRY*+ individual with 22q duplication could interfere with sex differentiation due to competition between *SOX10*, *SOX9* and *SRY*, resulting in sexual ambiguity [Seeherunvong et al., 2004]. Although this interference may explain the presence of a uterus in our XY patient, this is not a satisfying explanation. Indeed, as such interference would also be expected to happen in testicular tissues, one would expect the testes to be dysgenetic or undifferentiated. As proven by the histological exam, this is not the case in the fetus reported here.

Sex chromosomes gonadal mosaicism

On the other hand, gonadal sex chromosomes mosaicism was reported in several cases of individuals with pseudohermaphroditism or true hermaphroditism, gonadal dysgenesis or sex reversal [Johnson et al., 1979; Reddy and Sulcova 1998; Takano et al., 2003; Ropke et al., 2004]. These reports include sets of 45,X/46,XY monozygotic twins

discordant for phenotypic sex due to the presence of a sole cell line in the gonads, either 45,X (female twin) or 46,XY (male twin) [Costa et al., 1998]. Mosaic monosomy X with autosomal aneuploidy was reported in a few cases of trisomy 7, 8, 10, 13, 18 or 21 [Kovaleva and Mutton 2005; Niessen et al., 2005; Schubert et al., 2002]. We performed FISH analysis on the paraffin-embedded gonads of our patient. As this technique demonstrated 15% monosomy X in normal male gonadal tissue used as control, the mosaicism detected in both testes of our patient is probably not significant. However, the elevation of the monosomic X cell line observed in the uterus could be significant and could also explain the abnormal sexual differentiation observed in this fetus. Unfortunately, the sparsity of material submitted to cytogenetics did not allow for further analysis or confirmation of mosaicism in other tissues.

Our study therefore highlights the necessity of carefully examining external and internal genitalia and gonadal tissues in cases of partial or full trisomy 22, since sexual abnormalities can be present. Our case provides evidence that other chromosomal anomalies, such as hidden sex chromosome mosaicism, could also be found in cases of trisomy 22. Thus, the abnormal sexual differentiation of our proband may be explained by several mechanisms and further evidence is needed before pinpointing a definitive explanation. Specific tissue-expression of the various genes implicated in sexual determination, including *SRY*, *SOX9* and *SOX10*, might provide insightful clues as for the primary cause of the male pseudohermaphroditism of this fetus.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Denis Rodrigue for his help with the paraffin-embedded specimens, Stéphane Dédelis for his skilled photographic work, and Mubina Jovanovic for her help during the autopsy.

REFERENCES

- Aleck KA, Argueso L, Stone J, Hackel JG, Erickson RP. 1999. True hermaphroditism with partial duplication of chromosome 22 and without SRY. *Am J Med Genet* 85:2-4.
- Bacino CA, Schreck R, Fischel-Ghodsian N, Pepkowitz S, Prezant TR, Graham JM, Jr. 1995. Clinical and molecular studies in full trisomy 22: further delineation of the phenotype and review of the literature. *Am J Med Genet* 56:359-365.
- Boyd LJ, Livingston JS, Brown MG, Lawce HJ, Gilhooly JT, Wildin RS, Linck LM, Magenis RE, Pillers DAM. 2005. Meiotic exchange event within the stalk region of an inverted chromosome 22 results in a recombinant chromosome with duplication of the distal long arm. *Am J Med Genet Part A* 138A:355-360.
- Cantu JM, Hernandez A, Vaca G, Plascencia L, Martinez-Basalo C, Ibarra B, Rivera H. 1981. Trisomy 22q12-->qter: "aneusomie de recombinaison" of a pericentric inversion. *Ann Génét* 24:37-40.
- Costa T, Lambert M, Teshima I, Ray PN, Richer CL, Dallaire L. 1998. Monozygotic twins with 45,X/46,XY mosaicism discordant for phenotypic sex. *Am J Med Genet* 75:40-44.
- Crowe CA, Schwartz S, Black CJ, Jaswaney V. 1997. Mosaic trisomy 22: A case presentation and literature review of trisomy 22 phenotypes. *Am J Med Genet* 71:406-413.
- Fleming A, Vilain E. 2004. The endless quest for sex determination genes. *Clin Genet* 67:15-25.
- Hassold T, Chen N, Funkhouser J, Jooss T, Manuel B, Matsuura J, Matsuyama A, Wilson C, Yamane JA, Jacobs PA. 1980. A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Ann Hum Genet* 44:151-178.
- 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.
- Johnson JG, Byrd JR, McDonough PG. 1979. True hermaphroditism with peripheral blood and gonadal karyotyping. *Obstet Gynecol* 54:549-553.

- Kim HJ, Hsu LY, Goldsmith LC, Strauss L, Hirschhorn K. 1977. Familial translocation with partial trisomy of 13 and 22: Evidence that specific regions of chromosomes 13 and 22 are responsible for the phenotype of each trisomy. *J Med Genet* 14:114-119.
- Kovaleva NV, Mutton DE. 2005. Epidemiology of double aneuploidies involving chromosome 21 and the sex chromosomes. *Am J Med Genet Part A* 134A:24-32.
- Kuchinka B, Kalousek D, Lomax B, Harrison K, Barrett I. 1995. Interphase cytogenetic analysis of single cell suspensions prepared from previously formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Modern Pathol* 8:183-186.
- Kukolich MK, Kulharya A, Jalal SM, Drummond-Borg M. 1989. Trisomy 22: No longer an enigma. *Am J Med Genet* 34:541-544.
- Ladonne JM, Gaillard D, Carre-Pigeon F, Gabriel R. 1996. Fryns syndrome phenotype and trisomy 22. *Am J Med Genet* 61:68-70.
- Manasse BF, Pfaffenzeller WM, Gurtunca N, de Ravel TJ. 2000. Possible isochromosome 22 leading to trisomy 22. *Am J Med Genet* 95:411-414.
- Mendonca B, Domenice S, Costa E, Arnold I. 2005. Male pseudohermaphroditism. In: New M, editor. *Pediatric endocrinology*. South Dartmouth, MA: MDText.com, Inc. www.Endotext.org.
- Migeon CJ, Wisniewski AB. 2003. Human sex differentiation and its abnormalities. *Best Practice & Res Clin Obstet Gynaecol* 17:1-18.
- Nicholl RM, Grimsley L, Butler L, Palmer RW, Rees HC, Savage MO, Costeloe K. 1994. Trisomy 22 and intersex. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 71:F57-58.
- Niessen RC, Jonkman MF, Muis N, Hordijk R, van Essen AJ. 2005. Pigmentary mosaicism following the lines of Blaschko in a girl with a double aneuploidy mosaicism: (47,XX,+7/45,X). *Am J Med Genet Part A* 137A:313-322.
- Reddy KS, Sulcova V. 1998. Pathogenetics of 45,X/46,XY gonadal mosaicism. *Cytogenet & Cell Genet* 82:52-57.
- Ropke A, Pelz AF, Volleth M, Schlosser HW, Morlot S, Wieacker PF. 2004. Sex chromosomal mosaicism in the gonads of patients with gonadal dysgenesis, but normal female or male karyotypes in lymphocytes. *Am J Obstet Gynecol* 190:1059-1062.

- Schinzel A. 1981. Incomplete trisomy 22. II. Familial trisomy of the distal segment of chromosome 22q in two brothers from a mother with a translocation, t(6;22)(q27;q13). *Hum Genet* 56:263-268.
- Schinzel A, Schmid W, Auf der Maur P, Moser H, Degenhardt KH, Geisler M, Grubisic A. 1981. Incomplete trisomy 22. I. Familial 11/22 translocation with 3:1 meiotic disjunction. Delineation of a common clinical picture and report of nine new cases from six families. *Hum Genet* 56:249-262.
- Schubert R, Eggermann T, Hofstaetter C, von Netzer B, Knopfle G, Schwanitz G. 2002. Clinical, cytogenetic, and molecular findings in 45,X/47,XX,+18 mosaicism: clinical report and review of the literature. *Am J Med Genet* 110:278-282.
- Seeherunvong T, Perera EM, Bao Y, Benke PJ, Benigno A, Donahue RP, Berkovitz GD. 2004. 46,XX sex reversal with partial duplication of chromosome arm 22q. *Am J Med Genet Part A* 127A:149-151.
- Takano T, Yamanouchi Y, Tanaka F. 2003. True hermaphroditism with 46,X,+22p/46,XY and gonadal mosaicism detected by fluorescence in situ hybridization. *Ann Génét* 46:57-60.
- Tinkle BT, Walker ME, Blough-Pfau RI, Saal HM, Hopkin RJ. 2003. Unexpected survival in a case of prenatally diagnosed non-mosaic trisomy 22: Clinical report and review of the natural history. *Am J Med Genet Part A* 118A:90-95.
- Vidal VP, Chaboissier MC, de Rooij DG, Schedl A. 2001. Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nature Genet* 28:216-217.

Article 7 - Prenatal Diagnosis 2009; 29: 528–530.

**Diagnosis of true hermaphroditism in a fetus with acampomelic
campomelic dysplasia.**

Mélanie Beaulieu Bergeron^{1,3,6}, Emmanuelle Lemyre^{2,5,6}, Françoise Rypens⁴, Gerd Scherer⁷, Nicole Lemieux^{1,3,6} and Jean-Christophe Fournet^{1,3,6*}

¹Département de pathologie et biologie Cellulaire, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

²Département de pédiatrie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

³Département de pathologie, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada

⁴Département de radiologie, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada

⁵Service de génétique, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada

⁶Centre de recherche, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada

⁷Institute of Human Genetics and Anthropology, University of Freiburg, Freiburg, Germany

***Correspondence to:** Jean-Christophe Fournet, MD, Ph.D.
Département de pathologie
Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine

Received: August 27 2008; Revised: October 27 2008; Accepted: November 13 2008

Campomelic dysplasia is a rare syndrome affecting 0,5-1/100 000 live births and characterized by severe skeletal malformations (Kwok *et al.*, 1995) caused by mutations in the *SOX9* gene (Foster *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1994). Clinical findings include hypoplastic scapulae, 11 pairs of ribs, pelvic malformations, Robin sequence, clubbed feet, and bowed femora and tibiae. This latter feature is absent in 10% of cases, which are referred to as acampomelic campomelic dysplasia. Survival is very limited, as most infants die in the neonatal period due to respiratory insufficiency. Male-to-female sex reversal is seen in two thirds of karyotypic males (Mansour *et al.*, 1995). To our knowledge, true hermaphroditism has only been reported once before, in a family with a 46,XY true hermaphrodite, a 46,XY sex reversed female and a normal 46,XX female, all affected by campomelic dysplasia (Cameron *et al.*, 1996). We report here a 22-week-old 46,XY fetus with acampomelic campomelic dysplasia and true hermaphroditism.

During her first pregnancy, a 30-year-old French-Canadian woman, without any significant family history, was referred for amniocentesis after increased nuchal translucency was found at the first trimester ultrasound examination. At 17 weeks of gestation, the following ultrasound anomalies were found: pyelectasis, metatarsus adductus and rocker bottom feet, mild cerebral ventriculomegaly, increased occipital soft tissues, localized narrowing of the spine, and absence of the nasal bone. Follow-up ultrasound at 21 weeks of gestation showed in addition a small thorax with short ribs, peritoneal calcifications, and severe polyhydramnios. A 3D ultrasound exam further demonstrated hypoplastic nose, low-set ears, retrognathia, and flat facies. A cardiac ultrasound did not reveal any heart malformations. Pregnancy was terminated at 22 weeks of gestation after genetic counselling.

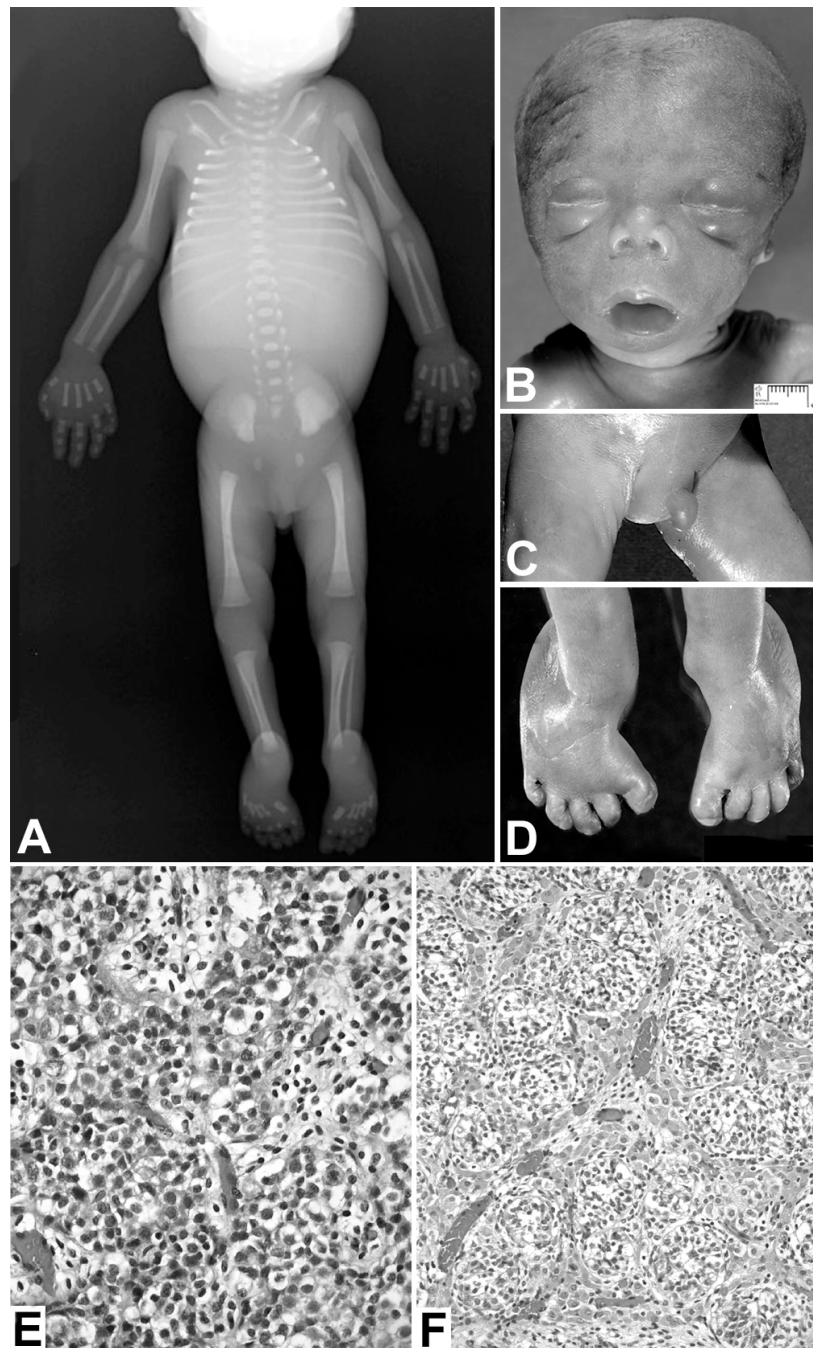


Figure 1 — Phenotypic aspect and (A) radiography of the fetus, with (B) enlarged view of the face, (C) genitalia and (D) feet. Histology of the (E) right normal ovary with numerous ovogonias, and the (F) left normal testis with seminiferous tubules separated by interstitial tissue containing numerous Leydig cells (HPSX200)

Radiological examination of the fetus revealed hypoplastic scapulae, ovoid hypoplasia of cervical vertebrae, pelvic hypoplasia, metatarsus adductus of the right foot, and bilateral prominent heels; femora, tibiae and fibulae were not bowed (Figure 1A). Pubic bones showed delayed ossification, nasal bones were missing and vertebral pedicles of the thorax were undermineralized (Figure 1A).

Autopsy findings revealed facial dysmorphisms (hypertelorism, proptosis of the eyes, hypoplastic nose with nasal bone hypoplasia, low-set and posteriorly rotated ears, long smooth philtrum, everted upper lip, and micrognathia) (Figure 1B), a posterior median cleft palate, discrete mandibular hypoplasia, excess nuchal skin, bilateral metatarsus adductus, and rocker bottom feet (Figure 1D). Fetal external genitalia were male (Figure 1C). Microscopic examination of the gonads disclosed true hermaphroditism. We observed an ovary on the right side (Figure 1E) and a testis on the left side (Figure 1F). Acampomelic campomelic dysplasia with true hermaphroditism was diagnosed.

Mutational analysis of the *SOX9* gene was performed by PCR amplification of the three exons, including the exon/intron boundaries, followed by DNA sequencing as described by Wagner *et al.* (1994). Amniocytes and fetal fibroblasts were obtained and prepared according to standard protocols. After standard GTG-banding, 30 fibroblastic cells and 10 amniotic cells from 10 colonies were analysed. Amniocytes were also hybridized with the subtelomeric Chromoprobe Multiprobe-T system from Cytocell (Cytocell, Cambridge, UK) as described by Gignac *et al.* (2006). Interphase FISH was also performed with the AneuVysion probe mixture #1 CEP 18, X, Y-alpha satellite (18, X and Y centromeres) and the CEP X (DXZ1)/Y (DYZ3) probe (X and Y centromeres) (Vysis, Downers Grove, IL, USA) on amniocytes (40 nuclei) and fibroblasts (193 nuclei) respectively, following the manufacturer's instructions.

Nuclei suspensions were obtained from 15- μ m thick sections of formalin-fixed and paraffin-embedded gonadal tissues from the fetus (ovary and testis) and a normal control male (testis), according to Kuchinka *et al.* (1995). Hybridization with probe CEP X

(DXZ1)/Y (DYZ3) (Vysis) was performed as suggested by the manufacturer; 80 (testis) and 130 (ovary) nuclei were analysed.

Mutational analysis of the *SOX9* gene of the fetus revealed a heterozygous insertion of a cytosine nucleotide within codon 381, between nucleotides 1514 and 1515 (1514-1515insC), causing a frameshift. Both parents were found to have a wild-type *SOX9* sequence, indicating that the frameshift mutation in the fetus occurred *de novo*.

Cytogenetic analysis on both amniocytes and skin fibroblasts revealed no chromosomal abnormalities, and the karyotype was established as 46,XY. Interphase FISH with centromeric probes for X and Y chromosomes confirmed the non-mosaic 46,XY karyotype in both fibroblasts and amniocytes, and FISH using all subtelomeric probes did not reveal any cryptic translocation, terminal duplication or deletion. FISH on a nuclei suspension derived from the paraffin-embedded gonads was also performed using X and Y centromeric probes. 65% of ovarian cells were positive for a Y chromosome, compared to 76% of testicular cells. The hybridization efficiency level on paraffin-embedded gonads from a normal male was 75%.

To our knowledge, the fetus we describe in this paper is the second case of campomelic dysplasia presenting with true hermaphroditism. However, gonads were examined at the microscopical level in only seven other cases of XY females. Four of these patients were said to have either streak gonads (Rodriguez 1993; Meyer *et al.*, 1997; Velagaleti *et al.*, 2005) or “poorly differentiated gonads with a substantial number of germ cells” (Foster *et al.*, 1994), whereas ovotestes (Cameron *et al.*, 1996) and normal ovaries (Foster *et al.*, 1994; Cameron *et al.*, 1996) were found in the three remaining cases.

The 1514-1515insC *SOX9* frameshift mutation at codon 381 we identified in the fetus leads to an extended reading frame. As a consequence, the SOX9 protein, which normally encompasses 509 amino acid residues, will be 576 amino acids long, consisting of 381 wild-type residues and of 195 mutant residues at the C terminus. This mutant protein

thus has its entire transactivating domain replaced by a mutant amino acid sequence. A frameshift mutation caused by a cytosine insertion was also found in the patient with true hermaphroditism in the familial case reported by Cameron *et al.* resulting in a truncated SOX9 protein of only 251 amino acid residues and lacking completely its C-terminus and transactivation domain (Cameron *et al.*, 1996).

Despite numerous reports, no clear genotype-phenotype has been drawn. Although 46,XY sex reversal is common in campomelic dysplasia (Mansour *et al.*, 1995) since *SOX9* is implicated in both chondrogenesis and the sex-determining pathway, it remains unclear why only two-thirds of XY individuals with campomelic dysplasia are sex reversed. Indeed, at least two cases of identical mutations leading to sex reversal in one individual but not in the other have been reported (Foster *et al.*, 1994; Hageman *et al.*, 1998; Kwok *et al.*, 1995; Meyer *et al.*, 1997), and no specific *SOX9* mutation has yet been clearly associated with sex reversal (Meyer *et al.*, 1997). In their original report, Cameron *et al.* explained the various range of sex reversal in the siblings by the variable penetrance or increased activity of the wild-type *SOX9* allele (Cameron *et al.*, 1996).

In our case, we have performed further cytogenetic analysis on the gonads of our proband to exclude the presence of sex chromosome mosaicism in his gonads. Indeed, 45,X/46,XY mosaicism in the gonads has been found to explain the abnormal sexual differentiation of female patients (Ropke *et al.*, 2004). As cytogenetic analyses on paraffin-embedded gonads from our normal male yielded 25 % of false negatives due to sliced nuclei and fixation conditions, there is probably no or very low mosaicism in the ovary (65% XY) and testis (76% XY) of our proband. Moreover, as no significant difference is found in the degree of “mosaicism” between each gonad, sex chromosome mosaicism is an unlikely explanation for the true hermaphroditism seen in this case. Because studies of gonadal mosaicism of the *SOX9* mutation were impossible to perform, the reason why the fetus presented here has a testis on the left side and an ovary on the right side remains unclear.

Since dimerization of SOX9 is necessary for chondrogenesis, but not for activation of the sex-determining pathway, and that post-translational modifications of SOX9 are essential for its nuclear translocation and male sexual development (reviewed in Sim et al., 2008), these recent findings could explain the variable sexual phenotype in campomelic dysplasia. For example, the main sumoylation site of SOX9 is located in the transactivation domain, and is required for synergy with SF1 (reviewed in Sim *et al.*, 2008). This interaction with SF1 might be very important for sexual development, as it enhances expression of AMH and that *SF1* initially activate expression of SOX9 by synergic action with SRY (Sekido and Lovell-Badge 2008). Furthermore, recent work on mice suggests that SOX9 is responsible for the nuclear localization of FGFR2, which in turn maintains SOX9 expression with the help of FGF9, as demonstrated by the double-heterozygous *Fgfr2/Sox9* knockout mice that develop ovotestes (reviewed in Sim *et al.*, 2008). It is thus possible that *SOX9* mutations lead to a variable range of sex reversal when associated with polymorphisms in *FGFR2* or any other genes implicated in the feedback loop responsible for maintaining *SOX9* expression. The present case report thus confirms that true hermaphroditism can occur in rare instances of campomelic dysplasia. However, other studies are necessary before a clear genotype-phenotype correlation can be drawn regarding sex reversal in this syndrome.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Denis Rodrigue for his skills with the paraffin-embedded specimens, Mubina Jovanovic for her assistance during the autopsy, Andrée Grignon for her medical expertise, Elke Bausch for her expert technical assistance with the *SOX9* mutation analysis, and Stéphane Dédelis for his photographic work.

REFERENCES

- Cameron FJ, Hageman RM, Cooke-Yarborough C, *et al.* 1996. A novel germ line mutation in SOX9 causes familial campomelic dysplasia and sex reversal. *Hum Mol Genet* **5**: 1625-1630.
- Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, *et al.* 1994. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* **372**: 525-530.
- Gignac J, Danis K, Tihy F, Lemyre E. 2006. Prenatal detection of subtelomeric rearrangements by multi-subtelomere FISH in a cohort of fetuses with major malformations. *Am J Med Genet* **140A**: 2768-2775.
- Hageman RM, Cameron FJ, Sinclair AH. 1998. Mutation analysis of the SOX9 gene in a patient with campomelic dysplasia. *Hum Mutat Suppl* **1**: S112-113.
- Kuchinka B, Kalousek D, Lomax B, Harrison KJ, Barrett IJ. 1995. Interphase cytogenetic analysis of single cell suspensions prepared from previously formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Mod Pathol* **8**: 183-186.
- Kwok C, Weller PA, Guioli S, *et al.* 1995. Mutations in SOX9, the gene responsible for campomelic dysplasia and autosomal sex reversal. *Am J Hum Genet* **57**: 1028-1036.
- Mansour S, Hall CM, Pembrey ME, Young ID. 1995. A clinical and genetic study of campomelic dysplasia. *J Med Genet* **32**: 415-420.
- Meyer J, Sudbeck P, Held M, *et al.* 1997. Mutational analysis of the SOX9 gene in campomelic dysplasia and autosomal sex reversal: lack of genotype/phenotype correlations. *Hum Mol Genet* **6**: 91-98.
- Rodríguez JI. 1993. Vascular anomalies in campomelic syndrome. *Am J Med Genet* **46**: 185-192.
- Ropke A, Pelz AF, Volleth M, Schlösser HW, Morlot S, Wieacker PF. 2004. Sex chromosomal mosaicism in the gonads of patients with gonadal dysgenesis, but normal female or male karyotypes in lymphocytes. *Am J Obstet Gynecol* **190**: 1059-1062.
- Sekido R, Lovell-Badge R. 2008. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature* **453**: 930-934.

- Sim H, Argentaro A, Harley VR. 2008. Boys, girls and shuttling of SRY and SOX9. *Trends Endocrinol Metab* **19**: 213-222.
- Velagaleti GV, Bien-Willner GA, Northup JK, *et al.* 2005. Position effects due to chromosome breakpoints that map approximately 900 Kb upstream and approximately 1.3 Mb downstream of SOX9 in two patients with campomelic dysplasia. *Am J Hum Genet* **76**: 652-662.
- Wagner T, Wirth J, Meyer J, *et al.* 1994. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* **79**: 1111-1120.

Article 8 - *En préparation.*

Functional Xp disomy and X;Y translocation in a female with gonadal dysgenesis: FISH and CGH array analyses.

Mélanie Beaulieu Bergeron^{1,4,7}, Catherine E. Hamelin^{3,5,7}, Cheri Deal, Ph.D., M.D., FRCPC^{2,3,5,7}, Pierre Brochu, M.D.⁴, Emmanuelle Lemyre, M.D., FRCPC, FCCMG^{2,6,7}, and Nicole Lemieux, Ph.D.^{1,4,7}

¹Département de pathologie et biologie cellulaire et ²Département de pédiatrie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

³Division of Experimental Medicine, McGill University, Montréal, Québec, Canada

⁴Département de pathologie, ⁵Service d'endocrinologie, ⁶Service de génétique, et ⁷Centre de recherche, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada

Corresponding author : Nicole Lemieux, Ph.D.
Département de pathologie et biologie cellulaire
Université de Montréal

Abstract

Background: Sex development in humans is very complex. Many genetic or chromosomal anomalies can alter this process and result in disorders of sex development, leading to individuals with XY gonadal dysgenesis or XX testicular disorders of sex development. Disomy of Xp with two active copies of *NROB1* (*DAX1*) has been reported in eight patients with a der(Y)t(X;Y). We report here the case of a girl presenting growth and developmental delay, hypotonia, agenesis of the corpus callosum, type II atrial septal defect, facial dysmorphisms, hypertelorism, camptodactyly, normal female external genitalia and pure gonadal dysgenesis associated with a 46,X,der(Y)t(X;Y) karyotype. **Methods:** We report the first molecular characterization by array CGH, FISH, and microsatellites genotyping of a female with XY pure gonadal dysgenesis and Xp duplication. **Results:** Breakpoint on the X chromosome was found to be in Xp21.1; the size of the Xp duplication was estimated at 34,670 Mb. The Y breakpoint was localized in Yq11.23. Genotyping of X-linked microsatellites confirmed paternal origin of the duplicated Xp material on the der(Y). The final karyotype of this patient is thus 46,X,der(Y)t(X;Y)(p21.1;q11.23) and the patient has two active copies of all genes within Xp21.1-pter, including *NROB1*. **Conclusion:** Molecular characterization by array CGH of other cases of XY gonadal dysgenesis with functional disomy Xp will allow for a better genotype-phenotype correlation in the future.

Key Words

Disorders of sex development • *NROB1* (*DAX1*) duplication • Xp disomy • XY gonadal dysgenesis • X-Y translocation • Array CGH

Introduction

Sex development in humans is very complex, involving several genes on both autosomes and gonosomes. Many genetic or chromosomal anomalies can alter this process and result in disorders of sex development, leading to discordance between the genetic and phenotypic sex. Approximately 90% of 46,XX individuals with testicular disorders of sex development bear a normal copy of the *SRY* gene [1], whereas only 10-20% of 46,XY individuals with pure gonadal dysgenesis have a mutation or a deletion of *SRY* [1, 2]. While only a subset of cases of XX testicular disorders of sex development are unexplained, the cause of sex development disorder remains unknown in most XY patients. Duplications of *NROBI* (formerly known as *DAXI*) in Xp21.2 have been reported in a small number of individuals with XY gonadal dysgenesis [3, 4].

The exact role of *NROBI* in sexual development remains obscure, but it is thought to be involved in both male and female sexual development, depending on its dosage, binding partners and expression timing [5]. Since 47,XXY patients normally develop as males, *NROBI* is logically silenced on the inactive X chromosome and there is thus normally only one active copy of *NROBI* in both males and females. In this paper, we report the first molecular characterization by FISH and array CGH of a female with XY pure gonadal dysgenesis and a duplication of the Xp region containing *NROBI* secondary to an unbalanced X;Y translocation [t(X;Y)].

Case report

The proband, a female infant, was born at 38^{5/7} weeks with a birth weight of 3 395 g after a normal pregnancy and delivery. She presented at 9 days with weight loss, perioral cyanosis and respiratory distress due to pneumonia. Physical examination showed hypertelorism, prominent forehead and nose, down-slanting palpebral fissures, thin lip, high-arched palate, camptodactyly, long thumbs, hypoplastic and widely spaced nipples, marked hypotonia, and female external genitalia. A type II atrial septal defect, gastro-oesophageal reflux, and pulmonary bronchodysplasia were subsequently documented.

Initial cytogenetic analysis revealed an XY karyotype with an abnormal Y chromosome. A uterus was visualized on ultrasonography. No signs of virilization were observed. Familial history revealed no consanguinity and the parents presented normal, sex-specific karyotypes. Hormonal evaluation at 2 months showed an elevation of serum FSH (17.2 IU/L), a normal serum LH (2.6 IU/L), and an undetectable serum testosterone. At 4 months, an hCG stimulation test did not result in any increase in serum testosterone. A pre-operative diagnosis of gonadal dysgenesis was therefore made.

At the time of gonadectomy (age 1.5 y), dysgenetic gonads composed of streaks showing an ovarian cortex-like fibrous tissue were found. Immature sex cords were present in both gonads, but immature germ cells were associated with these cords in only one gonad. On both sides, there were some tubules of rete ovarii and a Fallopian tube with mesonephric tubules. One calcification was found in the right streak; no Leydig cells were present.

The patient's infancy was characterized by intermittent failure to thrive due to multiple hospitalizations for respiratory infections and chronic pneumopathy, but height and weight were maintained at the 25-50th percentile with gavage feeding during early childhood. Neurological evaluation at age 4 revealed global developmental delay, persistent central hypotonia, choreoathetosis, and multifocal myoclonia. Magnetic resonance imaging (MRI) findings revealed mild gyral simplification, hypoplastic corpus callosum and periventricular loss of white matter. Her neurological prognosis remains reserved, and at most recent endocrine evaluation (age 9.0 y), she was wheelchair bound with no speech, although responsive to caregivers. Her height and weight had declined to the 5th percentile, due in large part to multiple hospitalizations for recurrent pneumonias, and she had Tanner 2 pubic hair although DHEAS and gonadotropins were still in the pre-pubertal range.

Materials and methods

Chromosome preparation and Fluorescence in situ Hybridization (FISH)

Genetic analyses were undertaken following parental informed consent. Peripheral blood lymphocytes chromosomes were prepared and G-banded according to standard protocols [6]. FISH with probes recognizing the heterochromatin (DYZ1), centromere (DYZ3) (Oncor, Gaithersburg, MD, USA), subtelomeric regions (TelVysion Xp/Yp and Xq/Yq), and SRY-region (SRY) (Vysis, Downers Grove, IL, USA) on the Y chromosome was performed as described by the manufacturers. Whole chromosome painting for the X (WCPX) (AL Technologies, Arlington, VA, USA) and Y chromosomes (WCPY) (Vysis), probe pERT84-10 (DXS142) recognizing part of the *DMD* gene in Xp21.1 [7], and BAC clones (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) mapping in Yq11.223 (RP11-5C5), Yq11.23 (RP11-1077O23, RP11-933N2, RP11-263C17 and RP11-945P24) and covering part of the *NROB1* gene in Xp21.2 (RP11-153D5) were also hybridized [modified from 8]. All BACs positions are given according to the UCSC Genome Browser 2006 hg18 assembly (<http://genome.ucsc.edu>).

Genotyping of X-linked microsatellites

Determination of parental origin of the intact X chromosome was performed by genotyping of microsatellites DXS1053 (Xp22.22), DXS538 (Xp21.1), DXS1068 (Xp11.4), DXS1003 (Xp11.3), DXS1204 (Xp11.22), DXS981 (Xq13.1), and DXS986 (Xq21.1). These markers were amplified by PCR with commercially available primers (MapPairs Human Markers[®]) through Invitrogen, and PCR reactions were carried out on leukocyte DNA from the subject and her parents as described by Hamelin et al. [9]. Specifications regarding primers sequence and allele size were previously obtained through the former Genome DataBase web site (<http://www.gdb.org>).

Array Comparative Genomic Hybridization (array CGH)

CGH was performed as suggested by the manufacturer with the Nimblegen CGX-12 array from Roche (Madison, WI, USA), containing approximately 135 000 oligonucleotides with maximum probe spacing of one probe every 35 kb throughout the genome and one probe every 10 kb in clinical regions.

Results

The 46,XY GTG-banded karyotype of the proband showed an abnormal, linear Y chromosome (fig. 1B). Probes DYZ3 (not shown) and SRY (fig. 1A, C) each showed one normally positioned signal. FISH with probe DYZ1 was negative, whereas a large portion of the long arm of the abnormal Y chromosome was not stained using the WCPY probe. Presence of material from the X chromosome on the abnormal Y was confirmed with probe WCPX (fig. 1D). Subtelomeric probes Xp/Yp and Xq/Yq (fig. 1A, E) confirmed that the X-material at the distal end of the long arm of the abnormal Y chromosome was a duplicated part of the short arm of the X. These results suggested that the abnormal Y chromosome derived from an unbalanced X;Y translocation [t(X;Y)].

Hybridization with BAC RP11-153D5 covering part of the *NROBI* gene (position 30,234,170-30,398,637 in Xp21.2) (fig. 1A, F) and probe DXS142 recognizing part of the *DMD* gene (position 33,125,855-33,126,108 in Xp21.1) was positive on the der(Y), indicating that the breakpoint on Xp was proximal to *DMD* in Xp21.1 (fig. 1A). Array CGH confirmed that the Xp duplication included *NROBI*; the breakpoint of this 34,670 Mb duplication was mapped in the middle of Xp21.1, proximal to *DMD*, at position 34,886,074. As the Yq11.223-11.23 region of the Y chromosome is not well covered by the array, we performed FISH with BAC clones of this region to localize the Y breakpoint. Analyses showed that the breakpoint was in the overlapping region between BACs RP11-1077O23 and RP11-933N2, at position 26,690,555-26,856,266 in the very distal end of Yq11.23. Indeed, BACs RP11-5C5 (Yq11.223) (fig. 1A) and RP11-1077O23 (Yq11.23)

(fig. 1A, G) were present on the der(Y) whereas BACs RP11-933N2 (fig. 1A), RP11-263C17 and RP11-945P24 (Yq11.23) were all absent on the abnormal Y chromosome.

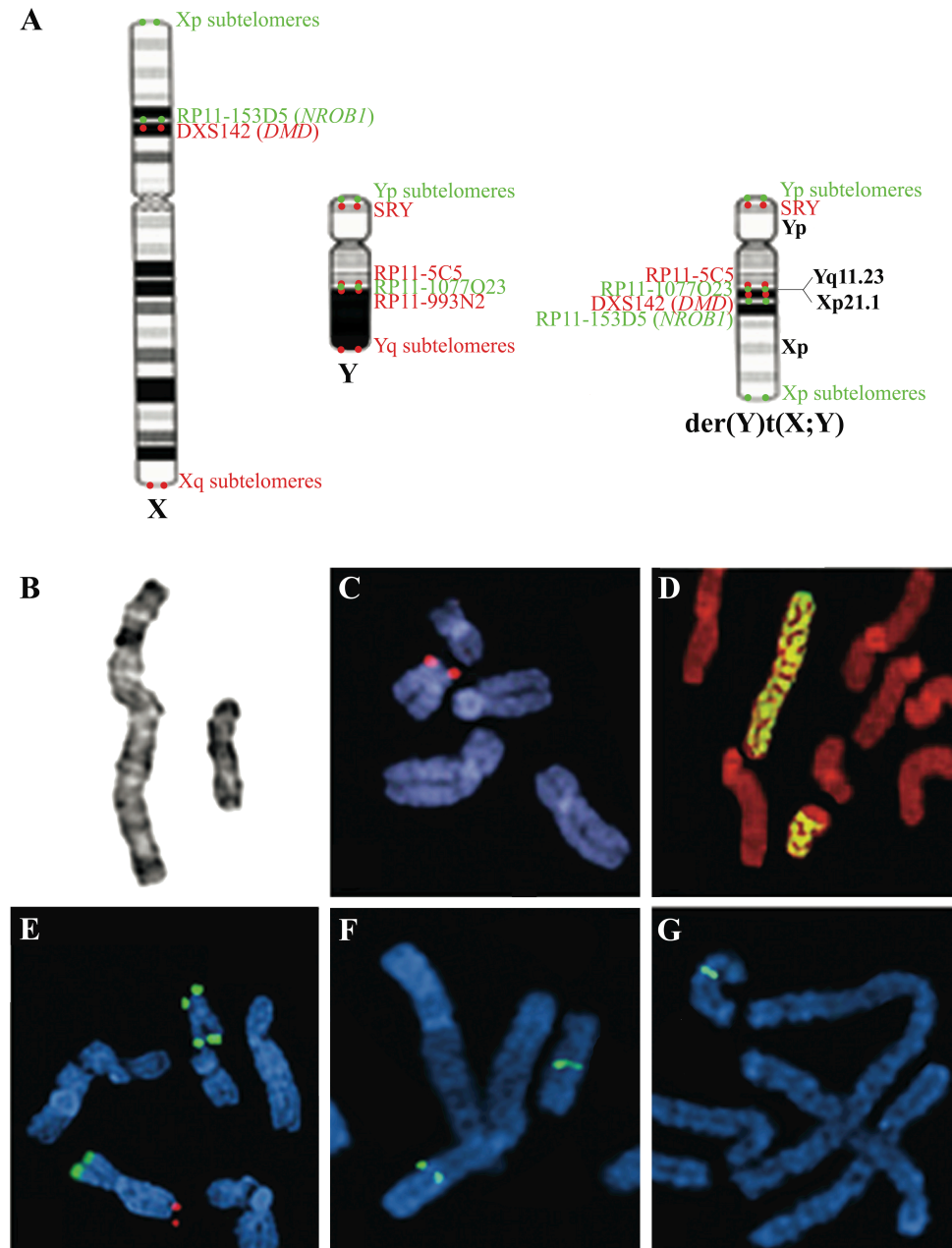


Fig. 1. **A** Idiogram of normal X and Y chromosomes, as well as the der(Y), with position of FISH probes. **B** Partial GTG karyotype of the proband's gonosomes. FISH with **C** SRY, **D** WCPX, **E** subtelomeres Xp/Yp (green) and Xq/Yq (red), and BAC clones **F** RP11-153D5 covering part of *NROB1* (Xp21.2) and **G** RP11-1077O23 (Yq11.23).

Microsatellites genotyping of the short and long arm of the X chromosome confirmed that the intact X was of maternal origin, whereas the duplicated Xp segment was of paternal origin (table 1). Indeed, genotyping revealed that microsatellite DXS538 (position 34,224,557-34,224,743 in Xp21.1) had a heterozygous genotype reflecting the presence of both maternal and paternal alleles, whereas microsatellite DXS1068 (position 38,792,933-38,793,314 in Xp11.4) had a hemizygous genotype reflecting the loss of the paternal allele (table 1). Therefore, the final karyotype of our proband is 46,X,der(Y)t(X;Y)(p21.1;q11.23), resulting in a partial Xp disomy (middle of Xp21.1 to Xpter) and a partial Yq nullisomy (distal Yq11.23 to Yqter) due to a *de novo* translocation in a paternal gamete. However, as the Y breakpoint is distal to the last gene in Yq11.23, the Yq nullisomic segment is essentially made of Yq12 heterochromatin and PAR2 genes. This PAR2 loss was detected on array CGH.

Table 1. Summarized results of Xp and Xq microsatellite genotyping. Alleles are expressed according to their length in base pairs.

	DXS1053 (Xp22.22)	DXS538 (Xp21.1)	DXS1068 (Xp11.4)	DXS1003* (Xp11.3)	DXS1204 (Xp11.22)	DXS981 (Xq13.1)	DXS986 (Xq21.1)
Patient	203 - 197	179 - 181	247	181	241	184	160
Mother	203	155 - 181	247 - 251	181 - 183	241	184 - 191	160 - 156
Father	197	179	257	181	243	188	158

* Non informative

Discussion

After reviewing the literature, we found, in addition to the present case, eight published cases of 46,X,der(Y)t(X;Y) patients with functional Xp disomy, including four patients with female-like genitalia and gonadal dysgenesis; the remaining four patients had a male phenotype (table 2). Two females [10, 11] had breakpoints in the distal end of Yp11.3, whereas the remaining six patients had variable breakpoints in the long arm of the

Y chromosome [3, 12, 13, 14, 15]. As for the X breakpoint, it was located either in Xp21 or Xp22 in all eight cases.

Sequences of X-Y homology other than pseudoautosomal regions are known to be present on the X and Y due to the evolution of sex chromosomes. Abnormal recombination between homologous sequences has been implicated in Xp22.3;Yp11.2 [16] and Xp22.3;Yq11 [17, 18] translocations. Particularly, recombination between homologous genes *PRKX* (Xp22.33) and *PRKY* (Yp11.2) is known to be responsible for approximately 30% of XX *SRY*⁺ individuals with testicular disorder of sex development and XY *SRY*⁻ individuals with gonadal dysgenesis [19]. Among the eight published cases of der(Y)t(X;Y) reviewed here, abnormal homologous recombination can only be excluded in the two cases of t(X;Y)(p21;p11.3) [10, 11], as no homology is known to exist between the pseudoautosomal region in Yp11.3 and the Xp21 region. In the remaining six published cases of t(Xp;Yq), this can not be excluded since breakpoints were not molecularly defined. As for our proband, no Xp-Yq homologous sequences were found in the breakpoint regions in Xp21.1 or Yq11.23, excluding abnormal homologous recombination as a cause for the translocation in that particular case.

Phenotypic importance of the nullisomic Y segment in 46,X,der(Y)t(X;Y) patients is difficult to assess. However, since 46,XY males with Yq deletions do not usually present with the symptoms seen in patients with Xp disomy [20], this suggests that the phenotypic features seen in patients with a t(X;Y) and a breakpoint in Yq are for most part due to the double dosage of Xp genes. As for the 46,X,der(Y)t(X;Y)(p21.2;p11.3) patient reported by Sanlaville et al. [11], the Y breakpoint was located between Yp subtelomeres and pantelomeres, therefore greatly limiting the phenotypic implications of Yp gene loss. On the other hand, the patient reported by Ogata et al. [10] was found to have haploinsufficiency of the distal part of the pseudoautosomal region, including *SHOX*. Indeed, the Yp breakpoint was found to be proximal to *SHOX*, whereas the duplicated Xp segment (Xp21.2-Xp22.33) was also found to lack *SHOX*. Patients with deletions of the Xp/Yp pseudoautosomal region, with or without haploinsufficiency of *SHOX*, have been reported to suffer from

either idiopathic short stature, Leri-Weill dyschondroostosis or Langer mesomelic dysplasia [21, 22], and can present with short stature, mesomelia, Madelung wrists deformities, scoliosis, high-arched palate, muscular hypertrophy, and limb aplasia. This haploinsufficiency of the Xp/Yp pseudoautosomal region thus contributed to an unknown extent to the phenotype reported by Ogata et al. [10]. Finally, in the case described by Ghosh et al. [15], the clinical report is greatly limited by the fact that this is a 24 weeks old fetus.

In spite of these considerations, our proband and the eight published XY patients with Xp disomy secondary to a t(X;Y), whether male or female, have a similar general phenotype. Indeed, the following phenotypic features are often reported: psychomotor retardation (5/8), growth/developmental delay (5/8), speech retardation (4/8), hypotonia (5/8), cardiac (5/9), cerebral (5/9) and cranial (5/9) anomalies, strabismus/esotropia (4/8), cleft/high-arched palate (8/9), and long, slim or thin fingers (4/9) (table 2). This is very similar to the phenotype of all XY patients with functional disomy Xp, either after an Xp duplication or a translocation, detailed by Baumstark et al. [4]. As for cerebral anomalies, only two patients [11, this report] have agenesis of the corpus callosum (ACC). ACC is one of the most frequent malformations of the central nervous system, and is associated with several autosomal chromosome deletions and duplications [23, 24, 25]. Deletions of Xp22.3 or Xq12-q21 have been associated with ACC [23], and ACC is also thought to be part of several X-linked genetic syndromes [24]. However, no putative locus for ACC has yet been identified in cases of Xp duplications. Therefore, the ACC observed in our patient and that of Sanlaville et al. [11] may have been caused by another small chromosome rearrangement or a mutation.

Table 2. Comparison of phenotypic features reported in cases of Xp disomy with 46,X,der(Y)t(X;Y) constitutions.

Reference	[10]	[11]	[13]	[14]	Present case	[3, 12] RR	[3, 12] TM	[3, 12] SR	[15] ^a	Total of cases
Breakpoints	Xp21p22.3; Yp11.3	Xp21.2; Yp11.3	Xp21.1; Yq11	Xp21; Yq11	Xp21.1; Yq11.23	Xp21.3; Yq11.21	Xp22.1; Yq11.23	Xp22.1; Yq11.22	Xp22.13; Yq11.23	
Features										
External genitalia	F	F	F	F/A ^b	F	M/A ^c	M	M	M	---
Mental retardation			+		+				NA	2/8
Developmental delay		+		+	+				NA	3/8
Psychomotor retardation	+	+				+	+	+	NA	5/8
Growth delay		+	+	+	+			+	NA	5/8
Speech retardation		+		+	+		+		NA	4/8
Clumsy gait						+	+	+	NA	3/8
Hypotonia	+	+		+	+		+	+	NA	5/8
Muscular hypotrophy						+	+	+	NA	3/8
No head/trunk control		+		+					NA	2/8
Asymmetric limb/pelvis							+	+		3/9
Scoliosis/kyphosis							+	+		2/9
Respiratory infections					+	+	+		NA	3/8
Cerebral anomalies		+			+		+	+	+	5/9
Cardiac anomalies		+	+		+	+	+			5/9
Cranial anomalies	+	+	+		+		+			5/9
Bitemporal narrowing		+	+							2/9
Long face						+	+	+		3/9
Hypertelorism					+				+	2/9
Strabismus/esotropia		+				+	+	+	NA	4/8
Epicanthus								+	+	2/9
Down-slanting palpebral fissures	+				+			+		3/9
Low set ears	+	+		+						3/9
Beaked nose					+			+		2/9
Micrognathia		+					+			2/9
Prognathic chin						+	+			2/9
Cleft/high-arched palate	+	+	+		+	+	+	+	+	8/9
Syndactyly						+		+		2/9
Long/thin fingers					+	+	+	+		4/9
Valgism of knees/elbows						+	+	+		3/9
Flat feet						+	+	+		3/9
Scarce hair		+		+					NA	2/8

M: male; F: female; A: ambiguous; ^a Post-mortem findings on a 24 weeks old fetus; NA: not available;

^b perineal hypospadias and bifid scrotum; ^c 1.5 cm long clitoris with enlarged but unfused labia majora with a scrotal appearance.

So far, no precise correlation between the size and localization of the duplicated fragment in Xp and specific phenotypic features has been observed in any XY patient with Xp disomy [4, 26] except for duplications of approximately 600-800 kb surrounding *NROBI* in Xp21.2, which seem to only cause gonadal dysgenesis [26, 27]. This may be explained in part by the fact that most of the breakpoints were not investigated on a molecular level, making it difficult to determine precisely which genes were duplicated. However, Gimelli et al. [28] reported in 2002 the case of an XY patient with ambiguous genitalia and a duplication of Xp21.1-p22.11, with breakpoints in the *DMD* gene (distal Xp21.1) and in distal Xp22.11. The patient presented many of the phenotypic features reported in XY patients with Xp disomy: psychomotor development delay, muscular hypotrophy, hypotonia, triangular elongated face, micrognathia, large low-set ears, valgi and flat feet, recurrent respiratory infections, and cerebral anomalies. The patient also suffered from keratosis follicularis spinulosa decalvans (KFSD), possibly inherited from his mother who presented with follicular hyperkeratosis and alopecia. Gimelli et al. [28] confirmed by PCR and FISH that the duplication, of less than 10 Mb, included *NROBI*. This suggests that this 10 Mb region in Xp21.1-p22.12 may play an important role in the phenotypic features associated with Xp disomy.

As for sex development, all XY patients in whom the disomic Xp fragment include *NROBI*, whether they have an Xp duplication or translocation, exhibit gonadal dysgenesis and female genitalia [4]. Five patients, in whom the status of *NROBI* is uncertain, were reported to have ambiguous genitalia [3, 12, 29] or male genitalia [30]. Histological analysis of the gonads confirmed the absence of gonadal dysgenesis in only that latter case. Another patient with male genitalia in whom the status of *NROBI* was unknown was also reported by Nielsen et al. [31]. However, as the patient was found to be a mosaic with a normal 46,XY cell line, this might explain his normal male phenotype, irrespective of the exact Xp21.2 breakpoint and whether or not it contains *NROBI*.

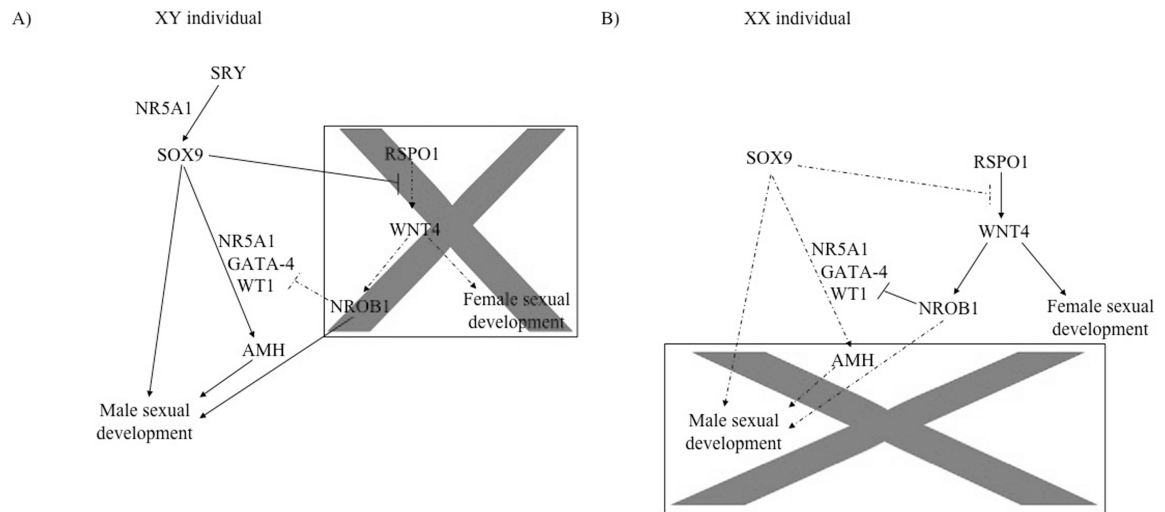


Fig. 2. Postulated interactions between *SRY*, *SOX9*, *RSPO1*, *WNT4*, *NROB1*, and *NR5A1* during sexual development. **A** In XY individuals, the up-regulation of *SOX9* by *SRY* and *NR5A1* prevents the action of *RSPO1/WNT4/NROB1* and thus female sex development. *AMH* is secreted, since the inhibitory action of *NROB1* is over-riden by the upregulation of *SOX9*. **B** In XX individuals, absence of *SRY* leads to female sex development through *RSPO1/WNT4/NROB1*. *AMH* is not secreted, since the inhibitory action of *NROB1* overrides the *SOX9*-mediated transcription of the hormone.

The exact role of *NROB1* in sexual development remains unknown. In XY individuals, *SRY* would up-regulate *SOX9* together with *NR5A1* [32]. *SOX9* would then inhibit the *RSPO1/WNT4* axis [33, 34], while *NROB1* would be necessary for both differentiation and function of Sertoli cells and normal male development [35] (fig. 2A). In XX individuals, in the absence of *SRY*, *SOX9* would not be up-regulated, enabling the up-regulation of *WNT4* by *RSPO1* [36, 37]. Up-regulation of *WNT4* would indirectly activate *NROB1* [38], inhibiting the cooperation of *GATA-4/WT1* with *NR5A1* to repress the expression of *AMH* [39, 40] (fig. 2B). In XY individuals with disomy of *NROB1*, the dosage of this latter gene would somehow tip the balance toward a female development and lead to gonadal dysgenesis.

Conclusion

We report here the first molecular characterization by array CGH of an XY patient with gonadal dysgenesis and a functional 34,670 Mb Xp disomy due to an unbalanced X;Y translocation. Duplication of *NROB1* was confirmed, explaining the sex development disorder of this female. Although she presents some phenotypic traits that are rarely seen in other cases of XY gonadal dysgenesis with functional Xp disomy, no additional duplications or deletions were found by array CGH in this patient. Nonetheless, her general phenotype and that of other published cases of Xp disomy due to an unbalanced X;Y translocation is in accordance with the reported phenotype of all XY patients with a functional Xp disomy. Molecular characterization of the breakpoints and more precise evaluation of the Xp duplication in other cases of Xp disomy should allow for a better genotype-phenotype correlation in the future.

Acknowledgements

We thank Martin DesGroseilliers for his participation to the redaction of this manuscript. We are also grateful to Géraldine Mathonnet for array CGH analyses.

References

- 1 McElreavey K, Barboux S, Ion A, Fellous M: The genetic basis of murine and human sex determination: A review. *Heredity* 1995;75:599-611.
- 2 Cameron FJ, Sinclair AH: Mutations in SRY and SOX9: Testis-determining genes. *Hum Mut* 1997;9:388-395.
- 3 Bardoni, B, Zanaria E, Guioli S, Floridia G, Worley KC, Tonini G, Ferrante E, Chiumello G, McCabe ERB, Fraccaro M, Zuffardi O, Camerino G: A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat Genet* 1994;7:497-501.

- 4 Baumstark A, Barbi G, Djalali M, Geerkens C, Mitulla B, Mattfeld T, Cabral de Almeida JC, Vargas FR, Llerena Jr JC, Vogel W, Just W: Xp-duplications with and without sex reversal. *Hum Genet* 1996;97:79-86.
- 5 Ludbrook LM, Harley VR: Sex determination: A 'window' of DAX1 activity. *Trends Endocrinol Metab* 2004;15:116-121.
- 6 Lemieux N, Drouin R, Richer CL: High-resolution dynamic and morphological G-bandings (GBG and GTG): A comparative study. *Hum Genet* 1990;85:261-266.
- 7 Kunkel LM, Monaco AP, Middlesworth W, Ochs HD, Latt SA: Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with an X chromosome deletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:4778-4782.
- 8 Lemieux N, Dutrillaux B, Viegas-Pequignot E: A simple method for simultaneous R- or G-banding and fluorescence in situ hybridization of small single-copy genes. *Cytogenet Cell Genet* 1992;59:311-312.
- 9 Hamelin CE, Anglin G, Quigley CA, Deal CL: Genomic imprinting in Turner syndrome: Effects on response to growth hormone and on risk of sensorineural hearing loss. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3002-3010.
- 10 Ogata T, Hawkins JR, Taylor A, Matsuo N, Hata J-I, Goodfellow PN: Sex reversal in a child with a 46,X,Yp+ karyotype: Support for the existence of a gene(s), located in distal Xp, involved in testis formation. *J Med Genet* 1992;29:226-230.
- 11 Sanlaville D, Vialard F, Thepot F, Vue-Droy L, Ardalan A, Nizard P, Corré A, Devauchelle B, Martin-Denavit T, Nouchy M, Malan V, Taillemite J-L, Portnoi M-F: Functional disomy of Xp including duplication of DAX1 gene with sex reversal due to t(X;Y)(p21.2;p11.3). *Am J Med Genet A* 2004;128A:325-330.
- 12 Bardoni B, Floridia G, Guioli S, Peverali G, Anichini C, Cisternino M, Casalone R, Danesino C, Fraccaro M, Zuffardi O, Camerino G: Functional disomy of Xp22-pter in three males carrying a portion of Xp translocated to Yq. *Hum Genet* 1993;91:333-338.
- 13 Bajalica S, Blennow E, Tsezou A, Galla-Voumvouraki A, Alevizaki M, Sinaniotis C, Kitsiou-Tzeli S: Partial disomy of Xp and the presence of SRY in a phenotypic female. *J Med Genet* 1995;32:987-990.

- 14 Vasquez AI, Rivera H, Mayorquin A, Mejia-Baltodano G, Escalante A, Sanchez-Corona J: Sex reversal due to Xp disomy by t(X;Y)(p21;q11). *Genet Couns* 1999;10:301-304.
- 15 Ghosh A, Higgins L, Larkins SA, Miller C, Ostojic N, Martin WL, Kilby MD: Prenatal diagnosis and prenatal imaging of a de novo 46,X,der(Y)t(X;Y)(p22.13;q11.23) leading to functional disomy for the distal end of the X chromosome short arm from Xp22.13 in a phenotypically male fetus with posterior fossa abnormalities. *Prenat Diagn* 2008;28:1068-1071.
- 16 Weil D, Wang I, Dietrich A, Poustka A, Weissenbach J, Petit C: Highly homologous loci on the X and Y chromosomes are hot-spots for ectopic recombination leading to XX maleness. *Nature Genet* 1994;7:414-419.
- 17 Yen PH, Tsai S-P, Wenger SL, Steele MW, Mohandas TK, Shapiro LJ: X/Y translocations resulting from recombination between homologous sequences on Xp and Yq. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:8944-8948.
- 18 Guioli S, Incerti B, Zanaria E, Bardoni B, Franco B, Taylor K, Ballabio A, Camerino G: Kallmann syndrome due to a translocation resulting in an X/Y fusion gene. *Nature Genet* 1992;1:337-340.
- 19 Schiebel K, Winkelmann M, Mertz A, Xu X, Page DC, Weil D, Petit D, Rappold GA: Abnormal XY interchange between a novel isolated protein kinase gene, PRKY, and its homologue, PRKX, accounts for one third of all (Y+)XX males and (Y-)XY females. *Hum Mol Genet* 1997;6:1985-1989.
- 20 Hsu LYF: Phenotype/karyotype correlations of Y chromosome aneuploidy with emphasis on structural aberrations in postnatally diagnosed cases. *Am J Med Genet* 1994;53:108-140.
- 21 Palka G, Stuppia L, Guanciali Franchi P, Chiarelli F, Fischetto R, Borrelli P, Giannotti A, Fioretti G, Rinaldi MM, Mingarelli R, Rappold GA, Calabrese G: Short arm rearrangements of sex chromosomes with haploinsufficiency of SHOX gene are associated with Leri-Weill dyschondrosteosis. *Clin Genet* 2000;57:449-453.

- 22 Benito-Sanz S, Thomas SN, Huber C, Gorbenko del Blanco D, Aza-Carmona M, Crolla JA, Maloney V, Argente J, Campos-Barros A, Cormier-Daire V, Heath KE: A novel class of pseudoautosomal region 1 deletions downstream of SHOX is associated with Leri-Weill dyschondrosteosis. *Am J Hum Genet* 2005;77:533-544.
- 23 Dobyns WB. Absence makes the search grow long. *Am J Hum Genet* 1996;58:7-16.
- 24 Schell-Apacik CC, Wagner K, Bihler M, Ertl-Wagner B, Heinrich U, Klopocki E, Kalscheuer VM, Muenke M, von Voss H: Agenesis and dysgenesis of the corpus callosum: Clinical, genetic and neuroimaging findings in a series of 41 patients. *Am J Med Genet A* 2008;146A:2501-2511.
- 25 Tyshchenko N, Lurie I, Schinzel A: Chromosomal map of human brain malformations. *Hum Genet* 2008;124:73-80.
- 26 Barbaro M, Oscarson M, Schoumans J, Staaf J, Ivarsson SA, Wedell A: Isolated 46,XY gonadal dysgenesis in two sisters caused by a Xp21.2 interstitial duplication containing the DAX1 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:3305-3313.
- 27 Barbaro M, Cicognani A, Balsamo A, Löfgren Å, Baldazzi L, Wedell A, Oscarson M: Gene dosage imbalance in patients with 46,XY gonadal DSD detected by an in-house-designed synthetic probe set for multiplex ligation-dependent probe amplification analysis. *Clin Genet* 2008;73:453-464.
- 28 Gimelli G, Giglio S, Zuffardi O, Alhonen L, Suppola S, Cusano R, Lo Nigro C, Gatti R, Ravazzolo R, Seri M: Gene dosage of the spermidine/spermine N¹-acetyltransferase (SSAT) gene with putrescine accumulation in a patient with a Xp21.1p22.12 duplication and keratosis follicularis spinulosa declavans (KFSD). *Hum Genet* 2002;111:235-241.
- 29 Arn P, Chen H, Tuck-Muller CM, Mankinen C, Wachtel G, Li S, Shen C-C, Wachtel SS: SRVX, a sex reversing locus in Xp21.2-p22.11. *Hum Genet* 1994;93:389-393.
- 30 Nielsen KB, Langkjaer F: Inherited partial X chromosome duplication in a mentally retarded male. *J Med Genet* 1982;19:222-224.

- 31 Nielsen KB, Dyggve HV, Knudsen H, Olsen J: A chromosomal survey of an institution for the mentally retarded: Study of 476 karyotypes with banding techniques and clinical assessment of patients with chromosome anomalies. *Dan Med Bull* 1983;30:5-13.
- 32 Sekido R, Lovell-Badge R: Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature* 2008;453:930-934.
- 33 Kim Y, Kobayashi A, Sekido R, DiNapoli L, Brennan J, Chaboissier M-C, Poulat F, Behringer RR, Lovell-Badge R, Capel B: Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biol* 2006;4:e187 available at www.plosbiology.org/article/info:doi/10.1371/journal.pbio.0040187
- 34 Bernard P, Harley VR: Wnt4 action in gonadal development and sex determination. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:31-43.
- 35 Meeks JJ, Crawford SE, Russell TA, Morohashi K-I, Weiss J, Jameson JL: Dax1 regulates testis cord organization during gonadal differentiation. *Development* 2003;130:1029-36.
- 36 Chassot AA, Ranc F, Gregoire EP, Roepers-Gajadien HL, Taketo MM, Camerino G, de Rooij DG, Schedl A, Chaboissier M-C: Activation of beta-catenin signalling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum Mol Genet* 2008;17:1264-1277.
- 37 Tomizuka K, Horikoshi K, Kitada R, Sugawara Y, Iba Y, Kojima A, Yoshitome A, Yamawaki K, Amagai M, Inoue A, Oshima T, Kakitani M: R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating Wnt-4 signaling. *Hum Mol Genet* 2008;17:1278-1291.
- 38 Mizusaki H, Kawabe K, Mukai T, Ariyoshi E, Kasahara M, Yoshioka H, Swain A, Morohashi K-I: Dax-1 (dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenital critical region on the X chromosome, gene-1) gene transcription is regulated by Wnt4 in the female developing gonad. *Mol Endocrinol* 2003;17:507-519.
- 39 Nachtigal MW, Hirokawa Y, Enyeart-VanHouten DL, Flanagan JN, Hammer GD, Ingraham HA: Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell* 1998;93:445-454.

- 40 Tremblay JJ, Viger RS: Nuclear receptor Dax-1 represses the transcriptional cooperation between GATA-4 and SF-1 in Sertoli cells. *Biol Reprod* 2001;64:1191-1199.

Discussion générale

Dans un premier temps, nous discuterons des phénomènes moléculaires pouvant expliquer la formation des Y isodicentriques et des translocations X;Y, deux des remaniements les plus fréquents du chromosome Y. Nous nous attarderons ensuite aux facteurs qui peuvent affecter la stabilité des chromosomes Y normaux ou remaniés dans les cellules afin d'expliquer le mosaïcisme variable des gonosomes retrouvé chez les patients. Dans un troisième temps, nous réviserons les anomalies génomiques et cytogénétiques que nous avons étudiées dans les cas de développement sexuel anormal. Nous discuterons particulièrement des anomalies dont l'implication sur le développement sexuel n'est pas bien définie, notamment la disomie fonctionnelle de *NROBI* en Xp21.2; la duplication de *SOX10* en 22q13.1; les altérations de *SOX9* en 17q24.3 et les différents polymorphismes qui peuvent en affecter la pénétrance; ainsi que la variabilité phénotypique des patients avec une t(X;Y). Finalement, nous présenterons les données les plus récentes sur la pathogenèse des tumeurs gonadiques chez les patients avec une dysgénésie gonadique et discuterons des implications de la présence de tissu gonadique indifférencié chez ces patients.

B.1 Les mécanismes sous-jacents aux remaniements de structure les plus fréquents du chromosome Y

B.1.1 Les chromosomes Y isodicentriques

B.1.1.1 Palindromes et séquences répétées

Tel qu'expliqué dans la section A.3.2.1 de l'introduction (page 74), il a été démontré récemment par Lange et coll. [2009] qu'une recombinaison entre des séquences répétées d'orientation inversée présentes sur chacune des chromatides-sœurs d'un chromosome Y répliqué peut mener à la formation d'un chromosome Y isodicentrique [idic(Y)] (Figure 6B de l'introduction, page 75). En analysant 78 cas d'idic(Y), Lange et coll. [2009] ont trouvé qu'une telle recombinaison entre palindromes pouvait expliquer 49 cas; dans 7 autres cas, la

cassure avait bel et bien eu lieu dans les palindromes, mais il n'y avait pas eu de recombinaison. Dans notre cohorte de 10 patients avec un idic(Y), nous avons également remarqué que 4 des 10 cas ont une cassure dans les palindromes; de plus, un cinquième cas montre une cassure très près de l'extrémité d'un palindrome [Figure 2 de l'article 2, page 135]. Toutefois, l'implication des palindromes dans la formation des idic(Y) n'est peut-être pas uniquement imputable à la propension de ces séquences à se recombiner entre elles.

En effet, les séquences répétées d'orientation inversée riches en bases AT ont tendance à former des structures secondaires telles que des cruciformes ou des épingles à cheveux [Edelmann et coll., 2001; Kogo et coll., 2007]. Trois de ces plus célèbres séquences, situées sur les chromosomes 11, 17 et 22, sont susceptibles aux remaniements: translocations 11;22 ou 17;22, et délétions interstitielles du chromosome 22 (syndrome de DiGeorge) [revu dans McDermid et Morrow, 2002; Kogo et coll., 2007; Kurahashi et coll., 2010]. C'est que ces structures secondaires, surtout formées dans les cellules germinales lors de la méiose, seraient susceptibles aux cassures double-brin, pouvant ainsi causer divers remaniements (Figure 13, page 265) [Kurahashi et coll., 2006; 2010]. Bien que les palindromes et les séquences répétées inversées du chromosome Y n'aient pas été investigués quant à cet aspect précis lors de notre étude, il semble que les palindromes du Y puissent aussi former des épingles à cheveux et qu'une cassure au sein de ces structures puisse mener entre autres à des délétions interstitielles [Repping et coll., 2002], notamment dans les régions AZFb/c (Figure 3 de l'introduction, page 46) [Repping et coll., 2002; Yang et coll., 2007]. Il est donc concevable qu'une cassure double-brin dans une épingle à cheveux formée suite à l'appariement d'un palindrome ou de séquences répétées inversées puisse également entraîner la formation d'un idic(Y) par recollement en U (Figure 13E), en plus du mécanisme de réparation par recombinaison homologue avec enjambement identifié par Lange et coll. [2009]. Cela pourrait d'ailleurs expliquer les 7 cas d'idic(Y) avec cassure dans les palindromes rapportés par ce groupe où une recombinaison a été exclue.

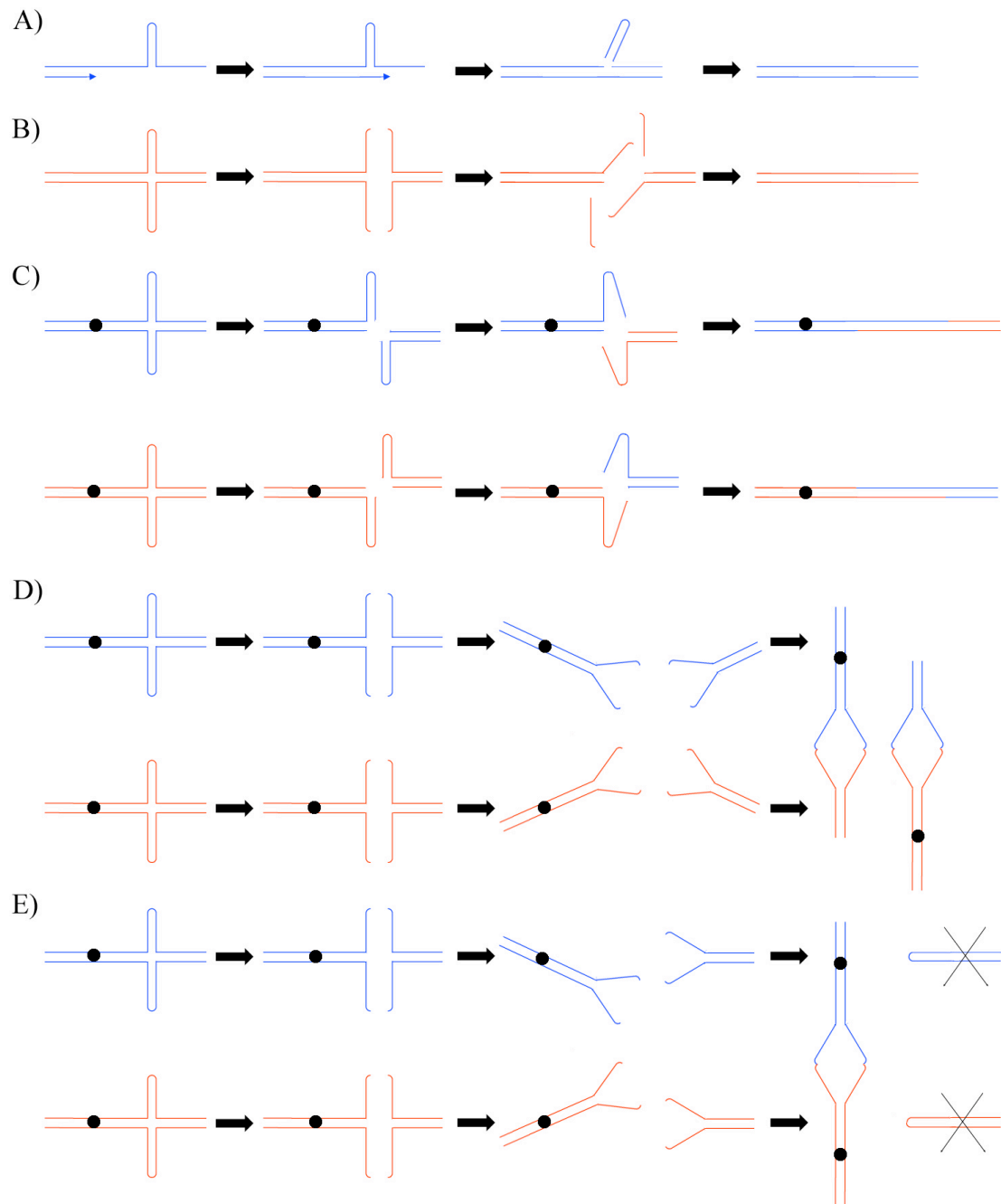


Figure 13: Remaniements possibles suite à une cassure dans les structures secondaires formées par des palindromes situés sur les chromatides d'un même chromosome ou de chromosomes différents, soit une délétion interstitielle (A et B), un échange entre chromatides-sœurs (C), une translocation (D), ou un chromosome dicentrique (E). *Modifiée de Kurahashi et coll. [2006].*

Dans notre étude sur les idic(Y) [article 2, page 126], les analyses cytogénétiques effectuées ne permettent malheureusement pas de déterminer par quel mécanisme la formation de l'idic(Y) a eu lieu dans chaque cas où la cassure se trouvait dans ces séquences. Cependant, nos résultats démontrent eux aussi que ces régions sont à risque d'être impliquées dans ce type de remaniement.

B.1.1.2 Hétérochromatine Yq12

Par ailleurs, ce ne sont pas tous les idic(Y) qui ont un point de cassure dans les palindromes, tel que démontré par notre étude ainsi que par celle de Lange et coll. [2009]. Parmi les autres régions impliquées, l'hétérochromatine Yq12 est intéressante pour deux raisons. La première, c'est que la même organisation des séquences Alu, d'ADN satellite et des séquences riches en bases AT observée dans la région instable du chromosome 22 (voir la section B.1.1.1 à la page 263) a été retrouvée dans la région péricentromérique des chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22, ainsi qu'en Yq12 [Babcock et coll., 2007]. En fait, cette fameuse organisation des séquences Alu et d'ADN satellite fait partie de la séquence DYZ2 dont est en partie composée l'hétérochromatine du Y et dont nous avons brièvement discutée en introduction dans la section A.1.4.1.2 (page 48). La formation de structures secondaires dans l'hétérochromatine du chromosome Y pourrait expliquer non seulement certaines translocations ainsi que sa variation de longueur (section A.1.4.2.1, page 49) [Babcock et coll., 2007], mais elle pourrait également entraîner la formation d'idic(Y) avec cassure en Yq12, tel qu'observé chez deux de nos patients dans l'article 2 (page 126). Bien que de telles séquences soient également retrouvées sur d'autres chromosomes, la formation d'un chromosome isodicentrique ne serait probablement pas viable, étant donné la morbidité des monosomies et des trisomies autosomiques, même partielles, tel que discuté dans l'introduction. Dans ces cas, des délétions interstitielles et des translocations seraient alors plus fréquemment observées.

Dans un deuxième temps, on peut également faire un parallèle entre la richesse en bases AT de l'hétérochromatine et les sites fragiles retrouvés sur plusieurs chromosomes chez l'humain. Les sites fragiles sont des endroits sur les chromosomes où l'on retrouve, de façon non aléatoire, des bris, des lacunes ou des pincements lorsque les cellules sont exposées à des conditions spécifiques de culture [revu dans Lukusa et Fryns, 2008]. Les sites fragiles sont classés en deux grands groupes selon leur fréquence: les sites fragiles rares, qui sont visibles sur les chromosomes chez moins de 5% des gens dans des conditions spécifiques de culture, et les sites fragiles communs, qui sont visibles sur les chromosomes de tous les individus dans des conditions appropriées de culture. La plupart des sites fragiles communs sont riches en AT, ce qui suggère que la présence de ces bases azotées en plus grande quantité à un endroit précis confère une certaine instabilité à l'ADN [revu dans Lukusa et Fryns, 2008]. Tel que discuté précédemment, ces régions riches en AT peuvent former des structures secondaires qui peuvent entraîner des délétions, des échanges entre chromatides-sœurs ou des translocations. D'ailleurs, des données moléculaires récentes suggèrent que 52% des translocations récurrentes retrouvées dans les cancers présenteraient au moins un point de cassure dans un site fragile, parmi lesquels 65% sont des sites fragiles communs [Burrow et coll., 2009]. De plus, même dans les cellules non cancéreuses, une augmentation du taux d'échange entre chromatides-sœurs a été noté au niveau des sites fragiles communs [Glover et Stein, 1987; revu dans Lukusa et Fryns, 2008]. La présence des séquences riches en AT rendrait la réplication de ces régions plus difficile, de sorte que la moindre interférence dans le processus engendrerait un découplage entre l'hélicase et la polymérase [revu dans Glover et coll., 2005]. L'hélicase ayant pour but de dérouler la double hélice d'ADN devant la polymérase afin de permettre à cette dernière d'effectuer la réplication, le découplage de ces deux enzymes créerait des segments d'ADN simple brin devant la polymérase. Si le point de contrôle n'est pas activé et que la réplication de ces segments ne se termine pas, ces régions d'ADN simple brin ne seront pas condensées correctement (lacunes), ce qui pourrait entraîner des cassures et causer des délétions. Le point de contrôle des bris à l'ADN pourrait alors être activé afin de permettre la réparation de l'ADN; toutefois, des erreurs peuvent se produire lors de la réparation, entraînant des échanges entre chromatides-sœurs ou des translocations [revu dans Glover et coll., 2005].

L'hétérochromatine Yq12 ne contient aucun site fragile répertorié. Toutefois, tel que récemment avancé par Puliti et coll. [2010], certaines régions du génome en dehors des sites fragiles démontrent des similarités évidentes en terme de propriétés avec ces derniers: composition riche en AT, capacité à former des structures secondaires et réplication sensible aux interférences. Ces régions ne sont toutefois pas considérées comme des sites fragiles car l'incidence statistique des cassures à cet endroit n'est pas assez élevée dans les cellules [Puliti et coll., 2010]. Parmi les séquences citées, on note la région du chromosome 22 qui est propice aux remaniements. Or, tel que mentionné plus tôt, une région identique est également retrouvée en Yq12 [Babcock et coll., 2007]. Il est donc possible que la nature et l'organisation des séquences de l'hétérochromatine du bras long du Y fassent en sorte que cette région soit susceptible aux cassures, et que certaines de ces cassures soient « réparées » par un recollement en U menant à la formation d'idic(Y) (Figure 6A de l'introduction, page 75).

B.1.2 Les translocations X;Y

B.1.2.1 Gènes *PRKX* et *PRKY*

Tel que mentionné en introduction (section A.3.2.1, page 74), il a été démontré qu'une inversion paracentrique du bras court du chromosome Y est un facteur de risque pour les translocations X;Y étant donné qu'elle place les gènes *PRKX* et *PRKY* dans la même orientation [Jobling et coll., 1998; Sharp et coll., 2005]. Cette inversion du chromosome Y a été retrouvée dans 16 des 47 haplotypes du Y analysés par Repping et coll. [2006]. N'étant détectable qu'en FISH, sa fréquence exacte dans la population est inconnue; on estime cependant qu'elle serait présente chez environ 30% des individus dans la population européenne [Jobling et coll., 1998]. Dans le cas des translocations X;Y, Sharp et coll. [2005] ont retrouvé cette inversion chez 8 des 15 hommes avec désordre testiculaire (hommes XX) ou ovotesticulaire (hermaphrodites XX) du développement sexuel qu'ils ont testés; les 7 autres patients n'ont pas pu être testés étant donné que le point de cassure sur leur chromosome Y était distal à l'inversion et que cette région ne se trouvait donc plus sur

le dérivé X de la translocation. Cependant, ce ne sont pas tous les individus avec une $t(X;Y)$ et une inversion qui ont un point de cassure dans *PRKX/PRKY* et dont la translocation $X;Y$ peut être attribuée à une recombinaison anormale entre ces deux gènes. Ainsi, dans l'étude de Sharp et coll. [2005], bien que 8 patients aient été porteurs de l'inversion, seul l'un d'entre eux a un point de cassure impliquant les microsatellites correspondant aux gènes *PRKX* et *PRKY*. On est donc loin du chiffre avancé par Schiebel et coll. en 1997, qui ont rapporté qu'une recombinaison *PRKX-PRKY* était impliquée dans 13 des 30 cas de $t(X;Y)$ qu'ils ont étudiés. Toutefois, Schiebel et coll. ont seulement analysé le point de cassure du Y, pas celui du X; ils ont supposé qu'un point de cassure dans le gène *PRKY* signifiait qu'il y avait eu recombinaison entre les deux gènes. Cela pourrait expliquer en partie les divergences observées entre les deux études.

Par ailleurs, il est également possible que la région contenant les gènes *PRKX* et *PRKY* ait une structure favorisant les cassures. C'est du moins l'hypothèse avancée par Klink et coll. en 1995 pour expliquer le fait que 2 de leurs patients avec une délétion en Xp22.33 et en Yp11.2 ont un point de cassure dans *PRKX* et *PRKY* respectivement. D'ailleurs, 15 des 26 hommes et 2 des 4 femmes avec $t(X;Y)$ analysés par Schiebel et coll. [1997] ont un point de cassure à moins de 30 kb avant ou après *PRKY*, alors que 7 des 16 patients de Sharp et coll. [2005] montrent une cassure à moins de 500 kb de ce gène. Nous avons également fait une observation semblable chez les hommes $46,X,der(X)t(X;Y)$ avec désordre testiculaire que nous avons étudiés, puisque le point de cassure du chromosome X se trouve dans une région d'environ 250 kb autour de *PRKX* chez trois patients (incluant les jumeaux homozygotes) porteurs d'une translocation $X;Y$ [article 3, page 153]. Par contre, aucun des points de cassure sur le chromosome Y ne se trouve dans ou autour de *PRKY* chez ces mêmes hommes, éliminant ainsi la possibilité qu'une recombinaison anormale entre ces deux gènes soit responsable de la translocation. En fait, le point de cassure sur le Y se trouve plutôt dans une région de 750 kb au-dessus du centromère. Malheureusement, dans la seule étude où le point de cassure sur le Y a été investigué chez plusieurs individus $46,X,der(X)t(X;Y)$, les analyses n'ont pas permis de confirmer dans quelle mesure le point de cassure, chez les 8 patients présentant une cassure du X dans une région de 2 Mb autour de *PRKX*, se situait effectivement dans ce gène [Sharp et coll., 2005]. Les gènes *PRKX* et

PRKY sont donc non seulement impliqués dans une recombinaison anormale chez certains individus, générant ainsi une $t(X;Y)$, mais il semble qu'ils puissent également être plus susceptibles à des cassures aléatoires sans qu'un événement de recombinaison homologue n'ait lieu.

B.1.2.2 Séquences HERVs et Alu

D'autre part, d'autres séquences pourraient également jouer un rôle dans la formation des translocations $X;Y$, à savoir les éléments endogènes de rétrovirus humains (HERVs) ainsi que les séquences Alu. En effet, quelques cas de translocations $X;Y$ causées par une recombinaison homologue entre des séquences répétées de type Alu ou HERVs ont été décrits [Rouyer et coll., 1987; Chagnon et coll., 2006]. Les séquences HERVs et Alu sont présentes en grand nombre sur les chromosomes humains, et sont particulièrement enrichies sur le chromosome Y, tel que nous l'avons mentionné en introduction. Une recombinaison entre les séquences HERVs est d'ailleurs notamment impliquée dans les délétions interstitielles du bras long du chromosome Y affectant les régions AZFa [Blanco et coll., 2000; Sun et coll., 2000; Bosch et Jobling, 2003; Hurles et coll., 2004] et AZFc [Kuroda-Kawaguchi et coll., 2001] (Figure 3 de l'introduction, page 46). Par ailleurs, une recombinaison entre des séquences Alu retrouvées sur d'autres chromosomes est également impliquée dans des duplications ou des délétions géniques responsables de maladies génétiques, ainsi que dans quelques translocations retrouvées dans la leucémie [revu dans Renwick et coll., 1997; Deininger et Batzer, 1999; Kozak et coll., 2006]. Ross et coll. [2001] ont rapporté le cas d'une $t(X;Y)$ où le point de cassure se situe dans des séquences LTR (« *long terminal repeats* ») rétrovirales présentant au moins 95% d'homologie en Xp22.33 et Yp11.2. De façon générale, l'implication de ces séquences dans les événements de $t(X;Y)$ serait toutefois rare comparativement aux remaniements causés par une recombinaison entre des séquences homologues découlant du passé commun des gonosomes [Wang et coll., 1995]. Cela peut s'expliquer par le fait que le degré d'homologie X-Y est plus grand que celui entre les séquences répétées, ou encore que les régions d'homologie X-Y s'étendent sur de plus grandes distances; il y aurait alors plus de chances

qu'une recombinaison ait lieu. Par exemple, les régions Alu ne comportent que 300 pb et ont un degré d'homologie variant entre 70 et 98%, avec une moyenne de 85% [revu dans Renwick et coll., 1997; Hsieh et coll., 2005], ce qui limiterait possiblement la fréquence des événements de recombinaison à des régions spécifiques très riches en séquences Alu dont le degré d'homologie est très élevé, particulièrement à l'intérieur d'un même gène [revu dans Deininger et Batzer, 1999].

B.1.2.3 Territoires chromosomiques dans le noyau

Depuis quelques années, de plus en plus d'évidences suggèrent l'existence d'une organisation précise et spécifique des chromosomes dans le noyau, sous forme de territoires chromosomiques. Il a en effet été montré que les chromosomes auraient une position déterminée dans le noyau des cellules de différents tissus de plusieurs espèces (incluant l'humain), que ce soit les fibroblastes, les lymphocytes et les cellules du liquide amniotique [revu dans Bolzer et coll., 2005], les cellules hématopoïétiques [Kozubek et coll., 1999; revu dans Parada et Misteli, 2002; Stadler et coll., 2004], ou le sperme [revu dans Foster et coll., 2005]. Ainsi, certains auteurs ont montré que les chromosomes de plus petite taille seraient plus près du centre du noyau que les chromosomes de grande taille [Bolzer et coll., 2005]. Cependant, le facteur le plus important dans l'organisation des territoires chromosomiques serait la densité génique, puisque les chromosomes les plus riches en gènes seraient localisés au centre du noyau alors que les chromosomes moins riches en gènes se situeraient à la périphérie du noyau [revu dans Cremer et Cremer, 2010; Elcock et Bridger, 2010]. L'organisation des territoires chromosomiques varierait d'un type cellulaire à l'autre, en fonction de l'activité de transcription génique, afin de rassembler les régions chromosomiques activement transcrites à la périphérie du territoire de chaque chromosome et de faciliter l'accès à la machinerie transcriptionnelle [revu dans Elcock et Bridger, 2010]. La notion de territoire chromosomique a également mis en lumière un lien possible entre la proximité du territoire chromosomique de certains chromosomes et la fréquence des remaniements impliquant ces mêmes chromosomes, notamment dans le cancer [revu dans Parada et Misteli, 2002]. Il a en effet été suggéré que la proximité des territoires

chromosomiques des chromosomes 9 et 22 ainsi que 15 et 17 jouerait un rôle dans la formation des translocations qui entraînent la fusion des gènes *BCR-ABL* et *PML-RARA* respectivement dans les leucémies myéloïdes chroniques et aiguës [Kozubek et coll., 1999; revu dans Parada et Misteli, 2002]. L'implication des territoires chromosomiques dans d'autres remaniements de structure n'est cependant pas claire.

Dans le cas des gonosomes et des translocations qui sont parfois observées, il est possible qu'un phénomène similaire puisse entrer en ligne de compte. En effet, dans certains stades de la spermatogenèse, les gonosomes occupent un territoire chromosomique particulier et sont intimement liés. Par exemple, les chromosomes sexuels occupent non seulement des territoires chromosomiques voisins dans les spermatocytes afin de permettre l'appariement nécessaire à la méiose, ils sont également séquestrés à la périphérie du noyau dans ce que l'on nomme le corps XY [revu dans Turner, 2007]. En effet, alors que les autres homologues sont appariés sur toute leur longueur, les gonosomes ne sont normalement appariés que par leur région PAR1 (et PAR2 à l'occasion). Or, la présence de régions non appariées peut causer le déclenchement d'un point de contrôle et ainsi bloquer la méiose; les chromosomes X et Y sont donc séquestrés et liés par une panoplie de protéines afin d'éviter l'arrêt de la méiose. Parmi les protéines retrouvées dans le corps XY, on retrouve de nombreux membres de la machinerie de réparation ainsi que des variantes d'histones habituellement retrouvées au niveau des bris d'ADN [revu dans Turner, 2007]. On peut donc supposer que la formation de bris double-brin nécessaires à la recombinaison homologue des chromosomes lors de la méiose n'épargne pas les gonosomes, bien que ceux-ci aient une recombinaison homologue limitée aux extrémités distales. Les bris double-brin restants, c'est-à-dire qui ne sont pas impliqués dans une recombinaison homologue, seraient ensuite réparés par les protéines du corps XY, permettant la poursuite de la méiose. À l'instar des translocations causées par la proximité des chromosomes dans le noyau que l'on observe dans le cancer, il est possible que certaines translocations X;Y soient générées, avec des cassures aléatoires, dans le corps XY. Ce mécanisme pourrait ainsi expliquer certaines $t(X;Y)$ où aucune homologie de séquences n'a été notée aux points de cassure, comme c'est le cas de notre patient 4 avec désordre testiculaire du développement sexuel et une constitution $46,X,der(X)t(X;Y)$ [article 3, page 153] et de la

fillette avec disomie Xp et une constitution 46,X,der(Y)t(X;Y) [article 8, page 243] que nous avons étudiés. Dans le cas du patient 4, cette hypothèse est particulièrement intéressante puisque les cassures sont survenues au début de la région PAR1 sur le X, et à 200 kb en-dessous de *SRY* sur le Y; or, *SRY* n'est situé qu'à une cinquantaine de kb du début de la région pseudoautosomique. Il est donc possible que ces points de cassure soient des relicts d'une tentative de recombinaison homologue dans PAR1. Certaines régions des gonosomes qui, de par leur structure moléculaire, seraient plus susceptibles aux cassures pourraient être plus fréquemment impliquées, expliquant la redondance de certains points de cassure dans ce type de remaniement du Y. À titre d'exemple, la région de 750 kb au-dessus du centromère du Y où se trouve le point de cassure chez 3 de nos hommes 46,X,der(X) (incluant les jumeaux) avec une t(X;Y) [article 3, page 153] semble plus susceptible aux cassures. En effet, un point de cassure dans cette région a également été observé chez l'un des 15 patients avec une t(X;Y) étudiés par Sharp et coll. [2005]. D'autre part, la fragilité de la région contenant les gènes *PRKX/PRKY* pourrait également expliquer le fait que 3 de nos patients 46,X,der(X)t(X;Y) (dont les jumeaux) [article 3], 7 des patients de Sharp et coll. [2005] et 17 de ceux de Schiebel et coll. [1997] avec un caryotype similaire aient un point de cassure dans ou autour de *PRKX* ou de *PRKY* et ce, sans qu'il y ait eu recombinaison homologue entre ces deux gènes.

B.2 L'instabilité des chromosomes Y remaniés ou normaux dans les différents tissus

B.2.1 Les chromosomes Y isodicentriques

Sullivan et Willard [1998] ont montré que dans les cas de chromosomes X isodicentriques ayant une distance intercentromérique de 4 à 12 Mb, l'inactivation de l'un des deux centromères n'est retrouvée que dans 15 à 30% des cellules. C'est donc dire que ces chromosomes dicentriques peuvent être fonctionnels avec un seul centromère actif ou avec les deux centromères actifs, selon les cellules. Au contraire, dans le cas du X isodicentrique ayant une distance intercentromérique de 34 Mb, l'un des deux centromères a

a été inactivé dans l'ensemble des cellules. Plus récemment, Lange et coll. [2009] ont obtenu des résultats similaires chez des patients avec un chromosome Y isodicentrique, puisque les idic(Y) avec une distance intercentromérique de plus de 12 Mb étaient tous fonctionnels avec un seul centromère actif alors que les idic(Y) avec une distance intercentromérique de moins de 12 Mb étaient fonctionnels avec un ou deux centromères actifs, selon les cellules. Ces données suggèrent que lorsque les deux centromères d'un chromosome dicentrique sont séparés par moins de 12 Mb, les risques qu'ils lient des pôles opposés du fuseau mitotique seraient moins grands. Par conséquent, il ne serait donc pas absolument nécessaire d'inactiver l'un des centromères afin de stabiliser le chromosome, bien que cela se produise dans une certaine proportion de cellules. En effet, plus les centromères sont près l'un de l'autre, plus il y a de chances qu'ils agissent de façon synergique et que la ségrégation ne soit pas perturbée [revu dans Lange et coll., 2009]. Au contraire, plus la distance intercentromérique est grande, plus il y a de chances que les chromatides se tordent et que les centromères lient des pôles opposés du fuseau mitotique [Ying et Ives, 1971; Buchanan et coll., 1976], ce qui perturbe la ségrégation du chromosome remanié comme nous l'avons expliqué en introduction.

Toutefois, Higgins et coll. [1999; 2005] n'ont pas observé de corrélation entre la distance intercentromérique et la proportion de cellules avec un idic(X) ayant un seul centromère actif dans des lignées de cellules hybrides souris-humain. En effet, les hybrides contenant un idic(X) avec une distance intercentromérique variant de 5 à 22 Mb ne contenaient qu'un centromère actif sur leur idic(X), alors que les hybrides contenant un idic(X) avec une distance intercentromérique allant de 10 à 20 Mb avaient un ou deux centromères actifs sur leur idic(X). Ces auteurs ont également montré que dans une lignée de cellules comportant un idic(X) stable avec deux centromères actifs depuis plusieurs générations, l'un des centromères pouvait s'inactiver spontanément dans une faible proportion de clones [Higgins et coll., 2005]. De même, ils ont montré que dans une lignée de cellules avec un idic(X) n'ayant qu'un seul centromère actif et stable depuis plusieurs générations, l'autre centromère pouvait se réactiver spontanément dans certains clones. Ces auteurs ont également démontré que les changements observés dans le statut d'activité des centromères n'étaient pas dus à des modifications de la séquence d'ADN aux centromères,

mais plutôt à des mécanismes épigénétiques, notamment le niveau d'acétylation des histones. Ainsi, l'exposition à un inhibiteur d'acétylation des histones des cellules avec un idic(X) stable possédant deux centromères actifs entraînait l'inactivation de l'un des centromères dans une proportion variable de cellules pouvant aller jusqu'à 46% [Higgins et coll., 2005]. L'inactivation de l'un des centromères serait donc due à des phénomènes épigénétiques. Ces modifications épigénétiques empêcheraient certaines protéines du kinétochore de se lier au centromère, ce qui le rendrait inactif. Higgins et coll. ont donc postulé en 2005 que la stabilisation de l'idic(X) n'était pas exclusivement reliée à l'inactivation de l'un des centromères mais que d'autres mécanismes pouvaient également entrer en ligne de compte. Des différences dans l'efficacité du point de contrôle de l'attachement des kinétochores au fuseau mitotique ont notamment été évoquées. Ainsi, certaines cellules s'arrêteraient au point de contrôle le temps que l'idic lie de façon plus appropriée le fuseau mitotique, alors que d'autres cellules poursuivraient leur division malgré tout, ce qui entraînerait une ségrégation anormale de l'idic. Ces données suggèrent que non seulement plusieurs mécanismes influencent le statut d'activation des centromères des chromosomes dicentriques, mais que le statut d'activation des centromères n'est pas le seul mécanisme impliqué dans la stabilisation de ces chromosomes. Cette stabilisation des chromosomes isodicentriques, peu importe le mécanisme, ne se fait pas immédiatement après la formation de l'idic. La présence de deux centromères actifs, du moins pour un temps, peut donc causer des problèmes lors des premières divisions cellulaires et générer de l'instabilité. Bien que des données spécifiques pour le chromosome Y ne soient pas disponibles, on peut penser que les mécanismes impliqués sont similaires, expliquant l'instabilité des idic(Y).

Le retard de migration à l'anaphase est la principale source d'instabilité des idic(Y). En effet, la très grande majorité des cas d'idic(Y) présentent une lignée 45,X en mosaïque [revu dans Daniel et coll., 1980; Hsu, 1994; Tuck-Muller et coll, 1995; Bouayed Abdelmoula et Amouri, 2005a], ce qui est compatible avec le retard de migration à l'anaphase ou avec une non-disjonction. Or, on ne retrouve que plus rarement des lignées contenant deux copies de l'idic(Y), puisque seulement une vingtaine de cas ont été

rapportés dans la littérature [revu dans Tuck-Muller et coll., 1995; Stankiewicz et coll., 2001; DesGroseilliers et coll., 2002; Bouayed Abdelmoula et Amouri, 2005a; Bruyère et coll., 2006]. Deux de nos patients (5 et 10) avec $\text{idic}(Y)$ [article 2, page 126] montrent une telle lignée dans environ 1% de leurs cellules. De plus, dans leurs travaux sur des chromosomes X isodicentriques chez des patientes souffrant du syndrome de Turner, Sullivan et Willard ont montré une ségrégation équitable des chromosomes remaniés, sans non-disjonction, après blocage de la cytokinèse [Sullivan et Willard, 1998]. Ils ont cependant observé un retard de migration à l'anaphase dans une proportion variable (2 à 25%) de cellules, le chromosome dicentrique retardataire se retrouvant clairement entre les deux cellules filles alors que les autres chromosomes avaient terminé leur migration. La proportion de cellules avec un retard de migration corrèle avec l'état d'activation des centromères, puisque plus la proportion de cellules ayant un $\text{dic}(X)$ avec deux centromères actifs est grande chez un individu, plus il y a un retard de migration à l'anaphase [Sullivan et Willard, 1998]. L'inactivation du deuxième centromère des chromosomes dicentriques semble donc mieux stabiliser les chromosomes, en empêchant la liaison du deuxième centromère au pôle mitotique.

Le nombre observé de cellules en division avec un retard de migration au niveau de l' $\text{idic}(X)$ lors de l'expérimentation de blocage de la cytokinèse de Sullivan et Willard [1998] n'est toutefois pas corrélé avec la proportion de cellules $45,X$ retrouvées initialement au caryotype chez les patientes. En effet, des $\text{idic}(X)$ retardataires ont été observés autant chez une patiente présentant une mosaïque $45,X/46,X,\text{idic}(X)$ que chez une autre présentant un caryotype $46,X,\text{idic}(X)$ homogène; au contraire, une patiente avec une mosaïque ne présentait pas de retard de migration. Il existerait donc des mécanismes permettant le « sauvetage » du chromosome retardataire ou la mort de la cellule en division, ce qui permettrait de minimiser ou de contrôler la formation de clones $45,X$ à long terme. L'efficacité de ces mécanismes étant dépendante du point de contrôle du cycle cellulaire, une certaine variabilité intercellulaire pourrait exister [Sullivan et Willard, 1998]. Ainsi, la variation dans la proportion de cellules ayant perdu l' $\text{idic}(Y)$ entre les tissus d'un même patient que nous avons observée dans notre cohorte pourrait ainsi être expliquée [article 2, page 126]. Le mosaïcisme associé aux chromosomes dicentriques ayant une grande

distance intercentromérique serait donc surtout imputable à l'instabilité du chromosome dans les premières divisions, avant l'inactivation de l'un des centromères, plutôt qu'à une instabilité continue [Sullivan et Willard, 1998]. En effet, si l'instabilité des idic(X) avait persisté toutes ces années après la formation du remaniement, un retard de migration du X remanié aurait été observé chez tous les patients en mosaïque, ce qui n'est pas le cas. De plus, cette hypothèse que l'instabilité des chromosomes dicentriques survient surtout lors des premières divisions cellulaires qui suivent la formation du remaniement est confirmée de façon indirecte par nos travaux et ceux de Lange et coll. [2009]. Dans notre cohorte de patients avec un idic(Y), une distance intercentromérique de plus de 20 Mb est corrélée à un développement sexuel féminin et à la présence de mosaïcisme impliquant la perte de l'idic(Y) [article 2, page 126]. Dans l'étude de Lange et coll. [2009], cette même distance intercentromérique est aussi corrélée à un phénotype féminin, bien que les auteurs n'aient pas évalué le mosaïcisme cellulaire. Aussi, ils ont montré que les idic(Y) avec une distance intercentromérique de plus de 12 Mb possédaient tous un seul centromère actif; par conséquent, ces idic(Y) étaient probablement stabilisés. Ainsi, la corrélation entre la distance intercentromérique, le phénotype féminin et la proportion de cellules ayant perdu l'idic(Y) que nous avons observée dans notre cohorte est probablement expliquée par l'instabilité de l'idic(Y) dans les premières divisions cellulaires de l'embryon, et non pas par une instabilité persistante.

Pour ce qui est de la présence de lignées contenant des marqueurs dérivés d'un remaniement subséquent de l'idic(Y), ce qui est compatible avec le bris de l'idic(Y) suite à un tiraillement de ce dernier au niveau du fuseau mitotique (Figure 8B de l'introduction, page 79), elle n'a été rapportée que dans une vingtaine de cas [Morillo-Cucci et German, 1971; Johnston et coll., 1974; Málková et coll., 1975; Buchanan et coll., 1976; Polani et coll., 1979; Fryns et coll., 1987; Haaf et Schmid, 1990; In't Veld et coll., 1995; Adachi et coll., 1997; Jakubowski et coll., 2000; Schwartz et coll., 1997; Robinson et coll., 1999; Dundar et coll., 2001; Stankiewicz et coll., 2001; Bettio et coll., 2006; Fernandez et Pasaro, 2006; Iourov et coll., 2008]. Dans les cas publiés d'idic(Y) où un marqueur a été retrouvé, le tissu gonadique n'a été étudié que dans un seul cas, celui de Jakubowski et coll. [2000]. Il

semble donc que ce type d'instabilité soit assez rare dans les cas d'idic(Y). Contrairement à ce qui est rapporté dans la littérature, nous avons retrouvé une telle lignée chez 5 des 17 patients avec un idic(Y) que nous avons étudiés [articles 1 et 2, pages 112 et 126 respectivement]. Chez 4 d'entre eux, cette lignée est présente dans une faible proportion des cellules du sang (moins de 5%), mais est plus importante dans les gonades (jusqu'à 10%). Chez le cinquième patient, un marqueur a été retrouvé dans 41% de ses lymphocytes sanguins et 17% de ses fibroblastes cutanés, ce qui illustre bien que la taille de la lignée peut être variable d'un tissu à l'autre. On peut donc supposer que l'inactivation de l'un des centromères permet de limiter ce type d'instabilité. Toutefois, tel que discuté dans l'article 2 (page 126), une grande distance intercentromérique pourrait augmenter les risques qu'un bris de l'idic(Y) survienne, étant donné la possibilité accrue que les deux centromères encore actifs lient des pôles opposés du fuseau mitotique dans les premières divisions cellulaires. D'ailleurs, chez les 4 patients avec une cassure de leur idic(Y) pour lesquels nous avons pu déterminer la distance intercentromérique, celle-ci est supérieure à 20 Mb.

Le fait que la plupart des patients aient été inclus de façon rétrospective dans notre étude peut aussi avoir influencé les résultats. Par exemple, le fait d'avoir à notre disposition surtout du tissu gonadique fixé fait en sorte que la très grande majorité des analyses cytogénétiques ont été effectuées uniquement sur des noyaux interphasiques. Dans ce contexte, il est vrai que l'interprétation des signaux obtenus en FISH interphasique est plus difficile que lorsque les analyses sont effectuées sur des métaphases, là où les deux centromères de l'idic sont distincts même si celui-ci est replié. En conséquence, il est possible qu'il y ait eu une légère surestimation de la proportion de cellules gonadiques avec un idic(Y) cassé, dans les cas où les signaux des deux centromères de l'idic(Y) replié se chevaucheraient. Toutefois, étant donné que ce biais est présent pour tous les cas d'idic(Y), peu importe leur distance intercentromérique, cela ne devrait pas fausser outre mesure la corrélation que nous avons observée entre la distance intercentromérique et le risque que l'idic se brise.

B.2.2 Les translocations X;Y

Les chromosomes X dérivés des translocations X;Y que l'on retrouve notamment chez les individus avec désordre testiculaire [46,X,der(X)t(X;Y)] peuvent également être instables. En effet, chez 3 des 4 hommes avec une telle constitution que nous avons étudiés, nous avons retrouvé, en plus de la lignée 46,X,der(X)t(X;Y), plusieurs autres lignées en mosaïque: 45,X; 45,der(X)t(X;Y); 46,XX; 46,der(X)t(X;Y)x2; 47,XX,der(X)t(X;Y); 47,X,der(X)t(X;Y)x2; et même 50,XX,der(X)t(X;Y)x4 [article 3, page 153]. De plus, la proportion de clones contenant l'une ou l'autre de ces lignées secondaires varie entre 0,3 et 5,5%. Ces lignées découlent toutes le plus probablement de la non-disjonction du X normal ou du dérivé X lors des mitoses [DesGroseilliers et coll., 2006c]. Ainsi, la non-disjonction dans une cellule 46,X,der(X) mènerait à la formation de lignées 45,der(X) et 47,XX,der(X) ou 45,X et 47,X,der(X)x2 respectivement. En ce qui a trait aux lignées 50,XX,der(X)x4 et 46,XX, elles pourraient avoir été formées par deux mécanismes. Dans le premier cas, la non-disjonction simultanée du X normal et du dérivé X aurait généré un clone non viable à 44 chromosomes et une lignée 48,XX,der(X)x2. Par ailleurs, il est également possible que la lignée 48,XX,der(X)x2 ait plutôt été formée par la non-disjonction du dérivé X dans une cellule 47,XX,der(X). La lignée réciproque créée par cette disjonction anormale serait un clone 46,XX. Une non-disjonction des dérivés X dans la cellule 48,XX,der(X)x2 aurait ensuite donné une lignée 46,XX et une lignée 50,XX,der(X)x4. Les deux mécanismes de formation de la lignée à 50 chromosomes proposés impliquent toutefois la formation d'une lignée à 48 chromosomes, lignée qui n'a pas été retrouvée chez nos patients [DesGroseilliers et coll., 2006c; article 3, page 153]. Dans la littérature, ce phénomène de mosaïcisme chez les individus 46,X,der(X)t(X;Y) est peu répertorié, probablement parce qu'il n'y a que très peu de cas et parce qu'un nombre réduit de cellules est généralement analysé. Dans les quelques cas publiés où un mosaïcisme a été noté [Osipova et coll., 1998; Kusz et coll., 1999; Ogata et coll., 2001; Torre et coll., 2001; Modan-Moses et coll., 2003; Chernykh et coll., 2009], des lignées à 45, 46, 47 et 48 chromosomes ont été observées, mais aucune lignée à 50 chromosomes n'a été rapportée.

D'autre part, il est possible que l'ampleur du mosaïcisme soit expliquée en partie par l'inactivation d'un chromosome X. En effet, tel que mentionné dans la section A.3.1.1 de l'introduction (page 69), la perte d'un chromosome X normal dans un micronoyau est observée chez des femmes 46,XX saines avec l'âge. Certains auteurs ont émis l'hypothèse que cela était peut-être causé par la séparation prématurée des centromères des chromatides-sœurs du X, engendrant un mauvais attachement au fuseau mitotique, et que le chromosome X inactif pourrait être plus particulièrement affecté [revu dans Stone et Sandberg, 1995]. Par exemple, il est possible que des centromères séparés de façon prématurée puissent être plus susceptibles de lier des microtubules provenant des pôles opposés du fuseau mitotique, engendrant ainsi un retard de migration. En effet, il a été démontré dans divers modèles animaux que l'attachement entre les deux chromatides-sœurs empêche le kinétochore de chaque chromatide de lier à la fois les deux pôles du fuseau mitotique en « masquant » l'accès au pôle le plus éloigné [revu dans Cimini, 2008]. On peut donc supposer que la séparation prématurée des centromères d'un chromosome X inactif dégage l'accès au pôle opposé, ce qui pourrait faire en sorte qu'un kinétochore se lie aux microtubules provenant des deux pôles du fuseau mitotique. La présence de lignées à 45 chromosomes chez les individus 46,X,der(X)t(X;Y) peut être expliquée par la perte d'un chromosome X (normal ou dérivé) lors des mitoses avec le temps, à l'instar de ce qui est observé chez les femmes 46,XX saines.

Toutefois, selon Stone et Sandberg [1995], la séparation prématurée des centromères du X ne serait pas le seul mécanisme impliqué, car le gain d'un chromosome X (47,XXX) n'est pas souvent rapporté chez les femmes 46,XX saines avec l'âge. De plus, la non-disjonction mitotique du chromosome X ne semble pas être significativement différente chez les hommes et les femmes, ce qui suggère que la perte d'un chromosome X et la non-disjonction du X lors des mitoses ne sont pas causées par les mêmes mécanismes [Catalán et coll., 2000b].

B.2.3 Les chromosomes Y normaux

B.2.3.1 Nature particulière de la région centromérique du chromosome Y

Tel que mentionné brièvement dans l'introduction, la région centromérique du chromosome Y présente une particularité unique dans le génome humain: elle ne contient pas de sites de liaison pour la protéine CENP-B, pourtant présents au centromère de tous les autres chromosomes humains [Tyler-Smith et Brown, 1987; Masumoto et coll., 1989; Muro et coll., 1992]. Il a été suggéré que cela pouvait influencer négativement l'efficacité du kinétochore du chromosome Y, expliquant possiblement la perte graduelle avec l'âge de ce chromosome dans les cellules d'individus 46,XY sains. Cependant, les études faites jusqu'à ce jour afin d'élucider le rôle de la protéine CENP-B dans la fonction du kinétochore donnent des résultats ambigus. Ainsi, les souris mutantes homozygotes pour la protéine *Cenp-b* sont viables malgré l'absence de cette protéine sur l'ensemble des chromosomes [Hudson et coll., 1998; Kapoor et coll., 1998; Perez-Castro et coll., 1998], bien que certaines d'entre elles aient un poids inférieur aux souris sauvages ou hétérozygotes [Hudson et coll., 1998]. Aucune altération de la croissance, de la division cellulaire ou de la formation des kinétochores n'a été notée dans les fibroblastes des souris hétérozygotes ou homozygotes comparativement aux souris sauvages [Kapoor et coll., 1998]. Cette déficience en *Cenp-b* semble toutefois causer des problèmes de fertilité à long terme chez les souris femelles suite à une dysfonction utérine [Fowler et coll., 2000; 2004]. Quant aux souris mâles, une diminution du volume testiculaire a été observée chez certaines d'entre elles, sans que des anomalies lors de la méiose ne soient notées [Hudson et coll., 1998]. D'ailleurs, aucune différence significative dans la proportion de cellules aneuploïdes pour les chromosomes 8, X ou Y dans le sperme n'a été trouvée entre les souris hétérozygotes et homozygotes pour une mutation de *Cenp-b* [Tomascik-Cheeseman et coll., 2002]. Fowler et coll. [2004] ont émis l'hypothèse qu'il existerait une autre protéine qui pourrait compenser de façon partielle les déficiences en *Cenp-b*, à l'instar de la redondance fonctionnelle identifiée entre trois homologues de *Cenp-b* chez la levure [Baum et Clarke, 2000; Irelan et coll., 2001]. Cette compensation ne serait toutefois pas aussi efficace dans tous les tissus, notamment l'utérus et les testicules, ce qui expliquerait les problèmes de

fertilité des souris homozygotes [Fowler et coll., 2004]. L'hypothèse d'une telle compensation avait déjà été avancée par Pluta et coll. en 1992 pour expliquer l'absence de sites de liaison de la protéine CENP-B sur le chromosome Y chez l'humain.

Par ailleurs, les tentatives pour former des néocentromères avec des séquences centromériques sans site de liaison pour CENP-B ont échoué [revu dans Masumoto et coll., 2004]. Il semble donc que les sites de liaison pour la protéine CENP-B soient obligatoires pour la formation du centromère, mais qu'ils ne soient pas essentiels à sa fonction [revu dans Vagnarelli et coll., 2008]. Cela n'écarte toutefois pas la possibilité qu'ils puissent jouer un rôle accessoire dans la stabilité du centromère ou le recrutement du kinétochore. Le rôle de CENP-B demeure donc très nébuleux, et les implications de l'absence de sites de liaison pour cette protéine sur le centromère du Y le restent également.

Quoiqu'il en soit, la « faiblesse » hypothétique du centromère/kinétochore du chromosome Y ne semble pas jouer un rôle déterminant dans les anomalies du développement sexuel chez les individus possédant un Y non remanié, tel que nous l'avons démontré dans une cohorte de patients avec une dysgénésie gonadique pure ou mixte [article 5, page 184], de même que chez un fœtus avec désordre ovotesticulaire du développement sexuel suite à une mutation de *SOX9* [article 7, page 234]. Contrairement aux patients présentant un remaniement du Y, chez qui les niveaux de mosaïcisme gonadique sont très élevés et corrélatent même avec la distance intercentromérique, tel que discuté dans la section B.2.1 (page 273) et l'article 2 (page 126), les chromosomes Y normaux ne sont pas perdus de façon significative dans les gonades de patients avec une dysgénésie gonadique [articles 5, 6 et 7, pages 184, 220 et 234 respectivement; voir aussi la section B.3.1.1, à la page 285, pour plus de détails]. Le mosaïcisme dans les gonades de ces patients est toutefois légèrement plus élevé que dans le sang. Cette différence entre le sang et les gonades peut s'expliquer par trois phénomènes. Dans un premier temps, il a été rapporté que la proportion de cellules ayant perdu le chromosome Y peut varier d'un tissu à l'autre, et ce même chez des individus XY sains. En particulier, il a été observé que 8 à 10% des cellules hématopoïétiques normales avaient perdu le Y chez les hommes de plus de 40-50 ans [revu dans Stone et Sandberg, 1995]. D'autre part, la plupart des analyses par FISH

que nous avons effectuées ont été faites sur des noyaux isolés de tranches de 15 μm de tissu gonadique fixé. Or, bien que les conditions d'hybridation aient été optimisées, il n'est pas certain que les sondes aient pénétré toutes de la même façon dans les noyaux. D'ailleurs, chez les patients où les analyses ont pu être effectuées à la fois sur du tissu gonadique frais et fixé, le taux de mosaïcisme 45,X était d'à peu près 10% dans les tissus fixés alors qu'il était nul dans les tissus frais [Table II de l'article 5, page 194]. Finalement, l'hétérogénéité intra-tissulaire des coupes gonadiques peut également avoir contribué à accentuer la variabilité des taux de mosaïcisme dans les gonades. En conséquence, chez 6 de nos 10 patients XY [article 5, page 184], les niveaux de mosaïcisme gonadique 45,X d'environ 15% ou moins qui ont été observés ne sont probablement pas significatifs. D'autre part, la mosaïque 45,X de 70-75% retrouvée dans les gonades d'une de nos patientes 46,XY avec une dysgénésie gonadique pure explique son phénotype féminin [article 5]. Aussi, elle a peut-être contribué au désordre du développement sexuel de 3 autres patients. Une mosaïque 45,X de 30% et 40-45% a été retrouvée dans les gonades de 2 patientes 46,XY [article 5]. De plus, une mosaïque des gonosomes (20-50% selon la sonde utilisée) a été retrouvée dans l'utérus d'un fœtus XY avec trisomie 22, mais pas dans ses testicules [article 6, page 220]. En ce qui concerne le fœtus 46,XY avec une mutation de *SOX9* [article 7, page 234], une lignée 45,X a été retrouvée dans respectivement 15 et 25% des cellules de son testicule et de son ovaire. Ce mosaïcisme gonadique ne permet donc pas d'expliquer le désordre ovotesticulaire de ce patient. Dans l'ensemble, nous pouvons donc conclure que dans la majorité des cas de patients 46,XY avec une anomalie du développement sexuel, l'impact réel du mosaïcisme gonadique est incertain, et ce dernier ne peut expliquer de façon évidente leur phénotype sexuel.

B.2.3.2 Microdélétions du chromosome Y et région DYZ19

Il a récemment été suggéré par quelques auteurs que des microdélétions du bras long du chromosome Y, au niveau des régions AZF impliquées dans la fertilité masculine, pourraient entraîner une instabilité de ce chromosome. En effet, de telles microdélétions ont été notées chez quelques patients ayant une mosaïque 45,X/46,XY dans le sang [Siffroi et

coll., 2000; Patsalis et coll., 2002; 2005]. Toutefois, le nombre de patients testés (une quinzaine) et positifs (entre 4 et 8) étant très limités, il est difficile de conclure qu'il y a là un lien significatif. Puisque plusieurs de ces microdélétions impliquaient les régions AZFb et/ou AZFc, il a été suggéré que ces régions contenaient un élément « stabilisateur » pour le chromosome Y [Patsalis et coll., 2005; Ravel et Siffroi, 2009]. Le bloc d'hétérochromatine DYZ19, qui est situé dans la région AZFb (Figure 2 de l'introduction, page 38), pourrait être un candidat [Ravel et Siffroi, 2009]. D'ailleurs, Hsu [1994] avait souligné, dans sa revue sur les anomalies du chromosome Y, que 38 cas de délétions du bras long du chromosome Y visibles au microscope présentaient du mosaïcisme avec une lignée 45,X, comparativement à 52 cas de délétions du bras long sans lignée 45,X. De plus, une augmentation significative de l'aneuploïdie affectant les chromosomes X ou Y a été remarquée chez les hommes 46,XY infertiles par rapport aux contrôles [Duzcan et coll., 2006; Schiff et coll., 2010]. Par contre, ce ne sont pas tous les hommes infertiles avec mosaïcisme qui sont porteurs de microdélétions des régions AZF [Schiff et coll., 2010], de sorte que l'on peut se demander s'il existe réellement un lien de cause à effet entre les microdélétions AZF et le mosaïcisme des gonosomes, ou si la relation de ces deux phénomènes est liée au fait que ce sont là deux causes de l'infertilité masculine. De façon générale, ces données apportent pour le moment plus de questions que de réponses. Il sera toutefois intéressant de voir si des études menées sur de plus larges cohortes viendront confirmer ces résultats.

Par ailleurs, certains groupes de recherche ont trouvé que les microdélétions AZF étaient plus fréquentes dans le tissu gonadique des individus 45,X/46,XY que dans leur sang [Álvarez-Nava et Puerta, 2006; Álvarez-Nava et coll., 2008] alors qu'un autre groupe a observé que les microdélétions AZF étaient plus fréquentes dans le sperme que dans le sang des hommes 46,XY souffrant d'oligospermie [Dada et coll., 2007]. Cependant, encore une fois, la taille des échantillons et le nombre de cas positifs rendent l'interprétation des résultats difficiles. Ainsi, Dada et coll. [2007] ont trouvé 4 cas de délétions AZF dans le sperme, comparativement à un seul cas dans le sang, chez 52 sujets; Álvarez-Nava et coll. [2008] ont pour leur part rapporté que 5 de leurs 11 patients avaient des délétions AZF dans

leurs gonades mais pas dans leurs lymphocytes sanguins. Dada et coll. [2007] ont avancé l'hypothèse que les dommages génétiques, que ce soient des mutations ou des délétions, pourraient être plus fréquents dans le sperme car ce dernier est soumis à du stress oxydatif. Selon les auteurs, il y aurait un déficit d'enzymes antioxydantes dans le sperme puisque lors de l'un des stades de la spermatogenèse, la spermiogenèse, le futur spermatozoïde perd son cytoplasme et les enzymes qu'il contient. D'ailleurs, Wang et coll. [2003] ont trouvé une augmentation significative du niveau d'espèces réactives de l'oxygène dans le sperme d'hommes infertiles comparativement au sperme de donneurs sains. Les dommages à l'ADN n'ont cependant pas directement été mesurés. Encore une fois, ces résultats ne permettent pas de conclure avec certitude que les délétions AZF sont plus fréquentes dans les gonades que le sang.

Dans l'ensemble, ces données suggèrent que la faible mosaïque 45,X/46,XY observée chez les individus sains avec l'âge pourrait être due à de multiples facteurs, que ce soit une « faiblesse » du kinétochore ou des microdélétions du bras long. Il sera toutefois intéressant de voir si ces observations seront confirmées dans le futur. Si cela est le cas, il sera intéressant d'étudier plus à fond ces phénomènes non seulement chez les hommes infertiles, mais également chez des individus avec une dysgénésie gonadique.

B.3 Les altérations génétiques pouvant causer un développement sexuel anormal

B.3.1 Les individus XY avec un chromosome Y normal ou remanié

B.3.1.1 Causes les plus fréquentes

Tel que mentionné en introduction, les causes du développement sexuel anormal non syndromique chez les individus 46,XY sont nombreuses (Table I de l'introduction, page 58). Si on s'intéresse uniquement aux anomalies de la détermination gonadique

(dysgénésie gonadique), les causes les plus fréquentes, c'est-à-dire une mutation ou une perte de *SRY* et/ou une mosaïque 45,X, n'expliquent qu'une partie des cas. En effet, une mutation ou une perte de *SRY* explique 25% des cas de dysgénésie gonadique pure [McElreavey et coll., 1995; Cameron et Sinclair, 1997]. La mosaïque 45,X/46,XY, quant à elle, serait responsable de 50% des cas de dysgénésie gonadique mixte [Zäh et coll., 1975; Robboy et coll., 1982; Yamakita et coll., 1989]. En ce qui a trait à la proportion de cas de dysgénésie gonadique pure qui seraient expliqués par du mosaïcisme des gonosomes, aucune étude le démontrant précisément n'a été effectuée jusqu'à présent. Toutefois, on peut supposer que la perte d'un chromosome Y remanié, plus précisément sous forme d'isodicentrique, fait partie des causes relativement fréquentes de développement sexuel anormal, et ce pour plusieurs raisons. D'abord, les idic(Y) sont parmi les anomalies de structure les plus fréquentes du chromosome Y, représentant entre 20 et 30% des cas [Davis, 1981; Hsu, 1994]. Ensuite, près de 50% des individus avec un idic(Y) ont un phénotype féminin et près de 20% des individus présentent des organes génitaux ambigus [revu dans Hsu, 1994; Tuck-Muller et coll., 1995; Bouyaed Abdelmoula et Amouri, 2005b]. Troisièmement, bien que les gonades aient été étudiées dans très peu de cas de dysgénésie gonadique pure, une lignée 45,X majoritaire a été retrouvée chez 14 des 16 patients avec un phénotype sexuel anormal [Tuck-Muller et coll., 1995; Atkins et coll., 2000; Giltay et coll., 2000; Stankiewicz et coll., 2001; Quilter et coll., 2002; Hsieh et coll., 2002; Guedes et coll., 2006]. D'autre part, une lignée 45,X est déjà présente dans le sang de 95% des patients avec un idic(Y) rapportés dans la littérature [revu dans Hsu, 1994; Tuck-Muller et coll., 1995; Bouyaed Abdelmoula et Amouri, 2005a]; de ces patients avec mosaïcisme sanguin, près de 70% sont des femmes [Bouyaed Abdelmoula et Amouri, 2005b].

De notre côté, nous avons observé des résultats similaires, tel que nous l'avons décrit dans les articles 1, 2 et 5 (pages 112, 126 et 184 respectivement). En effet, nous avons pu étudier par cytogénétique les gonades de 7 femmes avec un idic(Y) et une dysgénésie gonadique pure; la lignée 45,X était majoritaire dans tous les cas. Dans cette cohorte, pour la plupart des cas, plus de 60% des cellules gonadiques avaient perdu l'idic(Y) (pour l'ensemble des résultats, voir la Table I de l'article 5, page 190). Ainsi, le

mosaïcisme des idic(Y) semble expliquer une certaine proportion des cas de femmes avec une dysgénésie gonadique pure, bien qu'il soit impossible à ce stade-ci de faire une évaluation chiffrée. Au contraire, tel que discuté à la section B.2.3.1 (page 281), la perte d'un chromosome Y normal est beaucoup plus rarement impliquée dans la dysgénésie gonadique pure.

La grande majorité des cas d'idic(Y), quelque soit leur phénotype sexuel, sont diagnostiqués en post-natal à cause d'organes génitaux ambigus ou asymétriques, d'un retard de développement, de stigmates du syndrome de Turner, ou d'aménorrhée. Il est donc possible que la proportion de patients avec mosaïcisme sanguin et/ou un désordre du développement sexuel parmi l'ensemble des patients avec un idic(Y) soit surestimée dans les études citées plus tôt. En effet, étant donné que les patients de sexe masculin avec un phénotype normal ont moins de chances d'avoir été diagnostiqués en post-natal, il y a donc moins de chances qu'ils aient été inclus dans ces cohortes. Dans notre étude, tous nos patients sauf un ont été diagnostiqués après leur naissance, que ce soit en période périnatale, durant leur enfance ou encore à l'adolescence. Cela étant dit, puisque les patients avec un idic(Y) et un phénotype féminin présentent par définition un désordre du développement sexuel, que ce soit de la dysgénésie gonadique XY mixte ou pure, l'âge ou la raison de la consultation initiale ne devrait pas induire de biais en ce qui a trait au mosaïcisme gonadique. En effet, puisque toutes ces patientes auraient éventuellement présenté de l'aménorrhée et qu'elles auraient donc été d'une façon ou d'une autre diagnostiquées, il est peu probable que la proportion de patientes avec mosaïcisme gonadique dans notre cohorte soit surestimée par rapport à l'ensemble des patientes avec un idic(Y).

Par contre, le fait que la plupart des spécimens gonadiques étudiés proviennent de gonadectomies ayant eu lieu avant le début de notre étude a pu avoir un impact sur les résultats. En effet, la très grande majorité des résultats de mosaïcisme gonadique proviennent d'analyses effectuées sur des noyaux interphasiques de tissu fixé. Or, tel que mentionné plus tôt, les conditions de fixation des tissus gonadiques ainsi que

l'hétérogénéité intra-tissulaire des coupes histologiques ont pu influencer les résultats. En conséquence, il est possible que la mosaïque 45,X ait été légèrement surestimée dans les gonades fixées. Toutefois, chez les 3 patients pour qui nous disposions à la fois de tissu frais et de tissu fixé, la proportion de cellules 45,X entre les deux types de tissus était comparable (pour l'ensemble des résultats, voir la Table II de l'article 5, page 194). Cela indique donc que la mosaïque 45,X observée dans les gonades fraîches ou fixées des patientes avec un idic(Y) n'est pas un artéfact. Il sera toutefois intéressant d'évaluer de façon plus précise cette variabilité inter-tissulaire de la mosaïque 45,X non seulement chez un plus grand nombre de patients, mais également en étudiant de façon systématique un plus grand nombre de tissus chez un même patient: du sang, de la peau, ainsi que du tissu gonadique frais lorsque c'est possible.

B.3.1.2 Causes rares

Quelques causes rares de dysgénésie gonadique chez des individus XY avec un chromosome Y normal ou remanié ont également été rapportées. Dans le cadre de ce travail, nous nous intéresserons particulièrement à deux d'entre elles: les duplications du gène *NROBI* et les altérations des gènes *SOX8*, *SOX9* et *SOX10*.

B.3.1.2.1 Gène NROBI

La plupart des cas avec une duplication de *NROBI* chez des patients XY impliquent un large segment du chromosome X, causant ainsi la duplication de plusieurs gènes et entraînant un phénotype spécifique, tel que discuté dans l'article 8 (page 243) et revu dans Baumstark et coll. [1996]. Malheureusement, une corrélation génotype-phénotype plus précise est difficile puisque peu de cas ont été étudiés de façon moléculaire. Toutefois, 3 cas de très petites duplications (600 à 800 kb approximativement) contenant le gène *NROBI* ont récemment été rapportés; ces patients ne montraient aucun phénotype anormal outre leur dysgénésie gonadique [Barbaro et coll., 2007; 2008]. La région commune de

chevauchement de ces très petites délétions contient 6 gènes intacts: *MAGEB3*, *MAGEB4*, *MAGEB1*, *NROB1*, *CXorf21* et *GK* [Barbaro et coll., 2008].

Swain et coll. [1998] ont montré que l'expression d'une copie supplémentaire de *Nrobl* dans les gonades de souris XY cause un phénotype sexuel anormal variable selon l'expression de *Sry*. En effet, les souris XY *Sry*⁺ avec duplication de *Nrobl* montrent un délai dans leur développement testiculaire, un désordre ovotesticulaire ou un développement sexuel femelle lorsque le gène *Sry* est exprimé à des niveaux faibles. Quand *Sry* est exprimé à des niveaux plus hauts, il n'y a pas de développement sexuel anormal. Pour ce qui est des souris XX *Sry*⁺ exprimant une copie supplémentaire de *Nrobl* dans leurs gonades, elles développent un phénotype sexuel masculin uniquement dans les lignées où *Sry* est fortement exprimé, suggérant ainsi qu'une surexpression de *Nrobl* peut inhiber le développement masculin à des degrés variables, selon l'expression de *Sry* [Swain et coll., 1998]. Ces résultats suggèrent donc que *NROB1* est bel et bien responsable du développement sexuel anormal des patients XY avec une duplication du bras court du X incluant *NROB1* [Barbaro et coll., 2007; 2008], alors que les autres gènes dupliqués seraient responsables des autres anomalies phénotypiques. D'ailleurs, les 2 patientes XY avec une duplication incluant *NROB1* rapportées par Barbaro et coll. [2007] n'avaient pas de mutations de *SRY*, *NR5A1*, *WT1*, *SOX9* ou de *DHH* qui auraient pu expliquer leur développement sexuel anormal. De plus, une patiente 46,XY ayant une dysgénéésie gonadique isolée a récemment été rapportée par Smyk et coll. [2007]; aucune mutation de *SRY* n'a été trouvée, mais une délétion de 257 kb située 11 kb en amont du gène *NROB1* a été notée. Les auteurs ont émis l'hypothèse que cette délétion altérerait l'expression de *NROB1* et engendrerait une surexpression de ce gène; malheureusement, la quantification des niveaux d'expression n'a pas été faite [Smyk et coll., 2007].

Par ailleurs, les résultats de Swain et coll. [1998] obtenus chez les souris suggèrent également que des polymorphismes de *SRY* pourraient expliquer la présence d'organes génitaux ambigus chez certains patients XY avec duplication de *NROB1* [revu dans Baumstark et coll., 1996]. Un haut niveau d'expression de *SRY* pourrait ainsi contrecarrer

en partie l'effet de la duplication de *NROBI*. Toutefois, le rôle exact joué par *NROBI* dans le développement sexuel normal étant méconnu, il est extrêmement difficile de comprendre le mécanisme impliqué dans la dysgénésie gonadique des patients XY avec une duplication de ce gène. Le seul fait établi est que la présence d'une copie supplémentaire de *NROBI* chez l'humain n'entraîne une dysgénésie gonadique que si cette copie supplémentaire est active; on parle alors de disomie fonctionnelle de *NROBI* chez ces patients. En effet, *NROBI* est nécessairement soumis à l'inactivation sur le chromosome X, puisque les patients 47,XXY n'ont pas un phénotype féminin. Les données obtenues à ce jour indiquent que *NROBI* joue un rôle autant dans le développement sexuel féminin que masculin, tel que brièvement indiqué dans l'introduction (Figure 4 de l'introduction, page 55). Ainsi, *NROBI* peut inhiber l'action des récepteurs des androgènes (AR) et des œstrogènes (ER); il pourrait également réprimer l'expression de *STAR*, qui code pour l'une des enzymes clés de la stéroïdogenèse [revu dans Iyer et McCabe, 2004]. De plus, il inhibe l'interaction entre les protéines NR5A1 et GATA4/WT1, réprimant ainsi la sécrétion de l'AMH [revu dans Iyer et McCabe, 2004]. Par contre, *NROBI* serait nécessaire à la fonction et la différenciation des cellules de Sertoli ainsi qu'à l'organisation des cordons sexuels des testicules [Meeks et coll., 2003]. Par ailleurs, les travaux de Bouma et coll. [2005] suggèrent que *NROBI* activerait d'une façon ou d'une autre l'expression de *SOX9*, puisque les souris XY avec une délétion de *Nrobl* ont des niveaux plus bas de *Sox9*, malgré l'expression de *Sry* qui en augmente la transcription [Sekido et Lovell-Badge, 2008]. D'ailleurs, des souris XY avec une délétion de *Nrobl* et une délétion hétérozygote de *Nr5a1* restreinte aux gonades développent des testicules encore plus dysgénésiques que les souris porteuses de l'une des deux mutations [Park et coll., 2005]. Ces résultats peuvent être expliqués en partie par le fait que *NR5A1* contribue, avec *SRY*, à la surexpression de *SOX9* [Sekido et Lovell-Badge, 2008], et que *NROBI* y participe également [Bouma et coll., 2005]. D'autre part, des travaux *in vitro* suggèrent que *NR5A1* serait nécessaire à l'expression de *NROBI* dans les gonades [Hoyle et coll., 2002], tout comme *WNT4*, via la voie de la bêta-caténine [Mizusaki et coll., 2003] (Figure 4B de l'introduction).

Le rôle de *NROB1* dans le développement sexuel semble donc être plein de contradictions: *NR5A1* serait nécessaire à l'expression de *NROB1*, alors que *NR5A1* et *NROB1* collaboreraient possiblement pour stimuler l'expression de *SOX9*. D'un autre côté, la protéine NROB1 inhiberait ensuite l'action des protéines NR5A1 et SOX9 sur la transcription de l'AMH. Les différents rôles de *NROB1* seraient engendrés par des niveaux différents d'expression et/ou une sublocalisation cellulaire spécifique de la protéine chez les embryons masculins et féminins [revu dans Iyer et McCabe, 2004; Ludbrook et Harley, 2004]. Chez la femme, *NROB1* serait augmenté par la voie *WNT4*/bêta-caténine (qui est activée chez la femme [Chassot et coll., 2008; Tomizuka et coll., 2008]) et inhiberait la masculinisation des organes génitaux par l'inhibition de la stéroïdogénèse et du récepteur aux androgènes, en plus de favoriser le développement des structures de Müller en inhibant la sécrétion d'AMH (Figure 4 de l'introduction, page 55). Au contraire, chez l'homme, *NROB1* serait augmenté par *NR5A1* (dont l'expression est plus élevée que chez les femmes [Hatano et coll., 1994]) et *NROB1* pourrait inhiber l'action des œstrogènes en bloquant leur récepteur; il permettrait également l'organisation des cordons testiculaires en stimulant la différenciation des cellules de Sertoli. De nombreuses autres études seront toutefois nécessaires afin de clarifier le rôle normal de *NROB1* dans le développement sexuel, autant féminin que masculin, ainsi que les répercussions des altérations de ce gène dans ce processus très complexe.

B.3.1.2.2 Gènes *SOX8*, *SOX9* et *SOX10*

L'identification du gène impliqué dans la dysplasie campomélique, *SOX9* [Foster et coll., 1994; Wagner et coll., 1994], ainsi que dans la dysgénésie gonadique observée chez certains des patients 46,XY avec ce syndrome, a aiguë l'intérêt de la communauté scientifique pour les gènes de la famille *SOX*. Le rôle de *SOX9* dans le développement sexuel masculin est indéniable, puisque la surexpression de ce gène est suffisant pour induire le développement testiculaire chez des souris XY *Sry*- [Qin et Bishop, 2005] et XX *Sry*- [Vidal et coll., 2001]. D'ailleurs, il a été récemment prouvé que *SRY* active *SOX9* lors de la cascade de développement sexuel masculin [Sekido et Lovell-Badge, 2008],

confirmant que *SOX9* est l'un des premiers maillons de la chaîne. Considérant cela, on s'attendrait à ce qu'une mutation de ce gène cause une dysgénésie gonadique chez la plupart, sinon tous les patients 46,XY. Or, tel que mentionné dans l'article 7 (page 234), environ 25% des patients 46,XY avec une mutation de *SOX9* ne présentent pas de développement sexuel anormal [Mansour et coll., 1995]. Par ailleurs, aucune corrélation entre le type de mutation ou sa localisation dans le gène et le phénotype sexuel des patients n'a pu être faite [revu dans Meyer et coll., 1997; Knowler et coll., 2003]. Chez notre fœtus 46,XY avec dysplasie campomélique et mutation de *SOX9*, nous avons donc investigué en cytogénétique ses gonades puisqu'il présentait non pas une dysgénésie gonadique, mais bien un désordre ovotesticulaire. Cependant, aucun mosaïcisme gonadique significatif n'a été trouvé chez ce patient [article 7, page 234]. Quelques auteurs ont émis l'hypothèse que les mutations de *SOX9* pourraient avoir une pénétrance variable au niveau du développement sexuel, c'est-à-dire que certains individus 46,XY porteurs de la mutation seraient atteints alors que d'autres ne le seraient pas [Cameron et coll., 1996]. À l'opposé, la pénétrance d'une mutation de *SOX9* au niveau de la chondrogenèse est complète, c'est-à-dire que tous les individus 46,XY porteurs sont atteints, quoique parfois à des degrés divers (expressivité variable) [Meyer et coll., 1997]. Mais de plus en plus d'auteurs croient que des polymorphismes de d'autres gènes de la cascade du développement sexuel masculin joueraient un rôle important dans la variabilité phénotypique chez ces patients 46,XY [Schepers et coll., 2003; Takada et Koopman, 2003; Chaboissier et coll., 2004; Bagheri-Fam et coll., 2008; Polanco et coll., 2010].

Dans un premier temps, il a été démontré que des mutations dans le gène *Sox8* (*SOX8* localisé en 16p13.3 chez l'humain), un homologue de *Sox9*, augmentent la pénétrance du phénotype de dysgénésie gonadique chez des embryons de souris XY porteurs soit d'une délétion homozygote de *Sox9* restreinte à une certaine proportion de cellules de la gonade avant la détermination sexuelle [Chaboissier et coll., 2004], soit d'une délétion homozygote de *Sox9* restreinte à l'ensemble des cellules de Sertoli après que la détermination sexuelle ait eu lieu [Barrionuevo et coll., 2009]. En comparaison, les souris XY avec une délétion homozygote de *Sox9* dans l'ensemble des cellules de la gonade avant la détermination sexuelle montrent une pénétrance complète au niveau de la dysgénésie

gonadique [Chaboissier et coll., 2004; Barrionuevo et coll., 2006] alors qu'une délétion homozygote de *Sox8* n'entraîne pas de dysgénésie gonadique [Sock et coll., 2001]. Il a récemment été montré que certaines souris XY surexprimant *Sox10* (*SOX10* situé en 22q13.1 chez l'humain), un autre homologue de *Sox9*, ont des plus hauts niveaux d'Amh que les souris sauvages, alors que la surexpression de *Sox10* chez les souris XX engendre la formation d'un testicule en plus d'élever les niveaux d'Amh chez certaines d'entre elles [Polanco et coll., 2010]. Par conséquent, *Sox8* et *Sox10* peuvent en partie compenser la perte de fonction de *Sox9* durant le développement sexuel mâle [Chaboissier et coll., 2004; Barrionuevo et coll., 2009; Polanco et coll., 2010]. En effet, l'expression spatio-temporelle de ces trois gènes est très similaire lors du développement sexuel des souris mâles [revu dans Polanco et coll., 2010], et ils peuvent tous activer la sécrétion de l'Amh [Arango et coll., 1999; Schepers et coll., 2003; Polanco et coll., 2010]. De plus, Polanco et coll. [2010] ont montré que *Sox10* peut induire l'expression de Pgds, l'enzyme responsable de la synthèse de la prostaglandine D2. La prostaglandine D2, tel que montré par Wilhelm et coll. en 2005, participerait à l'une des boucles de régulation qui permettraient de maintenir l'expression de *Sox9* après que *Sry* ait cessé d'être exprimé [revu dans Sim et coll., 2008].

Par ailleurs, des mutations de *FGF9*, également responsable du maintien de l'expression de *SOX9* après que *SRY* ait cessé d'être exprimé [Kim et coll., 2006], causent une dysgénésie gonadique chez les souris XY avec une mutation homozygote de ce gène (XY *Fgf9*^{-/-}) [DiNapoli et coll., 2006]. En effet, les souris initient correctement la cascade de développement sexuel par l'activation de *Sry*, mais le développement testiculaire avorte au stade embryonnaire et un ovaire se forme à la place [DiNapoli et coll., 2006]. D'autre part, 20 des 24 souris XY hétérozygotes pour une double délétion restreinte aux gonades de *Sox9* et de *Fgfr2* (souris XY *Fgfr2*^{+/-}*Sox9*^{+/-}), ont développé des ovotesticules alors que toutes les souris XY hétérozygotes pour une délétion restreinte aux gonades de *Sox9* ou de *Fgfr2* (souris XY *Fgfr2*^{+/-}*Sox9*^{+/+} ou XY *Fgfr2*^{+/+}*Sox9*^{+/-}) ont développé des testicules [Bagheri-Fam et coll., 2008]. Or, chez l'humain, *FGFR2* serait le récepteur de *FGF9* et permettrait sa localisation nucléaire, lui permettant ainsi d'agir sur la transcription de *SOX9* et de former une boucle de rétroaction pour maintenir l'expression de *SOX9* [Bagheri-Fam et coll., 2008; Sim et coll., 2008].

Dans l'ensemble, ces études montrent que de nombreux gènes sont susceptibles d'affecter les niveaux d'expression de *Sox9* chez les souris, même en présence de mutations de ce gène. Il n'est donc pas impossible que chez l'humain, des polymorphismes de *SOX8*, *SOX10*, *FGF9* ou *FGFR2* puissent également avoir une influence sur le niveau d'activité résiduel chez des individus 46,XY porteurs de mutations de *SOX9*, expliquant ainsi la pénétrance variable de ces mutations au niveau du phénotype sexuel de ces individus, notamment notre fœtus avec dysplasie campomélique et désordre ovotesticulaire [article 7, page 234]. Il sera intéressant de voir si des mutations ou des polymorphismes de ces gènes seront effectivement trouvés chez des individus avec dysplasie campomélique.

Par contre, il n'est pas exclu qu'il y ait une association entre certaines mutations de *SOX9* et un développement sexuel anormal, même si aucune preuve n'a été trouvée à ce jour [revu dans Meyer et coll., 1997; Knowler et coll., 2003]. On sait par exemple que *SOX9* doit former un dimère pour activer la transcription de ses gènes cibles dans la chondrogenèse, mais pas pour activer la transcription de *NR5A1* dans le développement sexuel [Bernard et coll., 2003]. Par ailleurs, plusieurs modifications post-traductionnelles de *SOX9* sont nécessaires à sa localisation nucléaire et son activité d'activation de la transcription de ses gènes cibles ou partenaires, notamment *NR5A1* [revu dans Sim et coll., 2008]. Par exemple, la phosphorylation de *SOX9* est nécessaire pour la relocalisation nucléaire de cette protéine dans les cellules de Sertoli et ce, dans un intervalle de temps très restreint. De plus, certaines de ces modifications affectent la stabilité de *SOX9* de façon opposée et sont mutuellement exclusives sur les mêmes sites [revu dans Sim et coll., 2008], suggérant que la stabilité et l'activité de *SOX9* sont très dynamiques et complexes. Ainsi, la sumoylation et l'ubiquitination se produisent sur les mêmes sites, mais la première modification augmente l'activité de *SOX9* alors que la seconde entraîne sa dégradation par le protéasome [revu dans Sim et coll., 2008]. Il est donc possible que des altérations mineures de ces sites de modifications post-traductionnelles affectent de façon dramatique la localisation spatio-temporelle de *SOX9* dans la cellule et perturbent la cascade de développement sexuel, même si les niveaux d'expression et la structure de la protéine semblent préservés.

En ce qui a trait à *SOX10*, les nouvelles données concernant le rôle possible de ce gène dans la cascade de développement sexuel mâle chez la souris ne sont pas compatibles avec le fait qu'une duplication de ce gène chez l'humain puisse mener à une anomalie du développement sexuel chez des individus XY, tel que mentionné brièvement dans l'article sur notre fœtus ayant une constitution 47,XY,+22 [article 6, page 220]. Ainsi, l'interférence hypothétique de *SOX10* postulée par Seeherunvong et coll. [2004] pour expliquer le phénotype sexuel anormal de patients XY avec une duplication du bras long du chromosome 22 n'est pas compatible avec les données de Polanco et coll. [2010]. En effet, ces auteurs n'ont rapporté aucune anomalie du développement sexuel chez les souris XY surexprimant *Sox10*. De plus, les données récentes suggèrent qu'une surexpression de *Sox10* peut augmenter les niveaux d'*Amh* [Polanco et coll., 2010], ce qui ne corrèle pas très bien avec la présence d'un utérus autant chez notre fœtus XY que chez 3 des 8 autres individus XY avec développement sexuel anormal et une trisomie partielle ou complète du 22 [Kim et coll., 1977; Nicholl et coll., 1994; Takano et coll., 2003].

Toutefois, une mutation du gène *Map3K4*, de la voie de signalisation MAPK, a récemment été identifiée chez des souris XY avec un développement femelle [Bogani et coll., 2009]. Ces souris avec une mutation homozygote de *Map3k4* ont une expression réduite de *Sry*, *Sox9* et de *Fgf9*, une localisation aberrante de *Fgfr2*, et une augmentation de l'expression de *Wnt4*, ce qui correspond bien au fait que ces souris développent des ovaires et non pas des testicules [Bogani et coll., 2009]. Or, plusieurs gènes de cette voie MAPK sont situés sur la bande q13 du chromosome 22 chez l'humain [revu dans Polanco et coll., 2010], bande chromosomique qui est minimalement dupliquée dans presque tous les cas de trisomie partielle 22 [Table I de l'article 6, page 228]. Il n'est donc pas impossible qu'une altération simultanée de l'expression de plusieurs gènes de cette voie, comme dans le cas d'une trisomie 22, puisse affecter le développement sexuel d'une manière complexe. Il faudra cependant attendre de voir si une surexpression d'un ou de plusieurs gènes de la voie MAPK cause une anomalie du développement sexuel chez les souris avant de pouvoir discuter de l'impact possible de cette voie dans les cas de trisomie 22.

D'autre part, bien que 20-50% de mosaïcisme X/XY ait été trouvé dans l'utérus de notre fœtus avec trisomie 22 [article 6, page 220], aucun mosaïcisme significatif n'a été observé dans ses testicules. Même si elle est limitée à l'utérus, la présence d'une lignée avec monosomie X est le signe qu'il existe un certain mosaïcisme tissulaire chez ce patient, ce qui pourrait avoir contribué à l'ambiguïté de ses organes génitaux externes. Malheureusement, l'analyse de tissus supplémentaires n'a pas été possible. Une mutation du gène *AMH* ou de son récepteur *AMHR2*, causant une persistance des structures de Müller et une cryptorchidie (non descente des testicules), ne peut être exclue chez notre patient ou les autres cas rapportés, même si les mutations de ces gènes s'accompagnent généralement d'organes génitaux externes bien masculinisés [revu dans Robboy et Jaubert, 2009]. La ou les causes du développement sexuel anormal chez notre patient restent donc mal comprises.

B.3.1.3 Cas familiaux

Près d'une trentaine de cas familiaux de dysgénésie gonadique XY ont été rapportés dans la littérature [revu dans Sarafoglou et Oster, 2000; Assumpção et coll., 2002; Jordan et coll., 2002; Le Caignec et coll., 2003; Sahid et coll., 2008; Isidor et coll., 2009]. Dans plusieurs cas, le développement sexuel anormal est dû à une mutation de *SRY* héritée du père qui présentait la même mutation en mosaïque dans son sang [Schmitt-Ney et coll., 1995; Bilbao et coll., 1996; Hines et coll., 1997] et/ou ses gonades [Barbosa et coll., 1995; Isidor et coll., 2009]. Dans quelques cas, il a été démontré que les pères étaient porteurs de la même mutation dans leurs lymphocytes sanguins, sans mosaïcisme, tout en ayant un développement sexuel et une fertilité normaux [Harley et coll., 1992; Hawkins et coll., 1992; Jäger et coll., 1992; Vilain et coll., 1992; Domenice et coll., 1998; Assumpção et coll., 2002; Jordan et coll., 2002; Sahid et coll., 2008]. Par contre, la présence d'un mosaïcisme gonadique pour l'allèle normal de *SRY* n'est pas toujours recherchée chez le père, de sorte qu'il faut être prudent lorsque l'on discute de ces cas. Bien que l'on puisse faire l'hypothèse que les mutations de *SRY* retrouvées dans ces familles ne sont pas la véritable cause du développement sexuel anormal des individus atteints et qu'elles ne représentent que des polymorphismes, ces derniers n'ont jamais été retrouvés chez des

individus 46,XY sains autres que chez les membres de ces familles [Domenice et coll., 1998; Assumpção et coll., 2002; Gimelli et coll., 2007]. De plus, plusieurs de ces études ont démontré que certaines des mutations rapportées peuvent altérer la fonction de la protéine SRY [Harley et coll., 1992; Hawkins et coll., 1992; Vilain et coll., 1992; Jordan et coll., 2002; Gimelli et coll., 2007; Sahid et coll., 2008].

Plusieurs auteurs ont postulé que la pénétrance des mutations familiales serait incomplète, expliquant la variabilité du phénotype sexuel des porteurs. D'ailleurs, Mitchell et Harley [2002] ont remarqué que les mutations familiales altèrent généralement à des degrés moindres la capacité de la protéine SRY à lier l'ADN que les mutations *de novo*. Bien qu'un petit nombre seulement de mutations différentes connues ait été analysé, ces résultats suggèrent qu'une partie de la pénétrance variable des mutations familiales pourrait ainsi être expliquée. Ces mutations familiales pourraient diminuer la fonction de *SRY* à des niveaux près du niveau minimal nécessaire pour le développement sexuel masculin normal. La moindre altération ou variation de la cascade de développement sexuel, conséquence de polymorphismes de d'autres gènes par exemple, serait alors suffisante pour interférer avec la détermination gonadique et entraîner une dysgénésie gonadique chez certains individus [Assumpção et coll., 2002; Mitchell et Harley, 2002]. De plus, Gimelli et coll. [2007] ont rapporté le cas d'une mutation dans le domaine N terminal de la protéine SRY dans un cas familial; or, toutes les autres mutations rapportées dans ce domaine sont *de novo* et font en sorte que la protéine est tronquée, ce qui altérerait de façon plus importante la fonction de *SRY* que ne le fait la mutation familiale [Gimelli et coll., 2007]. D'autres auteurs ont plutôt avancé l'hypothèse que des polymorphismes d'autres gènes du développement sexuel, particulièrement ceux qui pourraient possiblement lier la protéine SRY ou agir comme cofacteur, pouvaient expliquer à eux seuls cette variabilité phénotypique [Sarafoglou et Ostrer, 2000; Ostrer, 2001; Jordan et coll., 2002]. Malheureusement, aucune de ces deux hypothèses n'a encore été validée, d'autant plus que le mécanisme exact par lequel *SRY* exerce son action lors du développement sexuel est encore nébuleux.

Dans les autres cas familiaux où une mutation de *SRY* n'est pas impliquée, une transmission liée au chromosome X ou autosomique récessive est soupçonnée [revu dans Sarafoglou et Ostrer, 2000]. Dans quelques cas, une duplication du bras court du X a été retrouvée chez toutes les patientes atteintes, laissant supposer qu'une duplication de *NROBI* est impliquée et que la mère peut en être porteuse mais non atteinte suite à l'inactivation du X anormal [Cianchetti et coll., 1992; Arn et coll., 1994; Lugtenberg et coll., 2006; Tzschach et coll., 2008]. D'ailleurs, dans 8 autres familles où un cas de dysgénésie gonadique 46,Y,dup(X) a été rapporté, des femmes 46,XX porteuses mais phénotypiquement normales ont été trouvées [Bernstein et coll., 1980; Nielsen et Langkjaer, 1982; Scherer et coll., 1989; Rao et coll., 1994; Telvi et coll., 1996; Gimelli et coll., 2002; Barbaro et coll., 2008]. En plus, d'autres cas où la duplication Xp était due à une translocation non équilibrée héritée d'un parent porteur de la translocation équilibrée ont aussi été rapportés [Reichenbach et coll., 1993; Sivak et coll., 1994; Baumstark et coll., 1996; Melaragno et coll., 1998]. Cependant, on ne trouve pas la cause de la dysgénésie gonadique familiale XY dans tous les cas. Dans ce travail de recherche, nous avons étudié deux familles comportant des sœurs 46,XY atteintes de dysgénésie gonadique. Dans le premier cas, celui de deux demi-sœurs ayant le même père [article 4, page 170], le séquençage du gène *SRY* n'a pas mis en évidence d'anomalies. De plus, aucune duplication de *NROBI* ou délétion de *DMRT1* n'a été trouvée, tel que rapporté dans cet article. Dans le second cas [article 5, page 184], l'analyse par micropuces en clinique chez l'une des sœurs n'a pas permis de trouver la cause de son phénotype sexuel anormal. En effet, la seule anomalie cytogénétique retrouvée est une délétion de 0,05 Mb comprenant le gène *LOC169834*, en 9q32. La fonction de ce gène est inconnue et aucun cas de dysgénésie gonadique XY avec une délétion en 9q32 n'a été rapporté dans la littérature. De plus, le père qui est phénotypiquement normal est également porteur d'une délétion en 9q32, ce qui suggère que cette anomalie a probablement peu ou pas de conséquences cliniques. C'est donc dire que tout comme beaucoup de cas sporadiques, de nombreux cas familiaux de dysgénésie gonadique XY n'ont pas de causes connues à ce jour.

Par ailleurs, si les micropuces actuellement utilisées en clinique offrent une bonne densité de sondes au niveau des gènes impliqués dans les syndromes cliniques connus, la couverture des autres régions, dont les gènes du développement sexuel, n'est malheureusement pas encore optimale. De plus, le peu de données actuellement disponibles sur certains gènes pour lesquels un changement de copie est noté sur les micropuces ne permet pas toujours une interprétation claire de la signification des résultats obtenus. L'utilisation de ces micropuces dans le diagnostic de la dysgénésie gonadique est donc, pour le moment, limitée. D'autre part, ce type d'analyse ne détecte pas les mutations altérant la fonction des protéines; un séquençage de certains gènes demeurera toujours nécessaire chez les patients dont l'analyse en micropuces se sera révélée négative. En attendant, une analyse caryotypique, au minimum, est suggérée chez les sœurs et demi-sœurs qui ne sont pas encore menstruées de toute patiente diagnostiquée avec une dysgénésie gonadique XY afin de permettre le diagnostic précoce des cas familiaux. De telles mesures vont diminuer les risques qu'un autre membre de la famille avec une dysgénésie gonadique XY développe une tumeur gonadique qui, si diagnostiquée tardivement, peut s'avérer mortelle comme ce fut malheureusement le cas pour l'une de nos patientes [article 4, page 170].

B.3.2 Les individus XX avec un chromosome X normal ou remanié

B.3.2.1 Causes les plus fréquentes

Dans près de 90% des cas de désordre testiculaire 46,XX du développement sexuel, le mécanisme impliqué est le transfert du *SRY* sur l'un des chromosomes X dans les gamètes paternels (Figure 10 de l'introduction, page 83) [McElreavey et coll., 1995]. Dans le cas du désordre ovotesticulaire, ce ne sont que 10% des cas qui sont expliqués par ce phénomène [McElreavey et coll., 1992]. Dans les cas où *SRY* est détecté, le degré variable de masculinisation des sujets 46,X,der(X)t(X;Y) est depuis longtemps l'objet de spéculations. Plusieurs auteurs ont émis l'hypothèse que la présence d'une plus grande proportion de cellules avec le der(X) inactif causait un désordre ovotesticulaire, alors que la présence d'une plus grande proportion de cellules avec le X normal inactif engendrait un

désordre testiculaire [Ferguson-Smith, 1966; Berkovitz et coll., 1992; Kusz et coll., 1999]. Toutefois, l'analyse de l'inactivation des chromosomes X n'a effectivement été faite que dans de rares cas [revu dans Bouayed Abdelmoula et coll., 2003; Sharp et coll., 2005; Chernykh et coll., 2009]. Deux groupes se sont intéressés de façon plus particulière à cette problématique et ont étudié l'inactivation du X chez plusieurs patients avec désordre testiculaire et ovotesticulaire. Dans l'une des études, les auteurs n'ont pas trouvé de corrélation entre la proportion de cellules avec le der(X) inactif et le degré de masculinisation des patients [Sharp et coll., 2005]. Ils ont plutôt trouvé une corrélation entre la proximité du point de cassure par rapport au gène *SRY* et le phénotype sexuel: 3 des 4 patients avec désordre ovotesticulaire avaient un point de cassure très près de *SRY* (moins de 70 kb) [Sharp et coll., 2005]. Par ailleurs, chez un autre patient avec désordre testiculaire et de l'hypospadias dont le point de cassure est très loin de *SRY*, les auteurs ont noté la présence d'un réarrangement cryptique additionnel à moins de 10 kb de *SRY*. Les auteurs en ont conclu que la position du point de cassure sur le Y pouvait affecter l'expression de *SRY* et entraîner une masculinisation moindre de l'individu, et que cette dérégulation de l'expression de *SRY* avait sans doute plus d'importance que le nombre de cellules avec le der(X) inactif [Sharp et coll., 2005].

Dans la seconde étude, les auteurs ont trouvé une corrélation entre le patron d'inactivation et le phénotype sexuel des individus 46,X,der(X)t(X;Y). En effet, Kusz et coll. [1999] ont noté que le der(X) est inactif dans plus de 90% des cellules chez 3 individus avec désordre ovotesticulaire ainsi que chez 2 individus avec désordre testiculaire et hypospadias. Au contraire, pour l'individu avec désordre testiculaire et des organes génitaux masculins normaux, c'est le X normal qui est inactif dans 96% de ses cellules. Les auteurs ont donc conclu que le patron d'inactivation a bel et bien un effet sur le degré de masculinisation des individus 46,X,der(X)t(X;Y) [Kusz et coll., 1999]. Toutefois, en regardant de plus près les données de Kusz et coll. [1999], on se rend compte que les 3 individus avec désordre ovotesticulaire ont un point de cassure à 100 kb ou moins de *SRY*, alors que les individus avec désordre testiculaire avec ou sans hypospadias ont un point de cassure beaucoup plus près du centromère. Il est donc possible que chez ces

patients, l'expression du gène *SRY* ait été affectée, ce qui pourrait aussi avoir contribué à leur phénotype. Compte tenu de ces données, il est possible que la propagation ou le maintien de l'inactivation sur le *der(X)* soit plus efficace lorsque le matériel provenant du Y est minimal [Bouayed Abdelmoula et coll., 2003]. En effet, on peut supposer que le patron d'inactivation du X et la distance entre le point de cassure et *SRY* jouent tous deux un rôle sur la variabilité du phénotype sexuel des patients. Dans les cas où le point de cassure est près de *SRY*, il y aurait plus de chances que le patient ait un désordre ovotesticulaire, que ce soit par dérégulation de l'expression de *SRY* et/ou par l'inactivation plus fréquente du *der(X)* et du matériel provenant du Y qu'il contient. Dans les cas où le point de cassure est loin de *SRY*, le phénotype serait plus souvent celui d'un désordre testiculaire, quoique l'inactivation plus fréquente du *der(X)* puisse parfois occasionner une certaine ambiguïté des organes génitaux externes, notamment de l'hypospadias.

Par ailleurs, une étude très récente de Poplinski et coll. [2010] suggère que les individus 46,XX *SRY*⁺ présentent un degré de méthylation de *XIST* significativement plus faible que les hommes 47,XXY et les femmes 46,XX. Les auteurs ont aussi comparé le taux de méthylation de leurs 8 individus 46,XX *SRY*⁺ avec désordre testiculaire à celui de 2 individus 46,XX *SRY*⁻ avec désordre testiculaire: les 2 individus 46,XX *SRY*⁻ montrent un taux significativement plus élevé de méthylation de *XIST* que celui des individus 46,XX *SRY*⁺, mais comparable à celui des hommes 47,XXY et des femmes 46,XX [Poplinski et coll., 2010]. Les quelques autres locus testés le long du chromosome X par les auteurs montrent un patron normal de méthylation. *XIST* est normalement méthylé sur le X normal, puisque l'expression de *XIST* engendre l'inactivation du X sur lequel il est exprimé, tel que vu à la section A.1.3.2 de l'introduction (page 41). L'hypométhylation de *XIST* chez les individus 46,XX *SRY*⁺ sous-entendrait donc qu'il y aurait une inactivation aberrante des deux chromosomes X, ce qui n'est pas compatible avec la vie, ni avec le fait que les autres locus testés sur le X inactif ont un patron normal de méthylation [Poplinski et coll., 2010]. Poplinski et coll. ont émis l'hypothèse que cette hypométhylation n'indiquerait pas un défaut d'inactivation de l'un des X, mais plutôt un problème épigénétique chez ces individus [Poplinski et coll., 2010], ce qui pourrait affecter l'expression génique de

plusieurs gènes. Cependant, les implications de ces données ne sont pas claires. Dans le futur, il sera intéressant de voir si ces résultats sont corroborés par d'autres équipes.

B.3.2.2 Causes rares

Tel que mentionné brièvement à la section B.3.1.2.2 (page 291), la surexpression de *Sox9* chez les souris XX *Sry*- entraîne la formation d'un testicule [Vidal et coll., 2001]. Ce modèle fait suite à la découverte de Bishop et coll. [2000], qui avaient rapporté que l'insertion d'un transgène pour corriger le phénotype de souris albinos avait causé, par accident, la délétion d'une séquence régulatrice de *Sox9* et un développement sexuel mâle chez ces souris suite à une surexpression de *Sox9*. Chez l'humain cependant, seulement quelques patients 46,XX *SRY*- avec désordre testiculaire et des altérations de *SOX9* sont connus: un patient avec une duplication du bras long du chromosome 17 où se trouve *SOX9* [Huang et coll., 1999], et 5 autres patients avec une surexpression de *SOX9* sans qu'il y ait duplication du gène [Kojima et coll., 2008]. Malheureusement, aucune recherche de mutation n'a été effectuée. Il est donc possible qu'une altération des séquences régulatrices chez ces patients ait causé leur développement testiculaire. Depuis, aucun autre cas similaire n'a été rapporté. Cela peut toutefois être expliqué par le fait que la fréquence des individus 46,XX avec désordre testiculaire est très faible (1 sur 20 000 à 25 000) et que les patients 46,XY *SRY*- sont encore plus rares. Il est donc difficile de dire dans quelle mesure une surexpression de *SOX9* peut contribuer au phénotype des hommes avec une constitution 46,XX *SRY*-.

Par ailleurs, les résultats récents obtenus par Polanco et coll. [2010] chez la souris XX qui développe des testicules suite à la surexpression de *Sox10* (voir la section B.3.1.2.2 à la page 291) suggèrent que ce n'est pas seulement *SOX9* qui pourrait être incriminé chez les individus 46,XX *SRY*- avec désordre testiculaire; *SOX10*, sur le chromosome 22, pourrait également être impliqué. D'ailleurs, tel que mentionné dans l'article 6 (page 220), quelques cas de développement sexuel anormal ont été répertoriés chez des individus XX avec une duplication partielle du chromosome 22 ou les fœtus avec une trisomie 22 [Cantu

et coll., 1981; Nicholl et coll., 1994; Aleck et coll., 1999; Manasse et coll., 2000; Seeherunvong et coll., 2004; Boyd et coll., 2005]. Toutefois, cette anomalie n'est pas rapportée dans tous les cas de trisomie 22 [revu dans Seeherunvong et coll., 2004]. Encore une fois, les données de Polanco et coll. [2010] sont éloquentes: en effet, si un testicule a été observé chez toutes les souris XX de la lignée tg^D surexprimant *Sox10*, seulement le tiers des souris femelles de la lignée tg^W ont présenté un développement testiculaire. Les analyses ont montré que les souris de la lignée tg^W exprimaient *Sox10* à des niveaux beaucoup plus faibles (environ cinq fois moins) que les souris de la lignée tg^D [Polanco et coll., 2010]. Les autres souris femelles de la lignée tg^W sans développement testiculaire présentaient toutefois des anomalies des organes génitaux internes et externes, ainsi qu'une gonade atrophique ou partiellement masculinisée d'un côté et un ovaire dysgénésique de l'autre [Polanco et coll., 2010]. Ce phénotype correspond à ce qui a été observé chez l'humain avec les patients 46,XX ayant une anomalie du développement sexuel et une duplication partielle ou complète du chromosome 22. Le phénotype sexuel de ces patients varie entre des organes génitaux internes/externes ambigus, une dysgénésie ovarienne ou testiculaire, et un désordre ovotesticulaire [Table I de l'article 6, page 228]. Une surexpression de *SOX10* pourrait donc expliquer le phénotype de patients 46,XX *SRY*- présentant un développement sexuel anormal. De plus, des polymorphismes entraînant une expression variable de *SOX10* pourraient expliquer pourquoi seulement une certaine proportion de patients avec une duplication ou une trisomie 22 et une constitution XX *SRY*- présente un développement sexuel anormal, et à des degrés variables.

D'autre part, tel que mentionné dans la section B.3.1.2.2 (page 291), des gènes de la voie de signalisation MAPK pourraient également être impliqués dans le développement testiculaire des patients 46,XX *SRY*- puisqu'ils semblent jouer un rôle dans le développement sexuel masculin [Bogani et coll., 2009; Polanco et coll., 2010]. Toutefois, de plus amples études chez la souris sont nécessaires pour étudier l'effet d'une surexpression de ces gènes sur le développement sexuel. Finalement, des mutations homozygotes de *RSPO1*, impliqué dans le développement sexuel féminin (Figure 4 de l'introduction, page 55), ont récemment été rapportées chez 5 individus 46,XX *SRY*- avec

désordre testiculaire [Parma et coll., 2006] et un individu 46,XX *SRY*- avec désordre ovotesticulaire [Tomaselli et coll., 2008]. D'autre part, les souris XX avec délétion homozygote de *Rspo1* (XX *Rspo1*^{-/-}) développent des ovotesticules et souffrent également d'un désordre ovotesticulaire [Chassot et coll., 2008; Tomizuka et coll., 2008]. Ces souris présentent des niveaux plus bas de *Wnt4* que les souris XX normales (femelles de type sauvage) [Chassot et coll., 2008; Tomizuka et coll., 2008]. En ce qui concerne *Sox9*, Tomizuka et coll. [2008] ont rapporté qu'il n'y a pas d'augmentation, alors que Chassot et coll. [2008] ont rapporté une faible augmentation de l'expression de ce gène par rapport aux souris femelles de type sauvage. Le vaisseau cœlomique, normalement retrouvé chez les souris mâles mais pas chez les souris femelles (Figure 4 de l'introduction, page 55), était présent chez les souris XX *Rspo1*^{-/-} [Chassot et coll., 2008; Tomizuka et coll., 2008]. De plus, une perturbation de la voie de la bêta-caténine a été notée chez ces souris [Chassot et coll., 2008]. Normalement, la bêta-caténine se retrouve sous trois formes dans la cellule: liée aux cadhérines impliquées dans les jonctions cellulaires, phosphorylée et libre dans le cytoplasme mais dégradée par le protéasome, ou non phosphorylée et libre dans le noyau pour activer la transcription génique [revu dans Conacci-Sorrell et coll., 2002]. Chez les souris XX *Rspo1*^{-/-}, il y avait une augmentation de la bêta-caténine liée aux cadhérines comparativement aux souris femelles de type sauvage, indiquant que cette voie de signalisation n'était pas activée [Chassot et coll., 2008]. La présence de bêta-caténine non phosphorylée dans le noyau des cellules est essentielle pour le développement ovarien, puisque l'augmentation des niveaux de la bêta-caténine non phosphorylée nucléaire dans les gonades d'embryons mâles de souris induit un développement ovarien [Maatouk et coll., 2008]. De plus, l'expression de *Sox9* et *Amh* est réduite chez ces souris [Maatouk et coll., 2008], indiquant que la voie de la bêta-caténine inhibe l'expression de ces deux gènes de façon directe ou indirecte. L'augmentation des niveaux de bêta-caténine non phosphorylée nucléaire dans les gonades des souris XX *Rspo1*^{-/-} permet d'ailleurs de renverser le développement sexuel anormal de ces souris [Chassot et coll., 2008].

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent donc que chez les patients 46,XX avec mutation homozygote de *RSPOI*, l'absence de ce gène fait en sorte que les voies de la bêta-caténine et *WNT4* ne sont pas assez activés pour inhiber l'effet de *SOX9*, même si ce dernier

n'est pas suractivé puisque *SRY* est absent, ni pour activer *NROB1*. Il y aurait donc formation du vaisseau cœlomique mais pas de sécrétion d'AMH, engendrant un développement sexuel masculin (Figure 4 de l'introduction, page 55). Il est possible que chez l'humain, selon le type de mutation de *RSPO1*, ce dernier puisse activer la voie de la bêta-caténine et *WNT4* à des degrés différents, engendrant un phénotype sexuel variable: une masculinisation complète quand *WNT4* n'est pas du tout activé, et un désordre ovotesticulaire lorsque que l'activation est partielle.

B.3.2.3 Cas familiaux

Bien que la plupart des cas d'individus avec désordre testiculaire du développement sexuel soit sporadique, quelques cas familiaux ont été rapportés [revu dans Zenteno-Ruiz et coll., 2001]. Dans la plupart de ces cas, le gène *SRY* n'est pas présent, ce qui suggère une transmission autosomique récessive ou liée au chromosome X [revu dans Zenteno-Ruiz et coll., 2001]. Récemment, tel que mentionné brièvement dans la section précédente, la découverte d'une mutation homozygote du gène *RSPO1*, en 1p34.3, chez 4 individus 46,XX *SRY*- d'une même famille avec hyperkératose palmoplantaire et une susceptibilité à développer des carcinomes des cellules squameuses de la peau, a confirmé l'existence d'un tel mode de transmission [Parma et coll., 2006]. De plus, les auteurs de cette étude ont confirmé que la même mutation homozygote chez un homme 46,XY de cette famille ne cause pas d'anomalies du développement sexuel ou d'infertilité, bien qu'elle cause une hyperkératose palmoplantaire et une susceptibilité à développer des carcinomes des cellules squameuses de la peau [Parma et coll., 2006]. Cela démontre donc qu'une telle mutation peut être transmise sur de nombreuses générations et causer un désordre testiculaire uniquement chez les individus 46,XX homozygotes. Il existe tout de même quelques cas familiaux où la cause du développement sexuel anormal est due à une t(X;Y). On note par exemple le cas de 3 cousins 46,X,der(X) *SRY*+ où une translocation X;Y a été retrouvée [de la Chapelle et coll., 1977; Page et coll., 1985]. Il est possible que les hommes sains de ces familles soient porteurs d'une inversion polymorphique du bras court du Y, augmentant ainsi les chances d'une recombinaison anormale entre les gènes *PRKX* et *PRKY*, tel que

mentionné dans l'introduction (section A.3.2.1, page 74). Page et coll. [1985] ont d'ailleurs évoqué, à l'époque, la possibilité que le chromosome Y des pères soit porteur d'une « mutation le rendant susceptible à ce remaniement ».

On note également un désordre ovotesticulaire du développement sexuel dans une dizaine de familles avec des cas de désordre testiculaire du développement sexuel [revu dans Sarafoglou et Ostrer, 2000; Zenteno-Ruiz et coll., 2001]. Le pedigree le plus imposant rapporté à ce jour comprend 9 individus 46,XX *SRY*⁻ atteints en 7 générations dans une famille consanguine de Turquie: 6 avec désordre testiculaire et 3 avec désordre ovotesticulaire [Temel et coll., 2007]. Il est possible qu'une mutation homozygote de *RSPO1* soit présente dans certaines de ces familles, puisqu'une mutation de ce gène a été rapportée autant dans des cas de désordre testiculaire qu'ovotesticulaire [Parma et coll., 2006; Tomaselli et coll., 2008]. Des polymorphismes d'autres gènes du développement sexuel masculin pourraient également expliquer la variabilité phénotypique des différents membres de ces familles. Toutefois, aucune de ces familles ne semble avoir été testée. D'autre part, Abbas et coll. [1993] ont rapporté le cas de 2 frères 46,X,der(X) *SRY*⁺, l'un avec désordre testiculaire et l'autre avec désordre ovotesticulaire, qui avaient hérité du der(X) *SRY*⁺ de leur père. En effet, celui-ci avait une constitution 46,Y,der(X) et possédait deux copies du *SRY*, l'une sur son chromosome Y et l'autre sur son chromosome X [der(X)]. Plus récemment, Sharp et coll. [2004] ont rapporté un cas identique: un individu avec une constitution 46,X,der(X) *SRY*⁺ et un désordre ovotesticulaire dont le père est porteur d'un der(X) *SRY*⁺ et d'un Y *SRY*⁺. Dans la même publication, Sharp et coll. ont également rapporté le cas d'un autre patient 46,X,der(X) *SRY*⁺ avec un désordre ovotesticulaire qui a hérité du der(X) *SRY*⁺ de sa mère; une sœur de la mère est également porteuse du même der(X) [Sharp et coll., 2004]. Dans les deux publications, aucune recherche de mutation du *SRY* sur le der(X) n'a été faite pour vérifier la cause réelle du désordre testiculaire ou ovotesticulaire des patients. Quant aux auteurs eux-mêmes, ils ont plutôt expliqué le phénotype normal des femmes porteuses par une pénétrance variable du *SRY* sur le der(X) [Sharp et coll., 2004] ou une plus grande proportion de cellules avec le der(X) inactif chez les femmes porteuses mais pas chez les individus atteints [Abbas et

coll., 1993]. Toutefois, aucune étude de l'inactivation du *der(X)* n'a été faite. Quant aux cas de Sharp et coll. [2004], l'inactivation biaisée du *der(X)* comme mécanisme a été écartée puisque le *der(X)* n'était pas plus souvent inactif chez les femmes porteuses, dans le sang du moins. Les auteurs ont plutôt suggéré qu'il y avait pénétrance variable du *SRY*, puisque le point de cassure ne se trouvait qu'à 6-7 kb en-dessous de ce gène.

B.4 La pathogenèse des tumeurs gonadiques et les implications du tissu gonadique indifférencié dans les gonades dysgénésiques

B.4.1 Le modèle de pathogenèse des tumeurs gonadiques

Les tumeurs des cellules germinales (TCG) sont classiquement classées en cinq catégories, selon l'histologie, le site anatomique et l'âge des patients [Oosterhuis et Looijenga, 2005; van de Geijn et coll., 2009]:

- type I: tératomes et les tumeurs du sac vitellin chez les enfants en bas âge;
- type II: séminomes (dans les testicules; dysgerminomes dans les ovaires ou les gonades dysgénésiques) et non-séminomes (tels que les carcinomes embryonnaires et les choriocarcinomes);
- type III: séminomes spermatocytiques chez les hommes de plus de 50 ans;
- type IV: kystes dermoïdes;
- type V: môles hydatiformes chez les femmes fertiles.

Chez les individus souffrant d'un désordre du développement sexuel, on observe un risque accru pour les TCG de type II [revu dans van de Geijn et coll., 2009]. D'ailleurs, chez les patients avec un développement sexuel anormal que nous avons étudiés, nous n'avons retrouvé que des TCG de type II, qu'elles soient de type séminome ou non-séminome, comme nous le verrons [articles 4 et 5, pages 170 et 184 respectivement]. Cette classe de tumeurs germinales est également la plus étudiée dans la littérature [Oosterhuis et

Looijenga, 2005]; c'est pourquoi nous nous concentrerons uniquement sur les TCG de type II dans les pages qui suivent.

Ces tumeurs, bien que subdivisées en deux groupes, dérivent d'un précurseur commun, la néoplasie non spécifiée des cellules germinales intratubulaires (IGCNU) dans le testicule ou le gonadoblastome dans les gonades dysgénésiques [revu dans Oosterhuis et Looijenga, 2005; van de Geijn et coll., 2009]. Nous avons d'ailleurs rapporté la présence de foyers de gonadoblastomes à proximité de TCG de type II des deux groupes, soit 5 dysgerminomes (séminome) ainsi qu'un choriocarcinome (non-séminome) dans les gonades d'un total de 10 patientes XY avec une dysgénésie gonadique [articles 4 et 5, pages 170 et 184 respectivement]. Les analyses ayant révélé des similarités au niveau des anomalies chromosomiques et des niveaux d'expression génique dans chacun des groupes de TCG de type II, plusieurs auteurs ont émis l'hypothèse que ces deux groupes dériveraient d'un processus pathogénique similaire [Summersgill et coll., 1998; Looijenga et coll., 2000; McIntyre et coll., 2007]. En effet, il a été suggéré que le développement de non-séminomes à partir de séminomes pouvait être causé par la perte de matériel chromosomique, les séminomes étant hypertriploïdes alors que les non-séminomes sont hyperdiploïdes [revu dans Summersgill et coll., 1998; Looijenga et coll., 2000]. De ce fait, dans la plupart des études, les TCG de type II sont souvent classées en séminome ou non-séminome et analysées comme un tout.

B.4.1.1 Gène *TSPY*

L'implication de *TSPY* dans les TCG de type II est soupçonnée depuis la fin des années 1990, après que des analyses moléculaires aient suggéré que ce gène était l'un des candidats les plus intéressants à se trouver dans la région contenant le locus de susceptibilité au gonadoblastome sur le chromosome Y, le *GBY* [revu dans Lau, 1999], localisé sur le bras court en Yp11.2 (Figure 2 de l'introduction, page 38). Depuis, des études ont clairement démontré que ce gène est surexprimé dans les gonadoblastomes, les séminomes, les IGCNU et les cancers de la prostate [revu dans Lau et coll., 2003]. Le rôle

de *TSPY* dans les cellules germinales normales n'est pas très clair, ce qui rend l'étude de son implication dans les TCG de type II difficile. Toutefois, des travaux récents par Lau et coll. [2009] suggèrent que *TSPY* se lierait à la cycline B1 et activerait la phosphorylation de cette dernière afin d'accélérer le passage du stade G2 du cycle cellulaire vers la phase de mitose, que ce soit dans la mitose (spermatogonies) ou la méiose (spermatocytes et spermatoïdes ronds). Il a donc été suggéré que l'un des mécanismes par lequel *TSPY* induit la tumorigenèse serait une accélération de la transition G2/M, de sorte que le point de contrôle qui s'y trouve serait évité. Il pourrait ainsi en résulter une augmentation de l'instabilité génétique, menant éventuellement à la tumorigenèse [revu dans Lau et coll., 2009]. D'ailleurs, Fung et coll. [2007] ont démontré que 75% des lignées de TCG de type II qu'ils ont étudiées ne s'arrêtent pas au point de contrôle G2/M lorsque mises en présence de substances inhibant le fuseau mitotique. Ils ont corrélé cette anomalie à une diminution d'expression de la protéine *MAD2*, une des composantes de ce point de contrôle [Fung et coll., 2007]. De plus, *TSPY* possède, chez l'humain, plusieurs homologues sur d'autres chromosomes, dont certains sont actifs. La protéine encodée par *TSPX*, homologue de *TSPY* sur le chromosome X, lie elle aussi les cyclines B impliquées dans la transition G2/M de la mitose et de la méiose. Toutefois, contrairement à *TSPY*, *TSPX* aurait un effet inhibiteur, induisant un ralentissement voire même un arrêt du cycle cellulaire [revu dans Lau et coll., 2009]. Le rôle de *TSPX* dans les TCG de type II demeure toutefois inconnu.

D'autre part, il a été rapporté que *TSPY* pouvait également induire l'expression de certains gènes se trouvant sur le bras court du chromosome 12 [revu dans Lau et coll., 2009], une région souvent impliquée dans les TCG de type II, tel que décrit plus en détail dans la section suivante. Or, la surexpression de *TSPY*, présente dans les stades plus précoces des TCG de type II, est parfois perdue dans les tumeurs plus invasives. Ainsi, Kersemaekers et coll. [2005] ont documenté la présence de la protéine *TSPY* dans des gonadoblastomes et des IGCNU adjacents à des séminomes et non-séminomes, de même que dans des séminomes intratubulaires. Toutefois, l'expression de *TSPY* était diminuée dans les séminomes envahissants et les dysgerminomes, et absente dans les non-séminomes et les carcinomes embryonnaires intratubulaires, bien que le chromosome Y soit toujours

présent dans ces tumeurs [Kersemaekers et coll., 2005]. Par ailleurs, Li et coll. [2007a] ont aussi rapporté la présence de la protéine TSPY dans les IGCNU, les séminomes ainsi que dans les métastases de séminomes dans les ganglions lymphatiques, alors que les signaux pour TSPY étaient très faibles ou carrément absents dans les nonséminomes tels que les tératomes, les tumeurs du sac vitellin et les carcinomes embryonnaires [Li et coll., 2007]. Il a donc été proposé que l'expression de *TSPY* est nécessaire pour les premiers stades des TCG de type II, mais qu'elle ne l'est plus par la suite, possiblement parce que la progression maligne nécessite des gains de la région 12p [van Echten et coll., 1995; Rosenberg et coll., 2000; Ottesen et coll., 2003] et que la stimulation par *TSPY* des gènes se trouvant sur ce chromosome n'est donc plus requise [Looijenga et coll., 2007]. Cela pourrait expliquer la perte du chromosome Y qui est retrouvée dans certaines TCG de type II [van Echten et coll., 1995; Korn et coll., 1996; Ottesen et coll., 1997], ainsi que dans le choriocarcinome de notre patiente XY [article 4, page 170].

B.4.1.2 Autres gènes impliqués

Pratiquement toutes les TCG de type II présentent un gain de la région chromosomique 12p, le plus souvent (80% des cas) sous forme d'isochromosome 12p [i(12)(p)] [revu dans Summersgill et coll., 1998; di Pietro et coll., 2005]. Quelques études ont suggéré que la région critique se trouvait près du centromère, en 12p11.2-12.1 [revu dans McIntyre et coll., 2007]. Plusieurs gènes pluripotents associés à la prolifération cellulaire se trouvent sur le bras court du chromosome 12: *NANOG*, *NRAS*, *KRAS* et *CCND2* étant parmi les plus intéressants [revu dans di Pietro et coll., 2005; Rajpert-de Meyts et Høe-Hansen, 2007]. En effet, *NANOG* est l'un des gènes impliqués dans le renouvellement et la pluripotence des cellules embryonnaires et germinales primordiales, et est surexprimé dans de nombreuses TCG de type II [revu dans Looijenga et coll., 2007; Rajpert-de Meyts et Høe-Hansen, 2007]. En ce qui a trait aux gènes de la voie de signalisation *RAS*, que ce soit *NRAS* ou *KRAS*, ils activent la transcription, entre autres, du gène *KIT*, qui est nécessaire à la survie, la prolifération et la migration des cellules germinales primordiales pendant l'embryogenèse. De hauts niveaux d'expression de ce

gènes sont rapportés dans les TCG de type II, de même que des mutations activatrices et des amplifications de la région chromosomique 4q12 où le gène est localisé [revu dans Honecker et coll., 2004; McIntyre et coll., 2004; di Pietro et coll., 2005; McIntyre et coll., 2008]. Par ailleurs, *CCND2* est une cycline de type D qui est impliquée dans le passage de la phase G1 à S dans le cycle cellulaire. Ce gène est surexprimé dans les TCG de type II, et son expression peut être augmentée par *TSPY* et la voie de signalisation *RAS*, également surexprimés dans les TCG de type II. La surexpression de *CCND2* a pour conséquence la phosphorylation de *RBI*, un gène suppresseur de tumeur, et d'empêcher ce dernier de bloquer la transition G1/S. Il en résulte donc une dérégulation du point de contrôle dans les TCG de type II, augmentant ainsi l'instabilité génétique de ces tumeurs [revu dans di Pietro et coll., 2005].

D'autre part, les protéines SOX2 et SOX13 semblent aussi être surexprimées dans certaines TCG de type II. Ces protéines sont connues pour jouer un rôle inhibiteur dans la différenciation des cellules lors du développement embryonnaire et peuvent interagir avec le gène pluripotent *OCT3/4* (aussi appelé *POU5F1*), qui est lui aussi exprimé dans les TCG de type II [revu dans van de Geijn et coll., 2009]. La surexpression de gènes *OCT3/4*, *NANOG* et *KIT*, et possiblement de *SOX2* et *SOX13*, dans les TCG de type II semble donc non seulement jouer un rôle important pour la pathogenèse de ces tumeurs, mais elle confirme également le modèle selon lequel les IGCNU dérivent de cellules germinales dont la différenciation n'a pas eu lieu correctement [Honecker et coll., 2004].

De nombreux gains et pertes chromosomiques ont été notés dans les TCG de type II, bien que seul l'i(12)(p) soit récurrent [van Echten et coll., 1995; Summersgill et coll., 1998]. Dans la plupart des cas, aucun gène candidat n'a vraiment été identifié, à l'exception des gènes du bras court du chromosome 12 tel que discuté plus tôt. Parmi les gains chromosomiques pour lesquels d'autres gènes candidats ont été suggérés, on note les régions 2p24-25 (*MYCN*), 2q31 (*CDCA7*), 4q12 (*KIT*), 8p23 (*SOX17*), 8q21 (*TPD52*), 17q12 (*GRB7*), 17q21.3 (*CDK5RAP3*), 22q11.23 (*MIF*) et Xp11.23 (*ARAF1* et *ELK1*) [Korn et coll., 1996; Kawakami et coll., 2003; McIntyre et coll., 2004; Oosterhuis et Looijenga, 2005; McIntyre et coll., 2007; van de Geijn et coll., 2009]. Du côté des pertes

chromosomiques, des gènes candidats ont été proposés pour les régions 1p32-36 (*CDC2L2*), 3q29 (*PAK2*), 13q14 (*RBI*), 18q21.3 (*DCC*), et 22q12 (*CHK2*) [Summersgill et coll., 1998; McIntyre et coll., 2004]. Cependant, l'implication précise de ces gènes n'a pas été confirmée dans les TCG de type II.

L'analyse par micropuces que nous avons réalisée sur le choriocarcinome localisé à proximité d'un gonadoblastome d'une des deux patientes 46,XY [article 4, page 170] a montré des gains compatibles avec les régions remaniées rapportées dans la littérature pour les TCG de type II non-séminomes, notamment au niveau des chromosomes 1, 2p/2q, 4q, 5p/5q, 6q, 7, 11p, 13q, 17, 21, and X [Summersgill et coll., 1998; McIntyre et coll., 2007]. Toutefois, nous avons également rapporté des différences; par exemple, aucun changement n'a été noté dans le nombre de copies sur les chromosomes 8 et 18. Il est difficile d'expliquer la signification de ces divergences puisque les études de micropuces publiées dans la littérature impliquent différents spécimens de TCG de type II fréquemment regroupés en catégories (séminome et non-séminome) plutôt que par type de tumeurs. De plus, aucune autre étude par micropuces ciblant un choriocarcinome n'a été rapportée. La localisation du choriocarcinome près des îlots d'un gonadoblastome ainsi que la similarité des anomalies chromosomiques du choriocarcinome avec les autres TCG de type II suggèrent fortement que le choriocarciome de cette patiente a évolué à partir de son gonadoblastome [article 4, page 170].

Plus récemment, certains auteurs ont commencé à s'intéresser à un concept nommé « interrupteur mitose:méiose ». L'hypothèse est que l'entrée prématurée en méiose des cellules germinales se trouvant dans un environnement inadéquat (dysgénésie gonadique ou retard de maturation des testicules) pourrait entraîner une polyploidie et une instabilité génétique [Rajpert-de Meyts et Hoei-Hansen, 2007]. Par exemple, une co-expression inappropriée de gènes impliqués dans la mitose et la méiose pourrait engendrer la présence de protéines contrôlant normalement l'attachement des chromosomes homologues à la méiose (complexe synaptonémal) dans des cellules encore en mitose, de sorte que la ségrégation des chromosomes pourrait être perturbée [Adamah et coll., 2006; Jessberger,

2008]. D'ailleurs, l'expression anormale d'une des protéines du complexe synaptonémal, *SYCP3*, dans des cellules en mitose a été rapportée dans des cas de carcinomes embryonnaires, des TCG de type II non-séminomes [Adamah et coll., 2006]. Ces cellules germinales prématurément entrées en méiose pourraient ensuite retourner en mitose, entraînant leur prolifération anormale, suite à des mutations dans les gènes responsables de l'initiation et du maintien de la méiose dans les cellules germinales des gonades [Jessberger, 2008].

B.4.2 Les implications du tissu gonadique indifférencié dans les gonades dysgénésiques

Tel que mentionné en introduction (section A.2.2.1.2, page 61), la dysgénésie gonadique pure XY est généralement caractérisée par la présence d'une gonade fibreuse, appelée bandelette gonadique, chez des patients de phénotype féminin avec un chromosome Y normal ou remanié. À l'opposé, la dysgénésie gonadique mixte XY est caractérisée par la présence d'un testicule dysgénésique et d'une bandelette gonadique contralatérale, d'un testicule dysgénésique sans gonade contralatérale, ou encore de deux testicules bilatéraux dysgénésiques [revu dans Robboy et Jaubert, 2009]. Ces patients, avec un chromosome Y normal ou remanié, peuvent avoir un phénotype sexuel masculin ou féminin.

Bien que la description du tissu gonadique indifférencié (TGI) n'ait été que récemment précisée par Cools et coll. [2006b], certains auteurs avaient déjà par le passé décrit quelques entités qui pouvaient s'apparenter à du TGI, sans toutefois les avoir clairement identifiées comme un nouveau patron de différenciation gonadique [Robboy et coll., 1982; 2002a; revu dans Cools et coll., 2006b]. De plus, dans l'édition 2009 de son atlas de pathologie, Robboy mentionne que certaines gonades dysgénésiques contiennent des zones indifférenciées avec des cordons sexuels primaires persistants [Robboy et Jaubert, 2009], ce qui correspond à du TGI. Cependant, il ne mentionne pas les travaux de Cools et coll. Tel qu'il a été décrit par ces derniers, le TGI est une sorte d'intermédiaire

entre une bandelette gonadique avec des cordons sexuels sans cellule germinale et un testicule dysgénésique où les cellules germinales sont organisées en cordons sexuels bien différenciés. Cependant, certaines gonades sont composées à la fois d'une bandelette, de TGI et d'un testicule, formant ainsi une sorte de continuum (testicule-bandelette). Bien que Cools et coll. [2006b] fassent la différence dans leur classification entre le TGI et une bandelette gonadique, nous croyons plutôt que la gonade constituée d'une bandelette devrait être considérée comme tel, qu'elle contienne ou non du TGI, puisque le TGI se retrouve soit dans une bandelette gonadique, soit en périphérie d'un testicule dysgénésique.

Afin de mieux comprendre le lien entre les différents patrons de différenciation gonadique, les tumeurs et la dysgénésie gonadique, nous avons effectué une analyse rétrospective par histologie et immunohistochimie sur les gonades de patients avec une dysgénésie gonadique XY pure ou mixte [article 5, page 184]. Dans notre cohorte de 30 patients, 22 d'entre-eux souffrent de dysgénésie gonadique pure alors que 8 montrent une dysgénésie gonadique mixte. Au total, 51 gonades ont pu être analysées, les deux gonades de chaque patient n'étant pas toujours disponibles, tel que montré dans la table I de l'article 5 (page 190).

Globalement, nous avons trouvé une tumeur gonadique chez 10 des 22 patients avec une dysgénésie gonadique pure. Cette fréquence de 45% (10/22) est un peu plus élevée que la fréquence de 30% rapportée dans la littérature pour la dysgénésie gonadique pure [revu dans Verp et Simpson, 1987]. Dans le cas de la dysgénésie gonadique mixte, la fréquence des tumeurs est estimée à 15% [revu dans Cools et coll., 2006a]; le fait que nous n'ayons trouvé aucune tumeur chez nos 8 patients peut être expliqué en partie par la petite taille de notre échantillon. Cela pourrait aussi s'expliquer par l'âge précoce de la gonadectomie de nos patients, mais nous y reviendrons plus tard. En ce qui concerne les tumeurs retrouvées chez 10 de nos patients avec une dysgénésie gonadique pure, la grande majorité des tumeurs retrouvées sont des gonadoblastomes. Dans 4 des 11 gonadoblastomes étudiés, un dysgerminome adjacent a aussi été identifié. En effet, les gonadoblastomes sont presque

exclusivement retrouvés chez les patients avec une dysgénésie gonadique XY, qu'elle soit pure ou mixte [revu dans Verp et Simpson, 1987] et environ 50% d'entre eux évoluent en dysgerminomes [revu dans Talerman et Schwartz, 2003]. De plus, un cas rare de choriocarcinome a aussi été retrouvé, également associé à un gonadoblastome; ce choriocarcinome a d'ailleurs été étudié par micropuces, tel que présenté à la section B.4.1.2 (page 310).

En ce qui concerne le TGI, les résultats que nous avons obtenus chez nos patients [Table I de l'article 5, page 190] indiquent que ce patron de différenciation gonadique est un facteur de risque important pour le développement de tumeurs gonadiques. En effet, dans 9 des 10 gonades où du tissu non-néoplasique était encore présent en périphérie des tumeurs, du TGI y a été retrouvé [article 5, page 184]. Du TGI est donc présent dans 90% de toutes les tumeurs gonadiques analysées dans notre étude, comparativement à 67% dans l'étude de Cools et coll. [2006b].

D'autre part, Cools et coll. [2006b] ont rapporté que parmi leurs patients avec une dysgénésie gonadique (pure ou mixte) n'ayant pas développé de tumeurs gonadiques, ceux âgés de 4 ans et moins avaient significativement moins souvent de bandelette gonadique sans TGI (4/25) comparativement à ceux de plus de 4 ans (10/15). Les bandelettes gonadiques retrouvées chez l'ensemble des patients, peu importe leur âge, présentaient toutefois des structures ressemblant à des cordons sexuels ne contenant plus de cellules germinales, suggérant ainsi qu'il y avait eu du TGI dans ces gonades [Cools et coll., 2006b]. Dans notre cohorte de patients, nous avons également remarqué la présence de cordons sexuels ne contenant plus de cellules germinales dans 13 des 28 bandelettes gonadiques ne comportant pas de TGI ou de tumeurs [article 5]. Nos résultats suggèrent donc que le TGI peut évoluer vers deux entités: une tumeur gonadique, ou une bandelette gonadique suite à l'apoptose des cellules germinales. Ainsi, plus la gonadectomie est effectuée de façon précoce, plus il y a de chances que l'on retrouve du TGI lors de l'analyse des gonades [Cools et coll., 2006b]. Les résultats que nous avons obtenus chez nos patients indiquent une tendance similaire, quoique moins marquée. Nous avons retrouvé une

bandelette gonadique dans 12 des 18 gonades sans tumeurs chez nos patients de 4 ans et moins dans les deux formes de dysgénésie gonadique, alors que toutes les gonades sans tumeurs (21/21) chez les plus de 4 ans étaient des bandelettes [article 5]. D'autre part, du TGI a été retrouvé dans 6 des 18 gonades sans tumeurs chez nos patients de 4 ans et moins, alors qu'aucune des gonades sans tumeur chez nos patients de plus de 4 ans ne contenait de TGI.

Nous pouvons par ailleurs regarder les données sous un autre angle, à savoir la fréquence des tumeurs chez les patients des deux groupes d'âge. Dans les études de Cools et coll. [2006b; 2007], sur un total de 21 gonades avec TGI chez les patients de 4 ans et moins, seulement 2 contenaient des tumeurs. Au contraire, chez les plus de 4 ans, 10 des 11 gonades avec TGI contenaient une tumeur. Par ailleurs, un total de 4 tumeurs gonadiques (dont 2 avec TGI adjacent) ont été rapportées chez les 4 ans et moins contre 18 tumeurs (avec du TGI dans 10 des 15 cas avec tissu non-néoplasique adjacent) chez les plus de 4 ans. Dans notre étude, nous avons également fait une observation comparable: aucun cas de tumeurs dans les 6 gonades avec TGI chez les 4 ans et moins, alors que les 9 gonades avec TGI avaient une tumeur chez les plus de 4 ans [article 5, page 184]. Également, nous n'avons noté aucune tumeur gonadique chez les 4 ans et moins de notre cohorte, mais 12 tumeurs (avec du TGI dans 9 des 10 cas avec tissu non-néoplasique adjacent) chez les plus de 4 ans. Ainsi, le TGI évoluant avec le temps vers une bandelette gonadique ou une tumeur, il y a moins de tumeurs reliées au TGI chez les patients ayant subi une gonadectomie en bas âge que chez ceux ayant subi une gonadectomie plus tardivement.

Dans l'ensemble, ces données suggèrent que le TGI est un facteur de risque important pour le développement de tumeurs gonadiques. Il en ressort également que même si le TGI n'évolue pas toujours vers une tumeur gonadique et qu'il disparaît parfois pour laisser place à une bandelette gonadique avec le temps, une tumeur gonadique se développe dans un bon nombre de cas. Bien que du TGI ait été retrouvé chez 4 de nos 8 patients avec une dysgénésie gonadique mixte, aucun n'a développé de tumeur. Il est possible que

l'apparence généralement asymétrique des organes génitaux externes des individus avec une dysgénésie gonadique mixte permette un diagnostic précoce dans la plupart des cas, ce qui permettrait de diminuer les risques de tumorigenèse. De plus, les différences dans la fréquence des tumeurs entre les deux groupes d'âge entre notre étude et celles de Cools et coll. [2006b; 2007] pourrait s'expliquer par les caractéristiques de nos échantillons respectifs. En effet, Cools et coll. avaient à leur disposition un nombre de gonades un peu plus élevé que le nôtre (82 au total contre 51). La distribution des patients entre les groupes d'âge (4 ans et moins et plus de 4 ans) différait également: 38 contre 40 respectivement pour Cools et coll. [2006b; 2007] comparativement à 33 contre 18 dans notre étude.

Bien que le TGI soit détectable par simple coloration HPS, étant donné l'apparence caractéristique des cellules germinales, nos travaux sur ce nouveau patron de différenciation gonadique montrent l'utilité d'avoir recours à certaines colorations par immunohistochimiques, notamment avec des marqueurs pour les cellules germinales immatures (PLAP, CD117 et OCT3/4) [article 5, page 184]. Ces marqueurs permettent en effet de mieux évaluer la proportion de cellules germinales immatures dans les coupes histologiques, et donc d'évaluer s'il y a expansion de ces cellules et début d'un gonadoblastome. De plus, l'utilisation d'un anticorps contre l'inhibine, qui marque les cellules de soutien (Leydig, Sertoli, granulosa et thèque), permet le diagnostic différentiel entre les cordons de TGI et de dysgerminome, lorsque ceux-ci sont présents autour d'un îlot de gonadoblastome. En effet, si des gonadoblastomes avec du TGI à leur périphérie ont été retrouvés chez nos patients, des gonadoblastomes avec début de dysgerminome ont également été observés. Or, le TGI et les dysgerminomes étant tous les deux constitués de cordons avec cellules germinales immatures, il peut être difficile de différencier les deux entités par simple coloration HPS. Une coloration à l'inhibine peut alors s'avérer utile, puisque contrairement aux cordons de TGI, les cordons de dysgerminome ne contiennent plus de cellules de soutien et ne sont donc pas positifs à l'inhibine.

L'utilisation de ces marqueurs immunohistochimiques est donc indiquée dans l'étude des gonades provenant de patients avec une dysgénésie gonadique XY puisqu'elle permet de déceler la présence de TGI dans les bandelettes gonadiques, indiquant ainsi que ces patients sont plus à risque de développer une tumeur que les patients dont les bandelettes ne comportent pas de TGI. Il est certain que chez les fillettes ou adolescentes diagnostiquées avec une dysgénésie gonadique XY, cette évaluation du risque de tumeur gonadique est essentiellement rétrospective puisque la gonadectomie bilatérale *de facto* est préconisée, et ce dès le diagnostic. En effet, les gonadoblastomes sont souvent microscopiques et peuvent être plus difficiles à déceler, jusqu'au moment où ils évoluent vers un dysgerminome. De plus, chez les fillettes avec une dysgénésie gonadique mixte, la gonadectomie permet également d'éviter la masculinisation suite à la sécrétion de testostérone à la puberté par les cellules de Leydig [Robboy et coll., 1982]. Finalement, la gonadectomie n'altère pas les chances de fertilité de ces patientes, puisqu'elles sont d'ores et déjà infertiles. Il est donc préférable de procéder à la gonadectomie le plus tôt possible après le diagnostic de dysgénésie gonadique chez ces patientes afin de prévenir le développement de tumeur gonadique, dont la fréquence est estimée à 30% dans la dysgénésie gonadique pure [Verp et Simpson, 1987] et 15% dans la dysgénésie gonadique mixte [révisé dans Cools et coll., 2006a]. L'utilisation rétrospective de marqueurs immunohistochimiques pour les cellules germinales immatures sur les tissus gonadiques ôtés chez ces individus permettra une évaluation plus précise de la proportion exacte de patientes avec une dysgénésie gonadique XY qui développent une tumeur gonadique, ainsi qu'une meilleure compréhension des étapes de l'évolution du TGI vers une tumeur gonadique.

Au contraire, chez les garçons diagnostiqués avec une dysgénésie gonadique XY mixte, la préservation du tissu testiculaire est souhaitable, lorsque possible, afin d'assurer une puberté et possiblement une fertilité normales chez le plus grand nombre possible de ces patients. C'est pourquoi une biopsie gonadique est d'abord suggérée, et l'utilisation de ces marqueurs immunohistochimiques permet de mieux évaluer, dans les limites de la biopsie, les risques de développer une tumeur gonadique. Si on ne découvre pas de TGI à la biopsie, la gonade peut être fixée ou laissée dans le scrotum, à condition qu'un suivi clinique annuel par palpation ou examen échographique soit offert afin de détecter toute

masse suspecte qui pourrait se développer éventuellement. Au contraire, si du TGI ou une tumeur gonadique est clairement identifié dans la biopsie, la gonadectomie immédiate est préconisée. Par ailleurs, si des cellules germinales immatures sont retrouvées dans la biopsie sous forme de lésions *in situ*, notamment les IGCNU, sans qu'il y ait de TGI ou de tumeurs, certains auteurs suggèrent que la gonade puisse être fixée ou laissée dans le scrotum après irradiation à faible dose [Cools et coll., 2006a; 2009] afin d'éviter tout risque de transformation néoplasique. Un tel traitement n'affecterait pas les cellules de Leydig, ce qui permettrait de préserver la fonction hormonale et assurerait donc une puberté normale pour les patients [révisé dans Cools et coll., 2006a]; il en résulterait cependant une infertilité puisque les cellules germinales disparaissent par apoptose. Toutefois, des études sur un plus grand nombre de patients sont nécessaires afin de s'assurer qu'une telle façon de procéder élimine véritablement tout risque de tumorigenèse subséquente dans les gonades.

Conclusion générale

Le développement sexuel étant un processus très complexe impliquant de nombreux gènes dont le dosage et le patron d'expression sont finement réglés, il n'est pas surprenant qu'il puisse être altéré de plusieurs façons chez l'être humain. Ainsi, une mutation modifiant le niveau d'expression de la protéine d'un gène ou altérant les interactions de celle-ci avec ses gènes cibles ou partenaires peut avoir des conséquences graves sur le développement sexuel. Par ailleurs, des anomalies affectant la structure ou le nombre de chromosomes sur lesquels se trouvent les gènes du développement sexuel peuvent également interférer avec ce processus, puisque le dosage de ces gènes peut être modifié. À ce titre, les anomalies affectant les chromosomes sexuels sont particulièrement importantes, étant donné leur fréquence relativement élevée chez l'humain et leur impact sur le phénotype sexuel des individus qui en sont porteurs. Toutefois, les outils cytogénétiques disponibles dans le commerce permettant de bien caractériser les régions remaniées sont souvent limités, de sorte que l'impact des anomalies structurales impliquant les chromosomes X et Y sur le nombre de copies de plusieurs gènes est sous-estimé. D'autre part, les raisons pour lesquelles certains des remaniements affectant ces chromosomes sont plus fréquents ne sont pas bien comprises, entre autre parce que les régions impliquées dans les réarrangements structuraux ne sont pas clairement identifiées. De plus, certaines de ces anomalies peuvent être présentes en mosaïque chez les individus, de sorte que l'impact peut varier d'un tissu à l'autre, selon la proportion de cellules comportant l'anomalie en question. Dans le cas du développement sexuel, le mosaïcisme dans les gonades est particulièrement important puisque le phénotype sexuel des patients est dicté en grande partie par le type de tissu gonadique présent. La présence d'un chromosome Y normal ou remanié chez les patients avec une anomalie du développement sexuel peut également entraîner la formation de tumeurs gonadiques. Toutefois, les facteurs de prédisposition à la tumorigenèse ne sont pas bien connus et l'on procède donc à une gonadectomie préventive chez plusieurs patients. Malheureusement, les gonades ne sont que rarement étudiées par des techniques cytogénétiques, de sorte que l'impact du mosaïcisme gonadique des différentes anomalies des chromosomes X et Y sur le développement gonadique et le phénotype sexuel est méconnu.

Afin de palier à ces lacunes et de contribuer à éclaircir les différents mécanismes impliqués, nous avons dans un premier temps entrepris de déterminer s'il y avait des régions plus susceptibles d'être remaniées sur le chromosome Y. Pour ce faire, nous avons d'abord développé des sondes pour l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), de façon à couvrir les régions remaniées dans deux des réarrangements structuraux du Y les plus fréquents, c'est-à-dire les translocations avec le chromosome X et la formation d'un chromosome Y isodicentrique. Ces nouvelles sondes ont permis de déterminer la localisation fine du point de cassure sur des chromosomes X et/ou Y remaniés. Nous avons ainsi pu identifier les différentes caractéristiques des régions contenant les points de cassure, nous permettant ainsi de démontrer qu'il existait des régions plus susceptibles que d'autres à former ces types de remaniements. Dans le cas des 10 patients avec un chromosome Y isodicentrique que nous avons étudiés, nous avons confirmé que le point de cassure de ces chromosomes anormaux est souvent dans les régions contenant des palindromes. La susceptibilité de ces séquences à ce type de remaniement pourrait être expliquée par la structure même des palindromes, qui favoriserait la recombinaison ou encore la cassure et le recollement anormal entre les chromatides-sœurs d'un chromosome Y répliqué. Par ailleurs, d'autres régions contenant des séquences répétées semblent également impliquées dans la formation des chromosomes Y isodicentriques; c'est le cas notamment de l'hétérochromatine du bras long. Dans ce cas précis, la présence de séquences riches en AT pourrait conférer une instabilité, ce type de séquences pouvant former des structures secondaires susceptibles aux remaniements. La caractérisation moléculaire du point de cassure chez un plus grand nombre de patients avec un chromosome Y isodicentrique permettra de vérifier cette hypothèse. Pour ce qui est des translocations entre les chromosomes X et Y, une recombinaison anormale entre certaines séquences homologues est connue pour être impliquée dans plusieurs types de translocations entre ces chromosomes; l'exemple le plus souvent cité est le cas des gènes *PRKX* et *PRKY*. Nos travaux chez 5 patients porteurs d'une telle anomalie suggèrent cependant que le gène *PRKX* serait également susceptible aux cassures aléatoires, sans qu'un événement de recombinaison avec *PRKY* n'ait lieu. D'autre part, nos résultats suggèrent que la région de 750 kb juste au-dessus du centromère du chromosome Y pourrait également avoir une prédisposition aux cassures, alors qu'aucune région

d'homologie avec le chromosome X n'a été répertoriée. De plus amples études sont cependant nécessaires afin de définir plus précisément la région de susceptibilité au sein de cet intervalle. Il est possible aussi que la proximité et la réclusion des chromosomes sexuels dans une région distincte du noyau lors de certaines phases de la méiose augmentent les chances que ces cassures aléatoires causent des translocations chromosomiques dans une certaine proportion de gamètes.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à comprendre comment les remaniements structuraux du chromosome Y, que ce soit une translocation X;Y ou un chromosome isodicentrique, influencent le développement sexuel des individus porteurs. Dans les cas de translocations X;Y, deux mécanismes sont impliqués. D'abord, comme le montrent les analyses que nous avons effectuées chez 4 individus de sexe masculin avec une constitution $46,X,der(X)t(X;Y)$, le remaniement a entraîné la présence anormale d'une copie du gène *SRY* sur le chromosome X dérivé de la translocation. Ce gène étant un joueur clé du développement sexuel masculin, le phénotype sexuel des patients avec cette constitution s'en trouve expliqué. Cependant, une variation dans le niveau d'expression de ce gène, que ce soit par la proximité de la cassure et des séquences régulatrices de *SRY* et/ou le patron d'inactivation du chromosome X anormal, pourrait expliquer le degré variable de masculinisation des patients porteurs de cette constitution. La détermination de la position exacte des séquences régulatrices de *SRY* sera nécessaire afin de bien évaluer l'impact de chacun de ces facteurs sur le phénotype des individus. Par ailleurs, la taille du fragment du bras court du Y se trouvant anormalement sur le chromosome X ne semble pas influencer les autres traits phénotypiques des individus porteurs de cette translocation. Des délétions interstitielles de certaines régions du bras court du Y sont d'ailleurs rapportées dans la population masculine normale sans qu'aucune anomalie phénotypique n'y soit associée. À l'opposé, chez un individu de sexe féminin avec une constitution $46,X,der(Y)t(X;Y)$, ce remaniement a plutôt entraîné la présence anormale d'une deuxième copie de *NROBI*. Contrairement à *SRY*, le rôle de *NROBI* dans le développement sexuel est beaucoup moins claire. En fait, ce gène aurait un rôle autant dans le développement sexuel masculin que féminin selon son dosage, son patron d'expression et ses partenaires. L'impact

d'un surdosage de *NROBI* chez les individus XY est peu connu, que ce soit suite à une duplication ou à une translocation chromosomique. Pour l'instant, les modèles murins n'ont pas permis de clarifier le mode d'action ni les conséquences d'une anomalie de ce gène. Il faut également mentionner que chez l'humain, *NROBI* n'est pas le seul gène affecté et ce, peu importe le type de réarrangement, puisque les segments chromosomiques impliqués contiennent plusieurs gènes. Le nombre très peu élevé de cas rapportés chez l'humain ainsi que la caractérisation cytogénétique sommaire de certaines de ces anomalies chromosomiques ne permettent pas, pour l'instant, de faire une corrélation entre les gènes impliqués et les autres traits phénotypiques des individus.

En ce qui concerne les chromosomes Y isodicentriques, deux facteurs entrent en ligne de compte lorsque vient le temps d'évaluer leur impact sur le développement sexuel. Le fait que *SRY* soit préservé sur le chromosome remanié joue évidemment un rôle capital. Cependant, tel que nous l'avons montré, la plupart des patients ont conservé *SRY* sur leur isodicentrique et ont non pas une mais deux copies de ce gène sur leur chromosome Y remanié. Pourtant, près de la moitié des patients présentent un phénotype féminin. Nous avons également montré que la distance entre le point de cassure et le centromère influence la stabilité mitotique des chromosomes Y isodicentriques. La perte du Y remanié dans une proportion importante de cellules du tissu gonadique peut donc expliquer le phénotype féminin de plusieurs patients. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons optimisé la technique de FISH sur le tissu gonadique frais et/ou fixé. Nos travaux sur ce tissu provenant de 9 patients ayant subi une gonadectomie ont confirmé que les chromosomes Y isodicentriques sont perdus dans une majorité de cellules gonadiques chez toutes les femmes porteuses d'un tel remaniement. Il est malheureusement difficile, à l'heure actuelle, d'estimer la proportion de femmes avec une dysgénésie gonadique XY qui ont un chromosome Y remanié perdu en mosaïque dans leurs gonades.

Nous avons également regardé le niveau de mosaïcisme dans les gonades de 10 patients avec une constitution chromosomique 46,XY normale mais un développement sexuel féminin. Contrairement à ce que nous avons observé dans le cas des chromosomes Y remaniés, nous n'avons pas trouvé de mosaïcisme gonadique significatif des chromosomes

sexuels chez la majorité de nos patientes pour lesquelles nous disposions de matériel gonadique frais et/ou fixé. Par ailleurs, nous avons également procédé à l'analyse des gonades de deux autres patients XY avec un désordre du développement sexuel, soit un fœtus avec désordre ovotesticulaire (hermaphrodisme vrai) et une mutation de *SOX9*, ainsi qu'un fœtus avec un désordre de la différenciation génitale (pseudohermaphrodisme) et une trisomie 22. En effet, dans les deux cas, le phénotype sexuel particulier de ces patients n'est que très rarement observé chez des patients avec un génotype similaire. De nouveau, les analyses cytogénétiques n'ont pas clairement démontré l'implication d'un mosaïcisme gonadique dans le phénotype sexuel anormal de ces patients. De façon générale, dans les cas où la structure du chromosome Y n'est pas altérée, les faibles niveaux de mosaïcisme gonadique ne jouent pas un rôle majeur dans le développement sexuel anormal des patients. La recherche systématique en clinique d'anomalies impliquant les nombreux autres gènes du développement sexuel (*WT1*, *NR5A1*, *WNT4*, *DHH*, *DMRT*, etc.), notamment à l'aide de micropuces couvrant de façon plus adéquate ces gènes, permettra peut-être d'identifier la cause de la dysgénésie gonadique de ces patients.

Connaissant le risque que les patients avec une dysgénésie gonadique XY développent une tumeur gonadique, nous avons dans un troisième temps entrepris une étude rétrospective des gonades de 30 de ces patients. Cette étude histologique par immunohistochimie a permis de mieux comprendre les facteurs impliqués dans la tumorigenèse et de mieux évaluer le risque de chacun des patients à développer des tumeurs gonadiques. Nous avons recherché la présence de cellules germinales dans des cordons sexuels primitifs, un patron appelé tissu gonadique indifférencié (TGI), dans les gonades de ces patients. Ce TGI peut être retrouvé adjacent à une bandelette gonadique ou à un testicule dysgénésique. Les cellules germinales du TGI sont immatures, tel que montré par immunohistochimie, et sont à risque de subir une transformation néoplasique. Parmi les 51 gonades dysgénésiques analysées, nous avons retrouvé du TGI dans 15 gonades, dont 9 avec une tumeur. Dans les 6 gonades sans tumeur, le TGI a été retrouvé à la périphérie soit d'une bandelette gonadique, d'un testicule-bandelette ou d'un testicule dysgénésique. Dans 13 bandelettes gonadiques où aucun TGI n'a été trouvé, nous avons noté la présence de

cordons sexuels sans aucune cellule germinale. Cela suggère que du TGI était présent à l'origine dans ces bandelettes, mais que les cellules germinales ont disparu par apoptose, laissant derrière elles uniquement des cordons sexuels.

Si les cellules germinales du TGI peuvent disparaître avec le temps, elles peuvent également évoluer en tumeur gonadique. En effet, dans 9 des 15 gonades où du TGI était présent, nous avons retrouvé un gonadoblastome adjacent à ce TGI. De ces 9 gonadoblastomes, 4 avaient évolué vers un dysgerminome au moment de la gonadectomie. Trois autres tumeurs gonadiques ne contenant pas de TGI à leur périphérie ont aussi été retrouvées. Deux de ces tumeurs avaient complètement envahi la gonade, ne laissant aucun tissu non-néoplasique analysable. Les 12 tumeurs gonadiques ont toutes été retrouvées chez des patientes avec une dysgénésie gonadique pure, dont l'âge à la gonadectomie variait entre 5 et 22 ans. Ces résultats montrent donc que le TGI est un facteur de risque pour la tumorigenèse et que des gonadoblastomes (et éventuellement des dysgerminomes) peuvent se développer avec le temps à partir de ce tissu. Il est cependant possible de limiter les risques de tumorigenèse en procédant à la résection chirurgicale précoce des gonades contenant du TGI chez ces patients. Dans notre étude, dans le cas des 6 gonades contenant du TGI mais où aucune tumeur n'a été retrouvée, la gonadectomie avait été faite avant que les patients n'aient atteint l'âge de 2 ans.

Dans l'ensemble, ces résultats indiquent qu'avec le temps, les cellules germinales du TGI peuvent disparaître par apoptose, laissant une bandelette gonadique avec des cordons sexuels sans cellule germinale. Le TGI peut aussi évoluer en tumeur gonadique. De plus, nos travaux montrent la nécessité de procéder à une gonadectomie complète chez les femmes avec une dysgénésie gonadique XY, en plus de faire l'analyse caryotypique de ses sœurs ou demi-sœurs n'étant pas encore menstruées afin de mettre en évidence les cas de dysgénésie gonadique XY familiale. Nous recommandons que la résection chirurgicale des gonades chez les patientes avec une dysgénésie gonadique XY soit faite aussitôt que possible après le diagnostic, surtout que cette chirurgie n'altère en rien la fertilité des patientes qui sont d'ores et déjà infertiles. Nous suggérons également, à la lumière de nos résultats, qu'un suivi clinique périodique par palpation ou examen échographique des

gonades soit mis en place chez les patients de sexe masculin avec une dysgénésie gonadique XY mixte dont le testicule est fixé dans le scrotum après que la biopsie n'ait pas révélé de tumeur gonadique ou de TGI. Par contre, dans les cas où du TGI ou une tumeur serait déjà présent dans la biopsie, la gonadectomie immédiate est préconisée. Par ailleurs, nous proposons que la nomenclature des gonades ne soit pas modifiée, mais que la présence de TGI soit simplement mentionnée: bandelette gonadique avec ou sans TGI, et testicule dysgénésique avec ou sans TGI.

Tel que mentionné plus tôt, la majorité des tumeurs répertoriées chez les patients avec une dysgénésie gonadique sont des gonadoblastomes, dont près de la moitié ont évolué en dysgerminomes. Cependant, nous avons observé un cas de choriocarcinome adjacent à un gonadoblastome. Étant donné la rareté des choriocarcinomes et le peu d'informations cytogénétiques disponibles sur ce type de tumeur germinale, une analyse par micropuces (la première à être rapportée) a été faite. Les anomalies chromosomiques retrouvées sont similaires à ce qui est connu dans la littérature concernant les tumeurs germinales dont le gonadoblastome est la lésion précurseur. L'analyse histologique et les résultats obtenus par micropuces viennent appuyer l'hypothèse que les gonadoblastomes peuvent évoluer, dans de rares occasions, vers un choriocarcinome. Il sera intéressant de voir si de plus amples études par micropuces sur les tumeurs germinales permettront de mieux établir les étapes de la tumorigenèse en identifiant des altérations de gènes ou de voies de signalisation spécifiques.

Notre travail de recherche met donc en évidence l'importance d'étudier le tissu gonadique des patients avec un développement sexuel anormal, que ce soit en cytogénétique, pour évaluer le mosaïcisme des chromosomes sexuels, ou en histologie, pour mieux caractériser le type de différenciation gonadique et évaluer le risque de tumorigenèse. Bien que le chemin soit encore long avant que nous ayons percé tous les mystères du développement sexuel anormal chez l'humain, les résultats présentés ici sont un autre pas dans la bonne direction. De plus, nos données mettent en lumière quelques unes des caractéristiques uniques du chromosome Y, notamment sa susceptibilité à former

certaines remaniements spécifiques, de par la nature des séquences qui s'y trouvent, ainsi que son instabilité mitotique lorsqu'il est remanié. Si, dans les années 1990, certains auteurs ont prédit la fin de ce chromosome et sonné le début d'un certain désintéressement de la part de la communauté scientifique, c'était avant que le Y ne révèle plusieurs de ses secrets. Et comme le démontre cette thèse de doctorat, l'annonce de la mort, à tout le moins scientifique, du chromosome Y était prématurée.

Bibliographie générale

- Abbas N, McElreavey K, Leconiat M, Vilain E, Jaubert F, et coll. *Familial case of 46,XX male and 46,XX true hermaphrodite associated with a paternal-derived SRY-bearing X chromosome*. C R Acad Sci III 1993; 316: 375-383.
- Achermann JC, Ito M, Ito M, Hindmarsh PC, Jameson JL. *A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans*. Nat Genet 1999; 22: 125-126.
- Adachi Y, Sasagawa I, Tomaru M, Ishigooka M, Kubota Y, et coll. *Short-arm dicentric Y chromosome associated with Sertoli-cell-only tubule*. Scand J Urol Nephrol 1997; 31: 459-161.
- Adamah DJB, Gokhale PJ, Eastwood DJ, Goepel J, Walsh JR, et coll. *Dysfunction of the mitotic:meiotic switch as a potential cause of neoplastic conversion of primordial germ cells*. Int J Androl 2006; 29: 219-227.
- Akiyama H. *Control of chondrogenesis by the transcription factor Sox9*. Mod Rheumatol 2008; 18: 213-219.
- Akkari Y, Lawce H, Kelson S, Smith C, Davis C, et coll. *Y chromosome heterochromatin of differing lengths in two cell populations of the same individual*. Prenat Diagn 2005; 25: 304-306.
- Aleck KA, Argueso L, Stone J, Hackel JG, Erickson RP. *True hermaphroditism with partial duplication of chromosome 22 and without SRY*. Am J Med Genet 1999; 85: 2-4.
- Álvarez-Nava F, Puerta H. *Y-chromosome microdeletions in 45,X/46,XY patients*. Am J Med Genet Part A 2006; 140A: 1128-1130.
- Álvarez-Nava F, Puerta H, Soto M, Pineda L, Temponi A. *High incidence of Y-chromosome microdeletions in gonadal tissues from patients with 45,X/46,XY gonadal dysgenesis*. Fertil Steril 2008; 89: 458-460.
- Álvarez-Nava F, Soto M, Martínez MC, Prieto M, Álvarez Z. *FISH and PCR analyses in three patients with 45,X/46,X, idic(Y) karyotype: Clinical and pathologic spectrum*. Ann Genet 2003; 46: 443-448.
- Arango NA, Lovell-Badge R, Behringer RR. *Targeted mutagenesis of the endogenous mouse Mis gene promoter: In vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development*. Cell 1999; 99: 409-419.

- Arn P, Chen H, Tuck-Muller CM, Mankinen C, Wachtel G, et coll. *SRVX, a sex reversing locus in Xp21.2→p22.11*. Hum Genet 1994; 93: 389-393.
- Assumpção JG, Benedetti CE, Marciel-Guerra AT, Guerra Jr G, Baptista MTM, et coll. *Novel mutations affecting SRY DNA-binding activity: The HMG box N65H associated with 46,XY pure gonadal dysgenesis and the familial non-HMG box R30I associated with variable phenotypes*. J Mol Med 2002; 80: 782-790.
- Atkins KE, Gregg A, Spikes AS, Bacino CA, Bejjani BA, et coll. *Identification of Y chromatin directly in gonadal tissue by Fluorescence in situ Hybridization (FISH): Significance for Ullrich-Turner syndrome screening in the cytogenetics laboratory*. Am J Med Genet 2000; 91: 377-382.
- Babcock M, Yatsenko S, Stankiewicz P, Lupski JR, Morrow BE. *AT-rich repeats associated with chromosome 22q11.2 rearrangement disorders shape human genome architecture on Yq12*. Genome Res 2007; 17: 451-460.
- Bacher CP, Guggiari M, Brors B, Augui S, Clerc P, et coll. *Transient colocalization of X-inactivation centres accompanies the initiation of X inactivation*. Nat Cell Biol 2006; 8: 293-299.
- Bacino CA, Schreck R, Fischel-Ghodsian N, Pepkowitz S, Prezant TR, et coll. *Clinical and molecular studies in full trisomy 22: Further delineation of the phenotype and review of the literature*. Am J Med Genet 1995; 56: 359-365.
- Bagheri-Fam S, Sim H, Bernard P, Jayakody I, Taketo MM, et coll. *Loss of Fgfr2 leads to partial XY sex reversal*. Dev Biol 2008; 314: 71-83.
- Bajalica S, Blennow E, Tsezou A, Galla-Voumvouraki A, Alevizaki M, et coll. *Partial disomy of Xp and the presence of SRY in a phenotypic female*. J Med Genet 1995; 32: 987-990.
- Ballif BC, Rorem EA, Sundin K, Lincicum M, Gaskin S, et coll. *Detection of low-level mosaicism by array-CGH routine diagnostic specimens*. Am J Med Genet Part A 2006; 140A: 2757-2767.
- Ballif BC, Yu W, Shaw CA, Kashork CD, Shaffer LG. *Monosomy 1p36 breakpoint junctions suggest pre-meiotic breakage-fusion-bridge cycles are involved in generating terminal deletions*. Hum Mol Genet 2003; 12: 2153-2165.

- Bannert N, Kurth R. *Retroelements and the human genome: New perspectives and an old relation*. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101 (Suppl 2): 14572-14579.
- Barbaro M, Cicognani A, Balsamo A, Löfgren Å, Baldazzi L, et coll. *Gene dosage imbalances in patients with 46,XY gonadal DSD detected by an in-house-designed synthetic probe set for multiplex ligation-dependant probe amplification analysis*. Clin Genet 2008; 73: 453-464.
- Barbaro M, Oscarson M, Schoumans J, Staaf J, Ivarsson SA, et coll. *Isolated 46,XY gonadal dysgenesis in two sisters caused by a Xp21.2 interstitial duplication containing the DAX1 gene*. J Clin Endocrinol Metab 2007; 92: 3305-3313.
- Barboux S, Niaudet P, Gubler M-C, Grünfeld J-P, Jaubert F, et coll. *Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome*. Nat Genet 1997; 17: 467-470.
- Barbosa AS, Ferraz-Costa TE, Semer M, Liberman B, Moreira-Filho CA. *XY gonadal dysgenesis and gonadoblastoma: A study in two sisters with a cryptic deletion of the Y chromosome involving the SRY gene*. Hum Genet 1995; 95: 63-66.
- Bardoni B, Floridia G, Guioli S, Peverali G, Anichini C, et coll. *Functional disomy of Xp22-pter in three males carrying a portion of Xp translocated to Yq*. Hum Genet 1993; 91: 333-338.
- Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, Floridia G, Worley KC, et coll. *A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal*. Nat Genet 1994; 7: 497-501.
- Barr ML, Bertram EG. *A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis*. Nature 1949; 163: 676-677.
- Barrionuevo F, Bagheri-Fam S, Klattig J, Kist R, Taketo MM, et coll. *Homozygous inactivation of Sox9 causes complete XY sex reversal in mice*. Biol Reprod 2006; 74: 195-201.
- Barrionuevo F, Georg I, Scherthan H, Lécureuil C, Guillou F, et coll. *Testis cord differentiation after the sex determination stage is independent of Sox9 but fails in the combined absence of Sox9 and Sox8*. Dev Biol 2009; 327: 301-312.

- Baum M, Clarke L. *Fission yeast homologs of human CENP-B have redundant functions affecting cell growth and chromosome segregation*. Mol Cell Biol 2000; 20: 2852-2864.
- Baumstark A, Barbi G, Djalali M, Geerkens C, Mitulla B, et coll. *Xp-duplications with and without sex reversal*. Hum Genet 1996; 97: 79-86.
- Beaulieu Bergeron M, Bouron-Dal Soglio D, Maietta A, Fournet J-C, Blumenkrantz M, et coll. *Coexistence of a choriocarcinoma and a gonadoblastoma in the gonad of a 46,XY female: A single nucleotide polymorphism array analysis*. Pediatr Dev Pathol 2010; 13: 66-71.
- Beaulieu Bergeron M, Brochu P, Lemyre E, Lemieux N. *Correlation between intercentromeric distance, mosaicism and sexual phenotype: Molecular localization of breakpoints in isodicentric Y chromosomes*. Am J Med Genet Part A 2011; sous presse.
- Belyaev ND, Keohane AM, Turner BM. *Differential underacetylation of histones H2A, H3 and H4 on the inactive X chromosome in human female cells*. Hum Genet 1996; 97: 573-578.
- Benito-Sanz S, Thomas SN, Huber C, Gorbenko del Blanco D, Aza-Carmona M, et coll. *A novel class of pseudoautosomal region 1 deletions downstream of SHOX is associated with Leri-Weill dyschondrosteosis*. Am J Hum Genet 2005; 77: 533-544.
- Berkovitz GD, Fechner PY, Marcantonio SM, Bland G, Stetten G, et coll. *The role of the sex-determining region of the Y chromosome (SRY) in the etiology of 46,XX true hermaphroditism*. Hum Genet 1992; 88: 411-416.
- Bernard P, Harley VR. *Wnt4 action in gonadal development and sex determination*. Int J Biochem Cell Biol 2007; 39: 31-43.
- Bernard P, Tang P, Liu S, Dewing P, Harley VR, et coll. *Dimerization of SOX9 is required for chondrogenesis, but not for sex determination*. Hum Mol Genet 2003; 12: 1755-1765.
- Bernstein R, Jenkins T, Dawson B, Wagner J, Dewald G, et coll. *Female phenotype and multiple abnormalities in sibs with a Y chromosome and partial X chromosome duplication: H-Y antigen and Xg blood group findings*. J Med Genet 1980; 17: 291-300.

- Bernstein R, Wade A, Rosendorff J, Wessels A, Jenkins T. *Inverted Y chromosome polymorphism in the Gujerati Muslim Indian population of South Africa*. Hum Genet 1986; 74: 223-229.
- Bettio D, Venci A, Rizzi N, Negri L, Levi Setti P. *Clinical and molecular cytogenetic studies in three infertile patients with mosaic rearranged Y chromosomes*. Hum Reprod 2006; 21: 972-975.
- Bilbao JR, Loridan L, Castaño L. *A novel postzygotic nonsense mutation in SRY in familial XY gonadal dysgenesis*. Hum Genet 1996; 97: 537-539.
- Bisat T, May K, Litwer S, Broecker B. *Y chromosome mosaicism in the gonads, but not in the blood, of a girl with the Turner phenotype and virilized external genitalia*. Clin Genet 1993; 44: 142-145.
- Bishop CE, Whitworth DJ, Qin Y, Agoulnik AI, Agoulnik IU, et coll. *A transgenic insertion upstream of Sox9 is associated with dominant XX sex reversal in the mouse*. Nat Genet 2000; 26: 490-494.
- Blanco P, Shlumukova M, Sargent CA, Jobling MA, Affara N, et coll. *Divergent outcomes of intrachromosomal recombination on the human Y chromosome: Male infertility and recurrent polymorphism*. J Med Genet 2000; 37: 752-758.
- Bogani D, Siggers P, Brixey R, Warr N, Beddow S, et coll. *Loss of mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 (MAP3K4) reveals a requirement for MAPK signalling in mouse sex determination*. PLoS Biol 2009; 7: e1000196 disponible au www.plosbiology.org/article/info:doi/10.1371/journal.pbio.1000196
- Boggs BA, Cheung P, Heard E, Spector DL, Chinault AC, et coll. *Differentially methylated forms of histone H3 show unique association patterns with inactive human X chromosomes*. Nat Genet 2002; 30:73-76.
- Boggs BA, Connors B, Sobel RE, Chinault AC, Allis CD. *Reduced levels of histone H3 acetylation on the inactive X chromosome in human females*. Chromosoma 1996; 105:303-309.
- Bolzan AD, Bianchi MS. *Telomeres, interstitial telomeric repeat sequences, and chromosomal aberrations*. Mutat Res 2006; 612: 189-214.

- Bolzer A, Kreth G, Solovei I, Koehler D, Saracoglu K, et coll. *Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes*. PLoS Biol 2005; 3: e157 disponible au www.plosbiology.org/article/info:doi/10.1371/journal.pbio.0030157
- Bosch E, Jobling MA. *Duplications of the AZFa region of the human Y chromosome are mediated by homologous recombination between HERVs and are compatible with male fertility*. Hum Mol Genet 2003; 12: 341-347.
- Bosco G, Haber JE. *Chromosome break-induced DNA replication leads to nonreciprocal translocations and telomere capture*. Genetics 1998; 150: 1037-1047.
- Bouayed Abdelmoula N, Amouri A. *Les chromosomes Y dicentriques. Première partie: Les aspects cytogénétiques et moléculaires*. Ann Biol Clin 2005a; 63: 263–278.
- Bouayed Abdelmoula N, Amouri A. *Les chromosomes Y dicentriques. Deuxième partie: Corrélation phénotype-génotype*. Ann Biol Clin 2005b; 63: 363–375.
- Bouayed Abdelmoula N, Portnoi M-F, Keskes L, Recan D, Bahloul A, et coll. *Skewed X-chromosome inactivation pattern in SRY positive XX maleness: A case report and review of literature*. Ann Genet 2003; 46: 11-18.
- Bouma GJ, Albrecht KH, Wasburn LL, Recknagel AK, Curchill GA, et coll. *Gonadal sex reversal in mutant Dax1 XY mice: A failure to upregulate Sox9 in pre-Sertoli cells*. Development 2005; 132: 3045-3054.
- Boutouil M, Fetni R, Qu J, Dallaire L, Richer CL, et coll. *Fragile site and interstitial telomere repeat sequences at the fusion point of a de novo (Y;13) translocation*. Hum Genet 1996; 98: 323-327.
- Boyd LJ, Livingston JS, Brown MG, Lawce HJ, Gilhooly JT, et coll. *Meiotic exchange event within the stalk region of an inverted chromosome 22 results in a recombinant chromosome with duplication of the distal long arm*. Am J Med Genet Part A 2005; 138A: 355-360.
- Brennan J, Karl J, Capel B. *Divergent vascular mechanisms downstream of Sry establish the arterial system in the XY gonad*. Dev Biol 2002; 244: 418-428.
- Bruyère H, Speevak MD, Winsor EJT, de Fréminville B, Farrell SA, et coll. *Isodicentric Yp: Prenatal diagnosis and outcome in 12 cases*. Prenat Diagn 2006; 26: 324-329.

- Buchanan PD, Wyandt HE, D'Ercole AJ, Rao KW, Hartsell ML. *A mitotically unstable human dicentric Y chromosome in a male pseudohermaphrodite*. Cytogenet Cell Genet 1976; 17: 42-50.
- Burrow AA, Williams LE, Pierce LCT, Wang Y-H. *Over half of breakpoints in gene pairs involved in cancer-specific recurrent translocations are mapped to human chromosomal fragile sites*. BMC Genomics 2009; 10:59 disponible au www.biomedcentral.com/1471-2164/10/59
- Calabrese G, Giannotti A, Mingarelli R, Di Gilio MC, Piemontese MR, et coll. *Two newborns with chromosome 4 imbalances: Deletion 4q33→q35 and ring r(4)(pterq35.2→qter)*. Clin Genet 1997; 51: 264-267.
- Camerino G, Parma P, Radi O, Valentini S. *Sex determination and sex reversal*. Curr Opin Genet Devel 2006; 16: 289-292.
- Cameron FJ, Hageman RM, Cooke-Yarborough C, Kwok C, Goodwin LL, et coll. *A novel germ line mutation in SOX9 causes familial campomelic dysplasia and sex reversal*. Hum Mol Genet 1996; 5: 1625-1630.
- Cameron FJ, Sinclair AH. *Mutations in SRY and SOX9: Testis-determining genes*. Hum Mutat 1997; 9: 388-395.
- Canevini MP, Sgro V, Zuffardi O, Canger R, Carozzo R, et coll. *Chromosome 20 ring: A chromosomal disorder associated with a particular electroclinical pattern*. Epilepsia 1998; 39: 942-951.
- Canto P, Vilchis F, Söderlund D, Reyes E, Méndez JP. *A heterozygous mutation in the desert hedgehog gene in patients with mixed gonadal dysgenesis*. Mol Hum Reprod 2005; 11: 833-836.
- Canto P, Söderlund D, Reyers E, Méndez JP. *Mutations in the desert hedgehog (DHH) gene in patients with 46,XY complete pure gonadal dysgenesis*. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89: 4480-4483.
- Cantu JM, Hernandez A, Vaca G, Plascencia L, Martinez-Basalo C, et coll. *Trisomy 22q12-qter: 'Aneusomie de recombinaison' of a pericentric inversion*. Ann Genet 1981; 24: 37-40.
- Carrel L, Willard HF. *X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females*. Nature 2005; 434: 400-404.

- Catalán J, Autio K, Kuosma E, Norppa H. *Age-dependant inclusion of sex chromosomes in lymphocyte micronuclei of man*. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 1464-1472.
- Catalán J, Autio K, Wessman M, Lindholm C, Knuutila S, et coll. *Age-associated micronuclei containing centromeres and the X chromosome in lymphocytes of women*. *Cytogenet Cell Genet* 1995; 68: 11-16.
- Catalán J, Falck GC-M, Norppa H. *The X chromosome frequently lags behind in female lymphocyte anaphase*. *Am J Hum Genet* 2000a; 66: 687-691.
- Catalán J, Surrallés J, Falck GC-M, Autio K, Norppa H. *Segregation of sex chromosomes in human lymphocytes*. *Mutagenesis* 2000b; 15: 251-255.
- Chaboissier M-C, Kobayashi A, Vidal VIP, Lützkendorf S, van de Kant HJG, et coll. *Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse*. *Development* 2004; 131: 1891-1901.
- Chadwick BP, Willard HF. *Histone H2A variants and the X chromosome: Identification of a second macroH2A variant*. *Hum Mol Genet* 2001; 10:1101-1113.
- Chagnon P, Schneider R, Hébert J, Fortin PR, Provost S, et coll. *Identification and characterization of an Xp22.33;Yp11.2 translocation causing a triplication of several genes of the pseudoautosomal region 1 in an XX male patient with severe systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 1270-1278.
- Chandley AC, Ambros P, McBeath S, Hardgreave TB, Kilanowski F, et coll. *Short arm dicentric Y chromosome with associated statural defects in a sterile man*. *Hum Genet* 1986; 73: 350–353.
- Charchar FJ, Svartman M, El-Mogharbel N, Ventura M, Kirby P, et coll. *Complex events in the evolution of the human pseudoautosomal region 2 (PAR2)*. *Genome Res* 2003; 13: 281-286.
- Chassot A-A, Ranc F, Gregoire EP, Roepers-Gajadien HL, Taketo MM, et coll. *Activation of β -catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary*. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 1264-1277.
- Chemes HE, Muzulin PM, Venara MC, Muhlmann MC, Martínez M, et coll. *Early manifestations of testicular dysgenesis in children: Pathological phenotypes, karyotype correlations and precursor stages of tumour development*. *APMIS* 2003; 111: 12-24.

- Chernykh VB, Kurilo LF, Shilova NV, Zolotukhina TV, Ryzhkova OP, et coll. *Hidden X chromosomal mosaicism in a 46,XX male*. Sex Dev 2009; 3: 183-187.
- Choo KH, Vissel B, Nagy A, Earle E, Kalitsis P. *A survey of the genomic distribution of alpha satellite DNA on all the human chromosomes, and derivation of a new consensus sequence*. Nucleic Acid Res 1991; 19: 11791182.
- Cianchetti C, Muntoni F, Falchi A-M, Nucaro A, Sannio-Fancello G, et coll. *X-linked mental retardation and characteristic physical features in two brothers with duplication Xp22-Xpter*. Am J Med Genet 1992; 43: 475-478.
- Ciccodicola A, D'Esposito M, Esposito T, Gianfrancesco F, Migliaccio C, et coll. *Differentially regulated and evolved genes in the fully sequenced Xq/Yq pseudoautosomal region*. Hum Mol Genet 2000; 9: 395-401.
- Cimini D. *Merotelic kinetochore orientation, aneuploidy, and cancer*. Biochim Biophys Acta 2008; 1786: 32-40.
- Codina-Pascual M, Oliver-Bonet M, Navarro J, Starke H, Liehr T, et coll. *FISH characterization of a dicentric Yq (p11.32) isochromosome in an azoospermic male*. Am J Med Genet Part A 2004; 127A: 302-306.
- Cohen MM, MacGillivray MH, Capraro VJ, Aceto TA. *Human dicentric Y chromosomes: Case report and review of the literature*. J Med Genet 1973; 10: 74-79.
- Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A. *The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer*. J Clin Invest 2002; 109: 987-991.
- Conte RA, Kleyman SM, Kharode C, Verma RS. *Delineation of a ring chromosome 16 by the FISH-technique: A case report with review*. Clin Genet 1997; 51: 196-199.
- Cooke HJ, Brown WRA, Rappold GA. *Hypervariable telomeric sequences from the human sex chromosomes are pseudoautosomal*. Nature 1985; 317:687-692.
- Cooke HJ, Schmidtke J, Gosden JR. *Characterisation of a human Y chromosome repeated sequence and related sequences in higher primates*. Chromosoma 1982; 87: 491-502.
- Cools M, Boter M, van Gorp R, Stoop H, Poddighe P, et coll. *Impact of the Y-containing cell line on histological differentiation patterns in dysgenetic gonads*. Clin Endocrinol 2007; 67: 184-192.

- Cools M, Drop SLS, Wolffenbuttel KP, Oosterhuis JW, Looijenga LHJ. *Germ cell tumors in the intersex gonad: Old paths, new directions, moving frontiers*. *Endocr Rev* 2006a; 27: 468-484.
- Cools M, Looijenga LHJ, Wolffenbuttel KP, Drop SLS. *Disorders of sex development: Update on the genetic background, terminology and risk for the development of germ cell tumors*. *World J Pediatr* 2009; 5: 93-102.
- Cools M, Stoop H, Kersemaekers A-MF, Drop SLS, Wolffenbuttel KP, et coll. *Gonadoblastoma arising in undifferentiated gonadal tissue within dysgenetic gonads*. *J Clin Endocrinol Metab* 2006b; 91: 2404-2413.
- Costa T, Lambert M, Teshima I, Ray PN, Richer CL, et coll. *Monozygotic twins with 45,X/46,XY mosaicism discordant for phenotypic sex*. *Am J Med Genet* 1998; 75: 40-44.
- Costanzi C, Pehrson JR. *Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals*. 1998; 393:599-601.
- Cremer T, Cremer M. *Chromosome territories*. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2: a003889 disponible au cshperspectives.cshlp.org/content/2/3/a003889
- Crowe CA, Schwartz S, Black CJ, Jaswaney V. *Mosaic trisomy 22: A case presentation and literature review of trisomy 22 phenotypes*. *Am J Med Genet* 1997; 71: 406-413.
- Dada R, Kumar R, Shamsi MB, Kumar R, Kucheria K, et coll. *Higher frequency of Yq microdeletions in sperm DNA as compared to DNA isolated from blood*. *Asian J Androl* 2007; 9: 720-722.
- Daniel A, Lyons N, Casey JH, Gras L. *Two dicentric Y isochromosomes, one without the Yqh heterochromatic segment: Review of the Y isochromosomes*. *Hum Genet* 1980; 54: 31-39.
- Daniel A, St Heaps L. *Chromosome loops arising from intrachromosomal tethering of telomeres occur at high frequency in G1 (noncycling) mitotic cells: Implications for telomere capture*. *Cell Chromosome* 2004; 3: 3 disponible au www.cellandchromosome.com/content/3/1/3

- Davies AF, Kirby TL, Docherty Z, Ogilvie CM. *Characterization of terminal chromosome anomalies using multisubtelomere FISH*. Am J Med Genet Part A 2003; 120A:483-489.
- Davis RM. *Localisation of male determining factors in man: A thorough review of structural anomalies of the Y chromosome*. J Med Genet 1981; 18: 161-195.
- Deininger PL, Batzer MA. *Alu repeats and human disease*. Mol Genet Metab 1999; 67: 183-193.
- de la Chapelle A. *The etiology of maleness in XX men*. Hum Genet 1981; 58: 105-116.
- de la Chapelle A, Shröder J, Murros J, Tallqvist G. *Two XX males in one family and additional observations bearing on the etiology of XX males*. Clin Genet 1977; 11: 91-106.
- de Lange T. *Telomere dynamics and genome instability in human cancer*. Dans: Blackburn EH, Greider CW, eds. *Telomeres*. Cold Spring Harbor, États-Unis: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995; 265-293.
- Deloukas P, Matthews LH, Ashurst J, Burton J, Gilbert JGR, et coll. *The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 20*. Nature 2001; 414: 865-871.
- DesGroseilliers M, Beaulieu Bergeron M, Brochu P, Lemyre E, Lemieux N. *Phenotypic variability in isodicentric Y patients: Study of nine cases*. Clin Genet 2006a; 70: 145-150.
- DesGroseilliers M, Fortin F, Lafrenière AM, Brochu P, Lemyre E, et coll. *Dynamic increase of a 45,X cell line in a patient with multicentric ring Y chromosomes*. Cytogenet Genome Res 2006b; 115: 90-93.
- DesGroseilliers M, Fortin F, Lemyre E, Lemieux N. *Complex mosaicism in sex reversed SRY+ male twins*. Cytogenet Genome Res 2006c; 112: 176-179.
- DesGroseilliers M, Lemyre E, Dallaire L, Lemieux N. *Tetrasomy Y by Structural Rearrangement: Clinical Report*. Am J Med Genet 2002; 111: 401-404.
- Devriendt K, Petit P, Matthijs G, Vermeesch JR, Holvoet M, et coll. *Trisomy 15 rescue with jumping translocation of distal 15q in Prader-Willi syndrome*. J Med Genet 1997; 34: 395-399.
- DiNapoli L, Batchvarov J, Capel B. *FGF9 promotes survival of germ cells in the fetal testis*. Development 2006; 133: 1519-1527.

- di Pietro A, de Vries EGE, Gietema JA, Spierings DCJ, de Jong S. *Testicular germ cell tumours: The paradigm of chemo-sensitive solid tumours*. Int J Biochem Cell Biol 2005; 37: 2437-2456.
- Dobyns WB. *Absence makes the search grow long*. Am J Hum Genet 1996; 58: 7-16.
- Domenice S, Nishi MY, Correia Billerbeck AE, Latronico AC, Medeiros MA, et coll. *A novel missense mutation (S18N) in the 5' non-HMG box region of the SRY gene in a patient with partial gonadal dysgenesis*. Hum Genet 1998; 102: 213-215.
- Drouin R, Lemieux N, Richer CL. *High-resolution R-banding at the 1250-band level. 1. Technical considerations on cell synchronization and R-banding (RHG and RBG)*. Cytobios 1988; 56: 107-125.
- Drouin R, Messier P-E, Richer C-L. *DNA denaturation for ultrastructural banding and the mechanism underlying the fluorochrome-photolysis-Giemsa technique studied with anti-5-bromodeoxyuridine antibodies*. Chromosoma 1989; 98: 174-180.
- Dundar M, Lowther G, Acar H, Kurtoglu S, Demiryilmaz F, et coll. *A case of ambiguous genitalia presenting with a 45,X/46,X,r(Y)(p11.2;q11.23)/47,X,idic(Y)(p11.2), idic(Y)(p11.2) karyotype*. Ann Genet 2001; 44: 5-8.
- Dunham I, Hunt AR, Collins J, Bruskiwich R, Beare DM, et coll. *The DNA sequence of human chromosome 22*. Nature 1999; 402: 489-495.
- Dutrillaux B, Couturier J. *La pratique de l'analyse chromosomique*. Paris, France: Mason, 1981.
- Duzcan F, Aybek Z, Tepeli E, Caner V, Cetin GO, et coll. *Sex chromosome aneuploidy rates in the somatic cells of infertile men*. J Reprod Med 2006; 51:489-492.
- Edelmann L, Spiteri E, Koren K, Pulijaal V, Bialer MG, et coll. *AT-rich palindromes mediate the constitutional t(11;22) translocation*. Am J Hum Genet 2001; 68: 1-13.
- Elcock LS, Bridger JM. *Exploring the relationship between interphase gene positioning, transcriptional regulation and the nuclear matrix*. Biochem Soc Trans 2010; 38: 263-267.
- Elghezal H, Hannachi H, Mougou S, Kammoun H, Triki C, et coll. *Ring chromosome 20 syndrome without deletions of the subtelomeric and CHRNA4-KCNQ2 genes loci*. Eur J Med Genet 2007; 50: 441-445.

- Ellison JW, Wardak Z, Young MF, Robey PG, Laig-Webster M, et coll. *PHOG, a candidate gene for involvement in the short stature of Turner syndrome*. Hum Mol Genet 1997; 6: 1341-1347.
- Ferguson-Smith MA. *X-Y chromosomal interchange in the aetiology of true hermaphroditism and of XX klinefelter's syndrome*. Lancet 1966; 2: 475-476.
- Fernandez R, Marchal JA, Sanchez A, Pasaro E. *A point mutation, R59G, within the HMG-SRY box in a female 45,X/46,X,psu dic(Y)(pter→q11:q11→pter)*. Hum Genet 2002; 111: 242-246.
- Fernandez R, Pasaro E. *Molecular analysis of an idic(Y)(qter→p11.32::p11.32→qter) chromosome from a female patient with a complex karyotype*. Genet Mol Res 2006; 5: 399-406.
- Fernández-García R, García-Doval S, Costoya S, Pásaro E. *Analysis of sex chromosome aneuploidy in 41 patients with Turner syndrome: A study of 'hidden' mosaicism*. Clin Genet 2000; 58: 201-208.
- Fetni R. *Niveau supérieur d'organisation de la chromatine: Apport de l'hybridation in situ en microscopie électronique*. Montréal, Canada: Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal, 1996.
- Fetni R, Drouin R, Richer C-L, Lemieux N. *Complementary replication R- and G-band patterns induced by cell blocking at the R-band/G-band transition, a possible regulatory checkpoint within the S phase of the cell cycle*. Cytogenet Cell Genet 1996; 75: 172-179.
- Fiegler H, Carr P, Douglas EJ, Burford DC, Hunt S, et coll. *DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones*. Genes Chromosomes Cancer 2003; 36: 361-374.
- Filippo JS, Sung P, Klein H. *Mechanism of eukaryotic homologous recombination*. Annu Rev Biochem 2008; 77: 229-257.
- Filippova GN, Cheng MK, Moore JM, Truong J-P, Hu YJ, et coll. *Boundaries between chromosomal domains of X inactivation and escape bind CTCF and lack CpG methylation during early development*. Dev Cell 2005; 8: 31-42.

- Flejter WL, Finlinson D, Root S, Nguyen W, Brothman AR, et coll. *Familial ring (19) chromosome mosaicism: Case report and review*. Am J Med Genet 1996; 66: 276-280.
- Fleming A, Vilain E. *The endless quest for sex determination genes*. Clin Genet 2004; 67: 15-25.
- Flint J, Craddock CF, Villegas A, Bentley DP, Williams HJ, et coll. *Healing of broken human chromosomes by the addition of telomeric repeats*. Am J Hum Genet 1994; 55: 505-512.
- Forest MG. *Diagnosis and treatment of disorders of sexual development*. Dans: DeGroot LJ, Jameson JL, eds. *Endocrinology, 5th edition*. Philadelphie, États-Unis: Elsevier Saunders, 2006; 2779-2829.
- Foresta C, Zuccarello D, Garolla A, Ferlin A. *Role of hormones, genes, and environment in human cryptorchidism*. Endocr Rev 2008; 29: 560-580.
- Fortin F, Beaulieu Bergeron M, Fetni R, Lemieux N. *Frequency of chromosome healing and interstitial telomeres in 40 cases of constitutional abnormalities*. Cytogenet Genome Res 2009; 125: 176-185.
- Foster HA, Abeydeera LR, Griffin DK, Bridger JM. *Non-random chromosome positioning in mammalian sperm nuclei, with migration of the sex chromosomes during late spermatogenesis*. J Cell Sci 2005; 118: 1811-1820.
- Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, et coll. *Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene*. Nature 1994; 372: 525-530.
- Foster JW, Graves JAM. *An SRY-related sequence on the marsupial X chromosome: Implications for the evolution of the mammalian testis-determining gene*. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 1927-1931.
- Fowler KJ, Hudson DF, Salamonsen LA, Edmondson SR, Earle E, et coll. *Uterine dysfunction and genetic modifiers in centromere protein B-deficient mice*. Genome Res 2000; 10: 30-41.
- Fowler KJ, Wong LH, Griffiths BK, Sibson MC, Reed S, et coll. *Centromere protein b-null mice display decreasing reproductive performance through successive generations of breeding due to diminishing endometrial glands*. Reproduction 2004; 127: 367-377.

- Freije D, Helms C, Watson MS, Donis-Keller H. *Identification of a second pseudoautosomal region near the Xq and Yq telomeres*. Science 1992; 258: 1784-1787.
- Frommer M, Prosser J, Vincent PC. *Human satellite I sequences include a male specific 2.47 kb tandemly repeated unit containing one Alu family member per repeat*. Nucleic Acid Res 1984; 12: 2887-2900.
- Fryns JP, Kleczkowska A, Lemmens P, Van den Berghe H. *Unusual in vivo rearrangements of the Y-chromosome in two males*. Clin Genet 1987; 31: 132-136.
- Fung MK-L, Cheung H-W, Wong H-L, Yuen H-F, Ling M-T, et coll. *MAD2 expression and its significance in mitotic checkpoint control in testicular germ cell tumour*. Biochim Biophys Acta 2007; 1773: 821-832.
- Gallager HS, Lewis RP. *Sequential gonadoblastoma and choriocarcinoma*. Obstet Gynecol 1973; 41: 123-128.
- Gardner RJM, Sutherland GR. *Chromosome abnormalities and genetic counseling*. New York, États-Unis: Oxford University Press, 2004.
- Genuardi M, Bardoni B, Floridia G, Chiurazzi P, Scarano G, et coll. *Dicentric chromosome Y associated with Leydig cell agenesis and sex reversal*. Clin Genet 1995; 47: 38-41.
- German J. *The pattern of DNA synthesis in the chromosomes of human blood cells*. J Cell Biol 1964; 20: 37-55.
- Ghosh A, Higgins L, Larkins SA, Miller C, Ostojic N, et coll. *Prenatal diagnosis and prenatal imaging of a de novo 46,X,der(Y)t(X;Y)(p22.13;q11.23) leading to functional disomy for the distal end of the X chromosome short arm from Xp22.13 in a phenotypically male fetus with posterior fossa abnormalities*. Prenat Diagn 2008; 28: 1068-1071.
- Gignac J, Danis K, Tihy F, Lemyre E. *Prenatal detection of subtelomeric rearrangements by multi-subtelomere FISH in a cohort of fetuses with major malformations*. Am J Med Genet Part A 2006; 140A: 2768-2775.
- Gilbert SL, Sharp PA. *Promoter-specific hypoacetylation of X-inactivated genes*. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 13825-13830.

- Giltay JC, Ausems MGEM, van Seumeren I, Zewald RA, Sinke RJ, et coll. *Short stature as the only presenting feature in a patient with an isodicentric (Y)(q11.23) and gonadoblastoma: A clinical and molecular cytogenetic study.* Eur J Pediatr 2000; 160: 154-158.
- Gimelli G, Giglio S, Zuffardi O, Alhonen L, Suppola S, et coll. *Gene dosage of the spermidine/spermine N¹-acetyltransferase (SSAT) gene with putrescine accumulation in a patient with a Xp21.1p22.12 duplication and keratosis follicularis spinulosa decalvans (KFSD).* Hum Genet 2002; 111: 235-241.
- Gimelli G, Gimelli S, Dimasi N, Bocciardi R, Di Battista E, et coll. *Identification and molecular modelling of a novel familial mutation in the SRY gene implicated in the pure gonadal dysgenesis.* Eur J Hum Genet 2007; 15: 76-80.
- Gläser B, Hierl T, Taylor K, Schiebel K, Zeitler S, et coll. *High-resolution fluorescence in situ hybridization of human Y-linked genes on released chromatin.* Chromosome Res 1997; 5: 23-30.
- Glover TW, Arlt MF, Casper AM, Durkin SG. *Mechanisms of common fragile site instability.* Hum Mol Genet 2005; 14: R197-R205.
- Glover TW, Stein CK. *Induction of sister chromatid exchange at common fragile sites.* Am J Hum Genet 1987; 41: 882-890.
- Gole LA, Lim J, Crolla JA, Loke KY. *Gonadal mosaicism 45,X/46,X,psu dic(Y)(q11.2) resulting in a Turner phenotype with mixed gonadal dysgenesis.* Singapore Med J 2008; 49: 349-351.
- Goodfellow PJ, Darling SM, Thomas TS, Goodefellow PN. *A pseudoautosomal gene in man.* Science 1986; 234: 740-743.
- Graves JAM. *The evolution of mammalian sex chromosomes and the origin of sex determining genes.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci; 1995; 350: 305-312.
- Graves JAM. *Human Y chromosome, sex determination, and spermatogenesis - A feminist view.* Biol Reprod 2000; 63: 667-676.
- Graves JAM. *The degenerate Y chromosome – can conversion save it?* Reprod Fertil Dev 2004; 16: 527-534.
- Graves JAM, Wakefield MJ, Toder R. *The origin and evolution of the pseudoautosomal regions of human sex chromosomes.* Hum Mol Genet 1998; 7: 1991-1996.

- Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, et coll. *Mammalian telomeres end in a large duplex loop*. Cell 1999; 97: 503-514.
- Guedes AD, Bianco B, Lipay MVN, Brunoni D, de Lourdes Chaufaille M, et coll. *Determination of the sexual phenotype of a child with 45,X/46,X,idic(Yp) mosaicism: Importance of the relative proportion of the 45,X line in gonadal tissue*. Am J Med Genet Part A 2006; 140A: 1871-1875.
- Guioli S, Incerti B, Zanaria E, Bardoni B, Franco B, et coll. *Kallmann syndrome due to a translocation resulting in an X/Y fusion gene*. Nat Genet 1992; 1: 337-340.
- Haaf T, Schmid M. *Y isochromosome associated with a mosaic karyotype and inactivation of the centromere*. Hum Genet 1990; 85: 486-490.
- Hackett JA, Feldser DM, Greider CW. *Telomere dysfunction increases mutation rate and genomic instability*. Cell 2001; 106: 275-286.
- Hageman RM, Cameron FJ, Sinclair AH. *Mutation analysis of the SOX9 gene in a patient with campomelic dysplasia*. Hum Mutat 1998; Suppl 1: S112-S113.
- Hall H, Hunt P, Hassold T. *Meiosis and sex chromosome aneuploidy: How meiotic errors cause aneuploidy; how aneuploidy causes meiotic errors*. Curr Opin Genet Devel 2006; 16: 323-329.
- Hall LL, Clemson CM, Byron M, Wydner K, Lawrence JB. *Unbalanced X;autosome translocations provide evidence for sequences specificity in the association of XIST RNA with chromatin*. Hum Mol Genet 2002; 11: 3157-3165.
- Hamelin CE, Anglin G, Quigley CA, Deal CL. *Genomic imprinting in Turner syndrome: Effects on response to growth hormone and on risk of sensorineural hearing loss*. J Clin Endocrinol Metab 2006; 91: 3002-3010.
- Harley VR, Jackson DI, Hextall PJ, Hawkins JR, Berkovitz GD, et coll. *DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females*. Science 1992; 255: 453-456.
- Hartlerod AJ, Scully R. *Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells*. Biochem J 2009; 423: 157-168.
- Häsler J, Strub K. *Alu elements as regulators of gene expression*. Nucleic Acid Res 2006; 34: 5491-5497.

- Hassold T, Benham F, Leppert M. *Cytogenetic and molecular analysis of sex-chromosome monosomy*. Am J Hum Genet 1988; 42: 534-541.
- Hassold T, Chen N, Funkhouser J, Jooss T, Manuel B, et coll. *A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions*. Ann Hum Genet 1980; 44: 151-178.
- Hassold T, Hall H, Hunt P. *The origin of human aneuploidy: Where we have been, where we are going*. Hum Mol Genet 2007; 16: R203-R208.
- Hassold T, Jacobs PA. *Trisomy in man*. Ann Rev Genet 1984; 18: 69-97.
- Hatano O, Takayama K, Imai T, Waterman MR, Takakusu A, et coll. *Sex-dependent expression of a transcription factor, Ad4BP, regulating steroidogenic P-450 genes in the gonads during prenatal and postnatal rat development*. Development 1994; 120: 27887-2797.
- Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD, Watanabe H, Yada T, et coll. *The DNA sequence of human chromosome 21*. Nature 2000; 405: 311-319.
- Hawkins JR, Taylor A, Goodfellow PN, Migeon CJ, Smith KD, et coll. *Evidence for increased prevalence of SRY mutations in XY females with complete rather than partial gonadal dysgenesis*. Am J Hum Genet 1992; 51: 979-984.
- Hawley RS, Frazier JA, Rasooly R. *Separation anxiety: The etiology of nondisjunction in flies and people*. Hum Mol Genet 1994; 3: 1521-1528.
- Heard E, Rougeulle C, Arnaud D, Avner P, Allis CD, et coll. *Methylation of histone H3 at Lys-9 is an early mark on the X chromosome during X inactivation*. Cell 2001; 107: 727-738.
- Held KR, Kerber S, Kaminsky E, Singh S, Goetz P, et coll. *Mosaicism in 45,X Turner syndrome: Does survival in early pregnancy depend on the presence of two sex chromosomes?* Hum Genet 1992; 88: 288-294.
- Henegariu O, Kernek S, Keating MA, Palmer CG, Heerema NA. *PCR and FISH analysis of a ring Y chromosome*. Am J Med Genet 1997a; 69: 171-176.
- Henegariu O, Pescovitz OH, Vance GH, Verbrugge J, Heerema NA. *A case with mosaic di-, tetra-, and octacentric ring Y chromosomes*. Am J Med Genet 1997b; 71: 426-429.
- Higgins AW, Gustashaw KM, Willard HF. *Engineered human dicentric chromosomes show centromere plasticity*. Chromosome Res 2005; 13: 745-762.

- Higgins AW, Schueler MG, Willard HF. *Chromosome engineering: Generation of mono- and dicentric isochromosomes in a somatic cell hybrid system*. *Chromosoma* 1999; 108: 256-265.
- Hillier LW, Graves TA, Fulton RS, Fulton LA, Pepin KH, et coll. *Generation and annotation of the DNA sequences of human chromosomes 2 and 4*. *Nature* 2005; 434: 724-731.
- Hines RS, Tho SPT, Zhang YY, Plouffe L, Hansen KA, et coll. *Paternal somatic and germ-line mosaicism for a sex-determining region on Y (SRY) missense mutation leading to recurrent 46,XY sex reversal*. *Fertil Steril* 1997; 67: 675-679.
- Holcomb IN, Trask BJ. *Comparative genomic hybridization to detect variation in the copy number of large DNA segments*. Dans: Weiner MP, Gabriel SB, Stephens JC, eds. *Genetic variation: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, États-Unis: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007; 221-232.
- Holroyd KJ, Martinati LC, Trabetti E, Sherpbier T, Eleff SM, et coll. *Asthma and bronchial hyperresponsiveness linked to the XY long arm pseudoautosomal region*. *Genomics* 1998; 52: 233-235.
- Hook EB, Warburton D. *The distribution of chromosomal genotypes associated with Turner's syndrome: Livebirth prevalence rates and evidence for diminished fetal mortality and severity in genotypes associated with structural X abnormalities or mosaicism*. *Hum Genet* 1983; 64: 24-27.
- Honecker F, Stoop H, de Krijger RR, Lau Y-FC, Bokemeyer C, et coll. *Pathobiological implications of the expression of markers of testicular carcinoma in situ by fetal germ cells*. *J Pathol* 2004; 203: 849-857.
- Hoyle C, Narvaez V, Alldus G, Lovell-Badge R, Swain M. *Dax1 expression is dependant on steroidogenic factor 1 in the developping gonad*. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 747-756.
- Hsieh S-Y, Chen W-Y, Yeh T-S, Sheen I-S, Huang S-F. *High-frequency Alu-mediated genomic recombination/deletion within the caspase-activated DNase gene in human hepatoma*. *Oncogene* 2005; 24: 6584-6589.
- Hsieh YY, Lin W-C, Chang C-C, Tsai F-J, Yu M-T, et coll. *Turner syndrome with pseudo-dicentric Y chromosome mosaicism*. *J Assist Reprod Genet* 2002; 19: 302-303.

- Hsu LYF. *Phenotype/karyotype correlations of Y chromosome aneuploidy with emphasis on structural aberrations in postnatally diagnosed cases*. Am J Med Genet 1994; 53: 108–140.
- Hsu LYF, Benn PA, Tannenbaum HL, Perlis TE, Carlson AD. *Chromosomal polymorphisms of 1, 9, 16, and Y in 4 major ethnic groups: A large prenatal study*. Am J Med Genet 1987; 26: 95-101.
- Huang B, Martin CL, Sandlin CJ, Wang S, Ledbetter DH. *Mitotic and meiotic instability of a telomere association involving the Y chromosome*. Am J Med Genet Part A 2004; 129A: 120-123.
- Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb AN, Bartley J. *Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9*. Am J Med Genet 1999; 87: 349-353.
- Hudson DF, Fowler KJ, Earle E, Saffery R, Kalitsis P, et coll. *Centromere protein B null mice are mitotically and meiotically normal but have lower body and testis weights*. J Cell Biol 1998; 141: 309-319.
- Hughes IA. *Disorders of sex development: A new definition and classification*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2008; 22: 119-134.
- Hurles ME, Jobling MA. *A singular chromosome*. Nat Genet 2003; 34: 246-247.
- Hurles ME, Willey D, Matthews L, Hussain SS. *Origins of chromosomal rearrangement hotspots in the human genome: Evidence from the AZFa deletion hotspots*. Genome Biol 2004; 5: R55 disponible au www.genomebiology.com/2004/5/8/R55
- In't Veld PA, van Opstal D, Van den Berg C, Van Ooijen M, Bradenburg H, et coll. *Increased incidence of cytogenetic abnormalities in chorionic villus samples from pregnancies established by in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET)*. Prenat Diagn 1995; 15: 975-980.
- Ijdo JW, Baldini A, Ward DC, Reeders ST, Wells RA. *Origin of human chromosome 2: An ancestral telomere-telomere fusion*. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 9051-9055.
- Iourov IY, Vosanova SG, Liehr T, Monakhov VV, Soloviev IV, et coll. *Dynamic mosaicism manifesting as loss, gain and rearrangement of an isodicentric Y chromosome in a male child with growth retardation and abnormal external genitalia*. Cytogenet Genome Res 2008; 121: 302-306.

- Irelan JT, Gutkin GI, Clarke L. *Functional redundancies, distinct localizations and interactions among three fission yeast homologs of centromeric protein-B*. *Genetics* 2001; 157: 1191-1203.
- ISCN (2005): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Shaffer LG, Tommerup N, eds. Bâle, Suisse: S. Karger, 2005.
- ISCN (2009): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ, eds. Bâle, Suisse: S. Karger, 2009.
- Isidor B, Capito C, Paris F, Baron S, Corradini N, et coll. *Familial frameshift SRY mutation inherited from a mosaic father with testicular dysgenesis syndrome*. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 3467-3471.
- Iyer AK, McCabe ERB. *Molecular mechanisms of DAX1 action*. *Mol Genet Metab* 2004; 83: 60-73.
- Jabobs P, Dalton P, James R, Mosse K, Power M, et coll. *Turner syndrome: A cytogenetic and molecular study*. *Ann Hum Genet* 1997; 61: 471-483.
- Jäger RJ, Harley VR, Pfeiffer RA, Goodfellow PN, Scherer G. *A familial mutation in the testis-determining gene SRY shared by both sexes*. *Hum Genet* 1992; 90: 350-355.
- Jakubowski L, Jeziorowska A, Constantinou M, Kaluzewski B. *Molecular analysis of Y chromosome long arm structural instability in patients with gonadal dysfunction*. *Clin Genet* 2000; 57: 291-295.
- Jaubert F, Robboy SJ, Mutter GL, Fellous M. *Embryology*. Dans: Robboy SJ, Mutter GL, Prat J, Bentley RC, Russell P, Anderson MC, eds. *Pathology of the female reproductive tract, 2nd edition*. Londres, Royaume-Uni: Churchill Livingstone Elsevier, 2009; 1-21.
- Jeppesen P, Turner BM. *The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression*. *Cell* 1993; 74: 281-289.
- Jessberger R. *New insights into germ cell tumor formation*. *Horm Metab Res* 2008; 40: 342-346.
- Jewett T, Marnane D, Stewart W, Hayworth-Hodge R, Finklea L, et coll. *Jumping translocation with partial duplications and triplications of chromosomes 7 and 15*. *Clin Genet* 1998; 53: 415-420.

- Jobling MA, Lo ICC, Turner DJ, Bowden GR, Lee AC, et coll. *Structural variation on the short arm of the human Y chromosome: Recurrent multigene deletions encompassing Amelogenin Y*. Hum Mol Genet 2007; 16: 307-316.
- Jobling MA, Williams G, Schiebel K, Pandya A, McElreavey K, et coll. *A selective difference between human Y-chromosomal DNA haplotypes*. Curr Biol 1998; 8: 1391-1394.
- Johnson JG, Byrd JR, McDonough PG. *True hermaphroditism with peripheral blood and gonadal karyotyping*. Obstet Gynecol 1979; 54: 549-553.
- Johnson RD, Jasin M. *Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells*. EMBO J 2000; 19: 3398-3407.
- Johnston AW, Speed RM, Klopper A, Robinson JA. *A patient with a dicentric Y chromosome*. Clin Genet 1974; 6: 326-331.
- Jordan BK, Jain M, Natarajan S, Frasier SD, Vilain E. *Familial mutation in the testis-determining gene SRY shared by an XY female and her normal father*. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87: 3428-3432.
- Jordan BK, Mohammed M, Ching ST, Délot E, Chen X-N, et coll. *Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans*. Am J Hum Genet 2001; 68: 1102-1109.
- Jordan BK, Shen JH-C, Olaso R, Ingraham HA, Vilain E. *Wnt4 overexpression disrupts normal testicular vasculature and inhibits testosterone synthesis by repressing steroidogenic factor 1/ β -catenin synergy*. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 10866-10871.
- Josifova DJ, Mazzaschi R, Ballard T, Ogilvie CM, Splitt M. *A constitutional telomeric translocation showing meiotic instability*. Am J Med Genet Part A 2006; 140: 1228-1233.
- Kaplan NM. *The adrenal glands*. Dans: Griffin JE, Ojeda SR, eds. *Textbook of endocrine physiology, 4th edition*. New York, États-Unis: Oxford University Press, Inc., 2000; 328-356.
- Kapoor M, Montes de Oca Luna R, Liu G, Lozano G, Cummings C, et coll. *The cenpB gene is not essential in mice*. Chromosoma 1998; 107: 570-576.

- Kauppi P, Laitinen T, Ollikainen V, Mannila H, Laitinen LA, et coll. *The IL9R region contribution in asthma is supported by genetic association in an isolated population.* Eur J Hum Genet 2000; 8: 788-792.
- Kawakami T, Okamoto K, Sugihara H, Hattori T, Reeve AE, et coll. *The roles of supernumerical X chromosomes and XIST expression in testicular germ cell tumors.* J Urol 2003; 169: 1546-1552.
- Kersemaekers A-MF, Honecker F, Stoop H, Cools M, Molier M, et coll. *Identification of germ cells at risk for neoplastic transformation in gonadoblastoma: An immunohistochemical study for OCT3/4 and TSPY.* Hum Pathol 2005; 36: 512-521.
- Kim HJ, Hsu LY, Goldsmith LC, Strauss L, Hirschhorn K. *Familial translocation with partial trisomy of 13 and 22: Evidence that specific regions of chromosomes 13 and 22 are responsible for the phenotype of each trisomy.* J Med Genet 1977; 14: 114-119.
- Kim Y, Kobayashi A, Sekido R, DiNapoli L, Brennan J, et coll. *Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination.* PLoS Biol 2006; 4: e187 disponible au www.plosbiology.org/article/info:doi/10.1371/journal.pbio.0040187
- Kjellman C, Sjögren H-O, Widegren B. *The Y chromosome: A graveyard for endogenous retroviruses.* Gene 1995; 161: 163-170.
- Klink A, Schiebel K, Winkelmann M, Rao E, Horsthemke B, et coll. *The human protein kinase gene PKX1 on Xp22.3 displays Xp/Yp homology and is a site of chromosomal instability.* Hum Mol Genet 1995; 4: 869-878.
- Knight SJL, Lese CM, Precht KS, Kuc J, Ning Y, et coll. *An optimized set of human telomere clones for studying telomere integrity and architecture.* Am J Hum Genet 2000; 67: 320-332.
- Knower KC, Kelly S, Harley VR. *Turning on the male - SRY, SOX9 and sex determination in mammals.* Cytogenet Genome Res 2003; 101: 185-198.
- Koehler KE, Boulton CL, Collins HE, French RL, Herman KC, et coll. *Spontaneous X chromosome MI and MII nondisjunction events in Drosophila melanogaster oocytes have different recombinational histories.* Nat Genet 1996; 14: 406-414.

- Kogo H, Inagaki H, Ohye T, Kato T, Emanuel BS, et coll. *Cruciform extrusion propensity of human translocation-mediating palindromic AT-rich repeats*. *Nucleic Acid Res* 2007; 35: 1198-1208.
- Kojima Y, Hayashi Y, Mizuno K, Sasaki S, Fukuit Y, et coll. *Up-regulation of SOX9 in human sex-determining region on the Y chromosome (SRY)-negative XX males*. *Clin Endocrinol* 2008; 68: 791-799.
- Kohler MR, Vogt PH. *Interstitial deletions of repetitive DNA blocks in dicentric human Y chromosomes*. *Chromosoma* 1994; 103: 324–330.
- Kohn B, Kleyman SM, Conte RA, Macera MJ, Glassberg K, et coll. *Characterization of an isodicentric Y-chromosome for the long arm in a newborn with mixed gonadal dysgenesis*. *Ann Genet* 1997; 40: 10–13.
- Korn WM, Olde Weghuis DEM, Suijkerbuijk RF, Schmidt U, Otto T, et coll. *Detection of chromosomal DNA gains and losses in testicular germ cell tumors by comparative genomic hybridization*. *Genes Chromosomes Cancer* 1996; 17: 78-87.
- Kosho T, Matsushima K, Sahashi T, Mitsui N, Fukushima Y, et coll. *'Ring syndrome' involving chromosome 2 confirmed by FISH analysis using chromosome-specific subtelomeric probes*. *Genet Couns* 2005; 16: 65-70.
- Kosho T, Muroya K, Nagai T, Fujimoto M, Yokoya S, et coll. *Skeletal features and growth patterns in 14 patients with haploinsufficiency of SHOX: Implications for the development of Turner syndrome*. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 4613-4621.
- Kovaleva NV, Mutton DE. *Epidemiology of double aneuploidies involving chromosome 21 and the sex chromosomes*. *Am J Med Genet Part A* 2005; 134A: 24-32.
- Kozak L, Hrabincova E, Kintr J, Horoky O, Zapletalova P, et coll. *Identification and characterization of large deletions in the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene by MLPA: Evidence for both homologous and non-homologous mechanisms of rearrangement*. *Mol Genet Metab* 2006; 89: 300-309.
- Kozubek S, Lukášová E, Marecková A, Skalníková, Kozubek M, et coll. *The topological organization of chromosomes 9 and 22 in cell nuclei has a determinative role in the induction of t(9;22) translocations and in the pathogenesis of t(9;22) leukemias*. *Chromosoma* 1999; 108: 426-435.

- Krob G, Braun A, Kuhnle U. *True hermaphroditism: Geographical distribution, clinical findings, chromosomes and gonadal histology*. Eur J Pediatr 1994; 153: 2-10.
- Kuchinka B, Kalousek D, Lomax B, Harrison K, Barrett I. *Interphase cytogenetic analysis of single cell suspensions prepared from previously formalin-fixed and paraffin-embedded tissues*. Modern Pathol 1995; 8: 183-186.
- Kühl H, Röttger S, Heilbronner H, Enders H, Schempp W. *Loss of the Y chromosomal PAR2-region in four familial cases of satellited Y chromosomes (Yqs)*. Chromosome Res 2001; 9: 215-222.
- Kukolich MK, Kulharya A, Jalal SM, Drummond-Borg M. *Trisomy 22: No longer an enigma*. Am J Med Genet 1989; 34: 541-544.
- Kunkel LM, Monaco AP, Middlesworth W, Ochs HD, Latt SA. *Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with an X chromosome deletion*. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82: 4778-4782.
- Kurahashi H, Inagaki H, Ohye T, Kogo H, Kato T, et coll. *Palindrome-mediated chromosomal translocations in humans*. DNA Repair (Amst) 2006; 5: 1136-1145.
- Kurahashi H, Inagaki H, Ohye T, Kogo H, Tsutsumi M, et coll. *The constitutional t(11;22): Implications for a novel mechanism responsible for gross chromosomal rearrangements*. Clin Genet 2010; 78: 299-309.
- Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG, Minx PJ, Cordum HS, Waterston RH, et coll. *The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men*. Nature Genet 2001; 29: 279-286.
- Kusz K, Kotecki M, Wojda A, Szarras-Czapnik M, Latos-Bielenska A, et coll. *Incomplete masculinisation of XX subjects carrying the SRY gene on an inactive X chromosome*. J Med Genet 1999; 452-456.
- Kvaløy K, Galvagni F, Brown WR. *The sequence organization of the long arm pseudoautosomal region of the human sex chromosomes*. Hum Mol Genet 1994; 3: 771-778.
- Kwok C, Weller PA, Guioli S, Foster JW, Mansour S, et coll. *Mutations in SOX9, the gene responsible for campomelic dysplasia and autosomal sex reversal*. Am J Hum Genet 1995; 57: 1028-1036.

- Laberge C, Gagné R. *Quinacrine mustard staining solves the length variations of the human Y chromosome*. Johns Hopkins Med J 1971; 128: 79-83.
- Ladonne JM, Gaillard D, Carre-Pigeon F, Gabriel R. *Fryns syndrome phenotype and trisomy 22*. Am J Med Genet 1996; 61: 68-70.
- Lahn BT, Page DC. *Four evolutionary strata on the human X chromosome*. Science 1999; 286: 964-967.
- Lahn BT, Pearson NM, Jegalian K. *The human Y chromosome in the light of evolution*. Nat Rev Genet 2001; 2: 207-206.
- Lamb NE, Feingold E, Savage A, Avramopoulos D, Freeman S, et coll. *Characterization of susceptible chiasma configurations that increase the risk for maternal nondisjunction of chromosome 21*. Hum Mol Genet 1997; 6: 1391-1399.
- Lange J, Skaletsky H, van Daalen SKM, Embry SL, Korver CM, et coll. *Isodicentric Y chromosomes and sex disorders as byproducts of homologous recombination that maintains palindromes*. Cell 2009; 138: 855-869.
- Lau Y-FC. *Sex chromosomes genetics '99: Gonadoblastoma, testicular and prostate cancers, and the TSPY gene*. Am J Hum Genet 1999; 64: 921-927.
- Lau Y-FC, Lau HW, Komuves LG. *Expression pattern of a gonadoblastoma candidate gene suggests a role of the Y chromosome in prostate cancer*. Cytogenet Genome Res 2003; 101: 250-260.
- Lau Y-FC, Li Y, Kido T. *Gonadoblastoma locus and the TSPY gene on the human Y chromosome*. Birth Defects Res Part C Embryo Today 2009; 87: 114-122.
- Lavoie J, Drouin R. *Lymphoblasts already in the DNA synthesis phase of the cell cycle can be reversibly arrested at the R/G transition*. Chromosoma 2001; 110: 501-510.
- Le Caignec C, Baron S, McElreavey K, Joubert M, Rival J-M, et coll. *46,XY gonadal dysgenesis: Evidence for autosomal dominant transmission in a large kindred*. Am J Med Genet Part A 2003; 116A: 37-43.
- Le Caignec C, Boceno M, Jacquemont S, Nguyen The Tich S, Rival JM, et coll. *Inherited ring chromosome 8 without loss of subtelomeric sequences*. Ann Genet 2004; 47: 289-296.
- Lee JT, Davidow LS, Warshawsky D. *Tsix, a gene antisens to Xist at the X-inactivation centre*. Nature 1999; 21: 400-404.

- Lefort G, Blanchet P, Chaze A, Sarda P, Demaille J, et coll. *PRINS labeling reveals interstitial telomeric sequences in a constitutional jumping translocation*. *Am J Hum Genet* 1997; 61 (Suppl): A131 (#745).
- Leisti JT, Kaback MM, Rimoin DL. *Human X-autosome translocations: Differential inactivation of the X chromosome in a kindred with an X-9 translocation*. *Am J Hum Genet* 1975; 27: 441-453.
- Lejeune J. *De la duplication de structures circulaires*. *Ann Genet* 1968; 11:71-77.
- Lemieux N, Drouin R, Richer CL. *High-resolution dynamic and morphological G-bandings (GBG and GTG): A comparative study*. *Hum Genet* 1990; 85: 261-266.
- Lemieux N, Dutrillaux B, Viegas-Pequignot E. *A simple method for simultaneous R- or G-banding and fluorescence in situ hybridization of small single-copy genes*. *Cytogenet Cell Genet* 1992; 59: 311–312.
- Li L, Hamer DH. *Recombination and allelic association in the Xq/Yq homology region*. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 2013-2016.
- Li Y, Tabatabai L, Lee T-L, Hatakeyama S, Ohyama C, et coll. *The Y-encoded TSPY protein: A significant marker potentially plays a role in the pathogenesis of testicular germ cell tumors*. *Hum Pathol* 2007; 38: 1470-1481.
- Little M, Wells C. *A clinical overview of WT1 gene mutations*. *Hum Mutat* 1997; 9: 209-225.
- Liu Y-C, Wei T-C, Hsu Y-H, Fang JS, Lee ML. *Gonadoblastoma and choriocarcinoma in dysgenetic gonads: Report of a case*. *J Formos Med Assoc* 1995; 94: 568-571.
- Looijenga LHJ, Gillis ADJM, Stoop HJ, Hersmus R, Oosterhuis JW. *Chromosomes and expression in human testicular germ-cell tumors: Insight into their cell of origin and pathogenesis*. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1120: 187-214.
- Looijenga LHJ, Rosenberg C, van Gurp RJHLM, Geelen E, van Echten-Arends J, et coll. *Comparative genomic hybridization of microdissected samples from different stages in the development of a seminoma and a non-seminoma*. *J Pathol* 2000; 191: 187-192.

- Luciani JJ, de Mas P, Depetris D, Mignon-Ravix C, Bottani A, et coll. *Telomeric 22q13 deletions resulting from rings, simple deletions, and translocations: Cytogenetic, molecular, and clinical analyses of 32 new observations*. J Med Genet 2003; 40: 690-696.
- Ludbrook LM, Harley VR. *Sex determination: A 'window' of DAX1 activity*. Trends Endocrinol Metab 2004; 15: 116-121.
- Ludeña P, Fernández-Piqueras J, Sentís C. *Distribution of DYZ2 repetitive sequences on the human Y chromosome*. Hum Genet 1993; 90: 572-574.
- Lugtenberg D, de Brouwer APM, Keefstra T, Oudakker AR, Frints SGM, et coll. *Chromosomal copy number changes in patients with non-syndromic X linked mental retardation detected by array CGH*. J Med Genet 2006; 43: 362-370.
- Lukusa T, Fryns J-P. *Human chromosome fragility*. Biochim Biophys Acta 2008; 1779: 3-16.
- Lynn A, Ashley T, Hassold T. *Variation in human meiotic recombination*. Annu Rev Genomics Hum Genet 2004; 5: 317-349.
- Lyon MF. *Gene action in the X-chromosome of the mouse (Mus musculus L.)*. Nature 1961; 19: 372-373.
- Lyon MF. *X-chromosome inactivation: A repeat hypothesis*. Cytogenet Cell Genet 1998; 80: 133-137.
- Maatouk DM, DiNapoli L, Alvers A, Parker KL, Taketo MM, et coll. *Stabilization of β -catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal*. Hum Mol Genet 2008; 17: 2949-2955.
- Málková J, Michalová K, Chrz R, Kobilková J, Motlík K, et coll. *Dicentric Yp chromosome in a patient with the gonadal dysgenesis and gonadoblastoma*. Humangenetik 1975; 27: 251-253.
- Maloy S. *Experimental techniques in bacterial genetics*. Boston, États-Unis: Jones and Bartlett Publishers, 1990.
- Manasse BF, Pfaffenzeller WM, Gurtunca N, de Ravel TJ. *Possible isochromosome 22 leading to trisomy 22*. Am J Med Genet 2000; 95: 411-414.

- Mandel H, Shemer R, Borochowitz ZU, Okopnik M, Knopf C, et coll. *SERKAL syndrome: An autosomal-recessive disorder caused by a loss-of-function mutation in WNT4*. Am J Hum Genet 2008; 82: 39-47.
- Mansour S, Hall CM, Pembrey ME, Young ID. *A clinical and genetic study of campomelic dysplasia*. J Med Genet 1995; 32: 415-420.
- Manz E, Schnieders F, Brechlin AM, Schmidtke J. *TSPY-related sequences represent a microheterogeneous gene family organized as constitutive elements in DYZ5 tandem repeat units on the human Y chromosome*. Genomics 1993; 17: 726-731.
- Maranda B, Lemieux N, Lemyre E. *Familial deletion 18p syndrome: Case report*. BMC Med Genet 2006; 7: 60 disponible au www.biomedcentral.com/1471-2350/7/60
- Marcus-Soekarman D, Hamers G, Mulder ALM, Offermans J, Offermans J, et coll. *Sonographic genital ambiguity in a fetus due to a mosaic 45,X/46,X,idic(Y)(qter-p11.32::p11.32-qter) karyotype*. Prenat Diagn 2005; 25: 279-282.
- Marinescu RC, Johnson EI, Grady D, Chen X-N, Overhauser J. *FISH analysis of terminal deletions in patients diagnosed with Cri-du-Chat syndrome*. Clin Genet 1999; 56: 282-288.
- Masumoto H, Masukata H, Muro Y, Nozaki N, Okazaki T. *A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromeric satellite*. J Cell Biol 1989; 109: 1963-1973.
- Masumoto H, Nakano M, Ohzeki J-I. *The role of CENP-B and α -satellite DNA: de novo assembly and epigenetic maintenance of human centromeres*. Chromosome Res 2004; 12: 543-556.
- Matsumura K, Kallioniemi A, Kallioniemi O, Chen L, Smith HS, et coll. *Deletion of chromosome 17p loci in breast cancer cells detected by fluorescence in situ hybridization*. Cancer Res 1992; 52: 3474-3477.
- Mattei MG, Mattei JF, Ayme S, Giraud F. *X-autosome translocations: Cytogenetic characteristics and their consequences*. Hum Genet 1982; 61: 295-309.
- McClintock B. *The stability of broken ends of chromosomes in Zea mays*. Genetics 1941; 26: 234-282.
- McDermid HE, Morrow BE. *Genomic disorders on 22q11*. Am J Hum Genet 2002; 70: 1077-1088.

- McDonald MT, Flejter W, Sheldon S, Putzi MJ, Gorski JL. *XY sex reversal and gonadal dysgenesis due to 9p24 monosomy*. Am J Med Genet 1997; 73: 321-326.
- McElreavey K, Barbaux S, Ion A, Fellous M. *The genetic basis of murine and human sex determination: A review*. Heredity 1995; 75: 599-611.
- McElreavey K, Rappaport R, Vilain E, Abbas N, Richaud F, et coll. *A minority of 46,XX true hermaphrodites are positive for the Y-DNA sequence including SRY*. Hum Genet 1992; 90: 121-125.
- McIntyre A, Gilbert D, Goddart N, Looijenga L, Shipley J. *Genes, chromosomes and the development of testicular germ cell tumors of adolescents and adults*. Genes Chromosomes Cancer 2008; 47: 547-557.
- McIntyre A, Summersgill B, Jafer O, Rodriguez S, Zafarana G, et coll. *Defining minimum genomic regions of imbalance involved in testicular germ cell tumors of adolescents and adults through genome wide microarray analysis of cDNA clones*. Oncogene 2004; 23: 9142-9147.
- McIntyre A, Summersgill B, Lu YJ, Missiaglia E, Kitazawa S et coll. *Genomic copy number and expression patterns in testicular germ cell tumours*. Br J Cancer 2007; 97: 1717-1712.
- Meeks JJ, Crawford SE, Russell TA, Morohashi K-I, Weiss J, et coll. *Dax1 regulates testis cord organization during gonadal differentiation*. Development 2003; 130: 1029-1036.
- Mefford HC, Trask BJ. *The complex structure and dynamic evolution of human subtelomeres*. Nat Rev Genet 2002; 3: 91-102.
- Melaragno MI, de Paula Ramos MA, Brunoni D. *Partial Xp duplication due to a translocation t(X;15) in two male and two female patients: A familial case report and review of the literature*. Ann Genet 1998; 41: 189-194.
- Melek M, Shippen DE. *Chromosome healing: Spontaneous and programmed de novo telomere formation by telomerase*. Bioessays 1996; 18: 301-308.
- Meltzer PS, Guan X-Y, Trent JM. *Telomere capture stabilizes chromosome breakage*. Nat Genet 1993; 4: 252-255.

- Mendonca B, Domenice S, Costa E, Arnold I. *Male pseudohermaphroditism*. Dans: New M, ed. *Pediatric endocrinology*. South Dartmouth, États-Unis: MDText.com, Inc., 2005 disponible au www.endotext.org
- Meyer J, Sudbeck P, Held M, Wagner T, Schmitz ML, et coll. *Mutational analysis of the SOX9 gene in campomelic dysplasia and autosomal sex reversal: Lack of genotype/phenotype correlations*. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 91-98.
- Meyne J, Ratliff RL, Moyzis RK. *Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 7049-7053.
- Migeon BR, Chowdhury AK, Dunston JA, McIntosh I. *Identification of TSIX, encoding an RNA antisense to human XIST, reveals differences from its murine counterpart: Implications for X inactivation*. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 951-960.
- Migeon CJ, Wisniewski AB. *Human sex differentiation and its abnormalities*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2003; 17: 1-18.
- Mignon-Ravix C, Depetris D, Luciani JJ, Cuoco C, Krajewska-Walasek M, et coll. *Recurrent rearrangements in the proximal 15q11-q14 region: A new breakpoint cluster specific to unbalanced translocations*. *Eur J Hum Genet* 2007; 5: 432-440.
- Miller OJ, Therman E. *Human chromosomes, 4th edition*. New York, États-Unis: Springer-Verlag, 2001.
- Mitchell AR, Gosden JR, Miller DA. *A cloned sequence, p82H, of the alphoid repeated DNA family found at the centromeres of all human chromosomes*. *Chromosoma* 1985; 92: 369-377.
- Mitchell CL, Harley VR. *Biochemical defects in eight SRY missense mutations causing XY gonadal dysgenesis*. *Mol Genet Metab* 2002; 77: 217-225.
- Mizusaki H, Kawabe K, Mukai T, Ariyoshi E, Kasahara M, et coll. *Dax-1 (dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1) gene transcription is regulated by Wnt4 in the female developing gonad*. *Mol Endocrinol* 2003; 17: 507-519.
- Modan-Moses D, Litmanovitch T, Rienstein S, Mererovitch J, Goldman B, et coll. *True hermaphroditism with ambiguous genitalia due to a complicated mosaic karyotype: Clinical features, cytogenetic findings, and literature review*. *Am J Med Genet Part A* 2003; 116A: 300-303.

- Mohandas TK, Speed RM, Passage MB, Yen PH, Chandley AC, et coll. *Role of the pseudoautosomal region in sex-chromosome pairing during male meiosis: Meiotic studies in a man with a deletion of distal Xp*. Am J Hum Genet 1992; 51: 526-533.
- Morillo-Cucci G, German J. *Abnormal Y chromosomes and monosomy 45,X: A concept derived from the study of three patients*. Birth Defects Orig Artic Ser 1971; 7: 210-214.
- Morin GB. *The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats*. Cell 1989; 59: 521-529.
- Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, et coll. *A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes*. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85: 6622-6626.
- Muleris M, Richard F, Apiou F, Dutrillaux B. *Hybridation in situ en cytogénétique moléculaire: Principes et techniques*. Paris, France: Tec & Doc Lavoisier et Éditions Médicales Internationales, 1996.
- Müller DJ, Schulze TG, Jahnes E, Cichon S, Krauss H, et coll. *Association between a polymorphism in the pseudoautosomal X-linked gene SYBL1 and bipolar affective disorder*. Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet) 2002; 114: 74-78.
- Mumm S, Molini B, Terrell J, Srivastava A, Schlessinger D. *Evolutionary features of the 4-Mb Xq21.3 XY homology region revealed by a map at 60-kb resolution*. Genome Res 1997; 7: 307-314.
- Muro Y, Masumoto H, Yoda K, Nozaki N, Ohashi M, et coll. *Centromere protein B assembles human centromeric α -satellite DNA at the 17-bp sequence, CENP-B box*. J Cell Biol 1992; 116: 585-596.
- Muroya R, Okuyama T, Goishi K, Ogiso Y, Fukuda S, et coll. *Sex-determining gene(s) on distal 9p: Clinical and molecular studies in six cases*. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85: 3094-3100.
- Nachtigal MW, Hirokawa Y, Enyeart-VanHouten DL, Flanagan JN, Hammer GD, et coll. *Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression*. Cell 1998; 93: 445-454.

- Nakahori Y, Mitani K, Yamada M, Nakagome Y. *A human Y-chromosome specific repeated DNA family (DYZ1) consists of a tandem array of pentanucleotides.* Nucleic Acid Res 1986; 14: 7569-7580.
- Nath J, Tucker JD, Hando JC. *Y chromosome aneuploidy, micronuclei, kinetochores and aging in men.* Chromosoma 1995; 103: 725-731.
- Nazarenko SA, Nazarenko LP, Baranova VA. *Intra-individual polymorphism of human Y chromosome as a result of deletion in the heterochromatin region.* Genetika 1987; 23: 918-921.
- Neil DL, Villasante A, Fisher RB, Vetri D, Cox B, et coll. *Structural instability of human tandemly repeated DNA sequences cloned in yeast artificial chromosome vectors.* Nucleic Acid Res 1990; 18: 1421-1428.
- Neumann AA, Reddel RR. *Telomere maintenance and cancer – Look, no telomerase.* Nat Rev Cancer 2002; 2: 879-884.
- Nicholl RM, Grimsley L, Butler L, Palmer RW, Rees HC, et coll. *Trisomy 22 and intersex.* Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 1994; 71: F57-58.
- Nielsen KB, Dyggve HV, Knudsen H, Olsen J. *A chromosomal survey of an institution for the mentally retarded: Study of 476 karyotypes with banding techniques and clinical assessment of patients with chromosome anomalies.* Dan Med Bull 1983; 30: 5-13.
- Nielsen KB, Langkjaer F. *Inherited partial X chromosome duplication in a mentally retarded male.* J Med Genet 1982; 19: 222-226.
- Niessen RC, Jonkman MF, Muis N, Hordijk R, van Essen AJ. *Pigmentary mosaicism following the lines of Blaschko in a girl with a double aneuploidy mosaicism: (47,XX,+7/45,X).* Am J Med Genet Part A 2005; 137A: 313-322.
- Ning Y, Liang JC, Nagarajan L, Schrock E, Ried T. *Characterization of 5q deletions by subtelomeric probes and spectral karyotyping.* Cancer Genet Cytogenet 1998; 103: 170-172.
- Ogata T, Hawkins JR, Taylor A, Matsuo N, Hata J-I, et coll. *Sex reversal in a child with a 46,X,Yp+ karyotype: Support for the existence of a gene(s), located in distal Xp, involved in testis formation.* J Med Genet 1992; 29: 226-230.
- Ogata T, Matsuo M, Muroya K, Koyama Y, Fukutani K. *47,XXX male: A clinical and molecular study.* Am J Med Genet 2001; 98: 353-356.

- Ohno S, Kaplan WD, Kinosita R. *Formation of the sex chromatin by a single X-chromosome in liver cells of Rattus norvegicus*. *Exp Cell Res* 1959; 18: 415-418.
- Oosterhuis JW, Looijenga LHJ. *Testicular germ-cell tumours in a broader perspective*. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:210-222.
- Osipova GR, Karmanov ME, Kozlova SI, Evgrafov OV. *PCR detection of Y-specific sequences in patients with Ullrich-Turner syndrome: Clinical implications and limitations*. *Am J Med Genet* 1998; 76: 283-287.
- Osoegawa K, Mammoser AG, Wu C, Frengen E, Zeng C, et coll. *A Bacterial Artificial Chromosome library for sequencing the complete human genome*. *Genome Res* 2001; 11: 483-496.
- Ostrer H. *Sex determination: Lessons from families and embryos*. *Clin Genet* 2001; 59: 207-215.
- Ottesen AM, Kirchhoff M, Rajpert De-Meyts E, Maahr J, Gerdes T, et coll. *Detection of chromosomal aberrations in seminomatous germ cell tumours using comparative genomic hybridization*. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 20: 412-418.
- Ottesen AM, Skakkebaek NE, Lundsteen C, Leffers H, Larsen J, et coll. *High-resolution comparative genomic hybridization detects extra chromosome arm 12p material in most cases of carcinoma in situ adjacent to overt germ cell tumors, but not before the invasive tumor development*. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 38: 117-125.
- Õunap K, Uiho O, Zordania R, Kiho L, Ilus T, et coll. *Three patients with 9p deletions including DMRT1 and DMRT2: A girl with XY complement, bilateral ovotestes, and extreme growth retardation, and two XX females with normal pubertal development*. *Am J Med Genet* 2004; 130A: 415-423.
- Page DC. *Hypothesis: A Y-chromosomal gene causes gonadoblastoma in dysgenetic gonads*. *Development* 1987; 101: 151-155.
- Page DC, Bieker K, Brown LG, Hinton S, Leppert M, et coll. *Linkage, physical mapping, and DNA sequence analyses of pseudoautosomal loci on the human X and Y chromosomes*. *Genomics* 1987; 1: 243-256.
- Page DC, de la Chapelle A, Weissenbach J. *Chromosome Y-specific DNA in related human XX males*. *Nature* 1985; 315: 224-226.

- Palka G, Stuppia L, Guanciali Franchi P, Chiarelli F, Fischetto R, et coll. *Short arm rearrangements of sex chromosomes with haploinsufficiency of SHOX gene are associated with Leri-Weill dyschondrosteosis*. Clin Genet 2000; 57: 449-453.
- Parada LA, Misteli T. *Chromosome positioning in the interphase nucleus*. Trends Cell Biol 2002; 12: 425-432.
- Park VM, Gustashaw KM, Wathen TM. *The presence of interstitial telomeric sequences in constitutional chromosome abnormalities*. Am J Hum Genet 1992; 50: 914-923.
- Park SY, Meeks JJ, Raverot G, Pfaff LE, Weiss J, et coll. *Nuclear receptors Sfl and Dax1 function cooperatively to mediate somatic cell differentiation during testis development*. Development 2005; 132: 2415-2423.
- Parma P, Radi O, Vidal V, Chaboissier MC, Dellambra E, et coll. *R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy*. 2006; 38: 1304-1309.
- Patsalis PC, Sismani C, Quintana-Murci L, Taleb-Bekkouch F, Krausz C, et coll. *Effects of transmission of Y chromosome AZFc deletions*. Lancet 2002; 360: 1222-1224.
- Patsalis PC, Skordis N, Sismani C, Kousoulidou L, Koumbaris G, et coll. *Identification of high frequency of Y chromosome deletions in patients with sex chromosome mosaicism and correlations with the clinical phenotype and Y-chromosome instability*. Am J Med Genet Part A 2005; 135A: 145-149.
- Peiffer DA, Le JM, Steemers FJ, Chang W, Jenniges T, et coll. *High-resolution genomic profiling of chromosomal aberrations using Infinium whole-genome genotyping*. Genome Res 2006; 16: 1136-1148.
- Pelletier J, Bruening W, Kashtan CE, Mauer SM, Manivel JC, et coll. *Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome*. Cell 1991a; 67: 437-447.
- Pelletier J, Bruening W, Li FP, Haber DA, Glaser T, et coll. *WT1 mutations contribute to abnormal genital system development and hereditary Wilms' tumour*. Nature 1991b; 353: 431-434.
- Peña-Alonso R, Nieto K, Alvarez R, Palma I, Nájera N, et coll. *Distribution of Y-chromosome bearing cells in gonadoblastoma and dysgenetic testis in 45,X/46,XY infants*. Mod Pathol 2005; 18: 439-445.

- Perez-Castro A, Shamanski FL, Meneses JJ, Lovato TL, Vogel KG, et coll. *Centromeric protein B null mice are viable with no apparent abnormalities*. Dev Biol 1998; 201: 135-143.
- Petit C, Levilliers J, Weissenbach J. *Physical mapping of the human pseudo-autosomal region; comparison with genetic linkage map*. EMBO J 1988; 7: 2369-2376.
- Petit P, Devriendt K, Vermeesch JR, De Cock P, Fryns JP. *Unusual de novo t(13;15)(q12.1;p13) translocation leading to complex mosaicism including jumping translocation*. Ann Genet 1998; 41: 22-26.
- Petrusevska R, Beudt U, Schäfer D, Schneider M, Brude E, et coll. *Distribution of marker-Y chromosome containing cells in different tissues of a Turner mosaic patient with mixed gonadal dysgenesis*. Clin Genet 1996; 49: 261-266.
- Pezzolo A, Gimelli G, Cohen A, Lavaggetto A, Romano C, et coll. *Presence of telomeric and subtelomeric sequences at the fusion points of ring chromosomes indicates that the ring syndrome is caused by ring instability*. Hum Genet 1993; 92: 23-27.
- Pluta AF, Saitoh N, Goldgerg I, Earnshaw WC. *Identification of a subdomain of CENP-B that is necessary and sufficient for localization to the human centromere*. J Cell Biol 1992; 116: 1081-1093.
- Polanco JC, Wilhelm D, Davidson T-L, Knight D, Koopman P. *Sox10 gain-of-function causes XX sex reversal in mice: Implications for human 22q-linked disorders of sex development*. Hum Mol Genet 2010; 19: 506-516.
- Polani PE, Alberman E, Alexander BJ, Benson PF, Berry AC, et coll. *Sixteen years' experience of counselling, diagnosis, and prenatal detection in one Genetic Centre: Progress, results, and problems*. J Med Genet 1979; 16: 166-175.
- Popescu P, Hayes H, Dutrillaux B. *Techniques in animal cytogenetics: Principles and practice*. Heidelberg, Allemagne: Springer-Verlag et Éditions INRA, 2000.
- Poplinski A, Wieacker P, Kliesch S, Gromoll J. *Severe XIST hypomethylation clearly distinguishes (SRY+) 46,XX-maleness from Klinefelter syndrome*. Eur J Endocrinol 2010; 162: 169-175.
- Porter FD. *Human malformation syndromes due to inborn errors of cholesterol synthesis*. Curr Opin Pediatr 2003; 15: 607-613.

- Powell CM. *Sex chromosomes and sex chromosomes abnormalities*. Dans: Gersen SL, Keagle MB, eds. *The principles of clinical cytogenetics*. Totowa, États-Unis: Humana Press, 1999; 229-258.
- Przewloka MR, Glover DM. *The kinetochore and the centromere: A working long distance relationship*. *Annu Rev Genet* 2009; 43: 439-465.
- Puliti A, Rizzato C, Conti V, Bedini A, Gimelli G, et coll. *Low-copy repeats on chromosome 22q11.2 show replication timing switches, DNA flexibility peaks and stress inducible asynchrony, sharing instability features with fragile sites*. *Mutat Res* 2010; 686: 74-83.
- Qin Y, Bishop CE. *Sox9 is sufficient for functional testis development producing fertile male mice in the absence of Sry*. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 1221-1229.
- Qu J, Dallaire L, Fetni R, Lemieux N, Richer CL. *Repetitive telomeric sequences in chromosomal translocations involving chromosome 21*. *Am J Hum Genet* 1994; 55 (Suppl): A115 (#655).
- Quiapo G, Nieto K, Grether P, Frías S, Álvarez R, et coll. *Unusual mixed gonadal dysgenesis associated with Müllerian duct persistence, polygonadia, and a 45,X/46,X,idic(Y)(p) karyotype*. *Am J Med Genet Part A* 2005; 136A: 386-389.
- Quigley CA. *Genetic basis of gonadal and genital development*. Dans: DeGroot LJ, Jameson JL, de Krester D, Grossman AB, Marshall JC, Melmed S, Potts JT, Weir GC, eds. *Endocrinology, 5th edition*. Philadelphie, États-Unis: Saunders Elsevier, 2006; 2699-2738.
- Quilter CR, Nathwani N, Conway GS, Stanhope R, Ralph D, et coll. *A comparative study between infertile males and patients with Turner syndrome to determine the influence of sex chromosome mosaicism and the breakpoints of structurally abnormal Y chromosomes on phenotypic sex*. *J Med Genet* 2002; 39: e80
disponible au www.jmedgenet.com/cgi/content/full/39/12/e80
- Rajpert-de Meyts E, Høie-Hansen CE. *From gonocytes to testicular cancer: The role of impaired gonadal development*. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1120: 168-180.
- Ramos-Vara JA. *Technical aspects of immunohistochemistry*. *Vet Pathol* 2005; 42: 405-426.

- Rao E, Weiss B, Fukami M, Rump A, Niesler B, et coll. *Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome*. Nat Genet 1997; 16: 54-63.
- Rao N, Klinepeter K, Stewart W, Hayworth R, Grubs R, et coll. *Molecular cytogenetic analysis of a duplication Xp in a male: Further delineation of a possible sex influencing region on the X chromosome*. Hum Genet 1994; 94: 149-153.
- Ravel C, Siffroi J-P. *Anomalies de structure du chromosome Y et syndrome de Turner*. Gynecol Obstet Fertil 2009; 37: 511-518.
- Ravnan JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, Lamb AN, Hedrick J, et coll. *Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: An evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities*. J Med Genet 2006; 43: 478-489.
- Reddy KS, Murphy T. *Fusion of 9 beta-satellite and telomere (TTAGGG)(n) sequences results in a jumping translocation*. Hum Genet 2000; 107: 268-275.
- Reddy KS, Sulcova V. *Pathogenetics of 45,X/46,XY gonadal mosaicism*. Cytogenet Cell Genet 1998; 82: 52-57.
- Reddy KS, Sulcova V, Ho CK, Conner ED, Khurana A. *An infant with a mosaic 45,X/46,X,psu dic(Y)(pter-q11.2::q11.2-pter) karyotype and mixed gonadal dysgenesis studied for extent of mosaicism in the gonads*. Am J Med Genet 1996; 66: 441-444.
- Reeve A, Norman A, Sinclair P, Whittington-Smith R, Hamey Y, et coll. *True telomeric translocation in a baby with the Prader-Willi phenotype*. Am J Med Genet 1993; 47: 1-6.
- Reichenbach H, Holland H, Thamm B, Theile T. *Multiple abnormalities in a child with male karyotype due to familial partial Xp duplication*. Klinderarztl Prax 1993; 61: 291-295.
- Renwick PJ, Birley AJ, Hultén MA. *Study of Alu sequences at the hypoxanthine phosphoribosyltransferase (hprt) encoding region of man*. Gene 1997; 184: 155-162.

- Repping S, Skaletsky H, Lange J, Silber S, van der Veen F, et coll. *Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure*. Am J Hum Genet 2002; 71: 906-922.
- Repping S, van Daalen SKM, Brown LG, Korver CM, Lange J, et coll. *High mutation rates have driven extensive structural polymorphism among human Y chromosomes*. Nat Genet 2006; 38: 463-467.
- Ricard-Mousnier B, N'Guyen S, Dubas F, Pouplard F, Guichet A. *Ring chromosome 17 epilepsy may resemble that of ring chromosome 20 syndrome*. Epileptic Disord 2007; 9: 327-331.
- Rivera H, Sitch FL, Crolla JA. *Telomeric translocations are uncommon*. Genet Couns 1995; 6: 343-347.
- Rivera H, Vasquez AI, Perea FJ. *Centromere telomere (12;8p) fusion, telomeric 12q translocation, and i(12p) trisomy*. Clin Genet 1999; 55: 122-126.
- Robboy SJ, Bentley RC, Russell P. *Embryology of the female genital tract and disorder of abnormal sexual development*. Dans: Kurman RJ, ed. *Blaustein's pathology of the female genital tract, 5th edition*. New York, États-Unis: Springer-Verlag, 2002a; 3-36.
- Robboy SJ, Bentley RC, Russell P, Anderson MC. *Embryology and disorders of sexual development*. Dans: Robboy SJ, Anderson MC, Russell P, eds. *Robboy's Pathology of the female reproductive tract*. Londres, Royaume-Uni: Churchill Livingstone, 2002b; 819-860.
- Robboy SJ, Jaubert F. *Disorders of sexual development*. Dans: Robboy SJ, Mutter GL, Prat J, Bentley RC, Russell P, Anderson MC, eds. *Robboy's Pathology of the female reproductive tract, 2nd edition*. Londres, Royaume-Uni: Churchill Livingstone Elsevier, 2009; 945-977.
- Robboy SJ, Miller T, Donahoe PK, Jahre C, Welch WR, et coll. *Dysgenesis of testicular and streak gonads in the syndrome of mixed gonadal dysgenesis: Perspective derived from a clinicopathologic analysis of twenty-one cases*. Hum Pathol 1982; 13: 700-716.

- Robinson DO, Dalton P, Jacobs PA, Mosse K, Power MM, et coll. *A molecular and FISH analysis of structurally abnormal Y chromosomes in patients with Turner syndrome.* J Med Genet 1999; 36: 279–284.
- Robinson DO, Jacobs PA. *The origin of the extra Y chromosome in males with a 47,XYY karyotype.* Hum Mol Genet 1999; 8: 2205-2209.
- Robinson JA, Buckton KE. *Quinacrine fluorescence of variant and abnormal human Y chromosomes.* Chromosoma 1971; 35: 342-352.
- Rodríguez JI. *Vascular anomalies in campomelic syndrome.* Am J Med Genet 1993; 46: 185-192.
- Rooney DE, Szepulkowski BH. *Prenatal diagnosis and tissue culture.* Dans: Rooney DE, Szepulkowski BH, eds. *Human cytogenetics: A practical approach. Volume 1: Constitutional analysis.* New York, États-Unis: Oxford University Press, 1992; 55-89.
- Röpke A, Pelz AF, Volleth M, Schlösser HW, Morlot S, et coll. *Sex chromosomal mosaicism in the gonads of patients with gonadal dysgenesis, but normal female or male karyotypes in lymphocytes.* Am J Obstet Gynecol 2004; 190: 1059-1062.
- Rosenberg C, Van Gurp RJHLM, Geelen E, Oosterhuis JW, Looijenga LHJ. *Overrepresentation of the short arm of chromosome 12 is related to invasive growth of human testicular seminomas and nonseminomas.* Oncogene 2000; 19: 5858-5862.
- Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ, Scherer S, McLay K, et coll. *The DNA sequence of the human X chromosome.* Nature 2005; 434: 325-337.
- Ross NLJ, Yang J, Sargent CA, Boucher CA, Nanko S, et coll. *Triplication of several PAR1 genes and part of the Homo sapiens specific Yp11.2/Xq21.3 region of homology in a 46,X,t(X;Y)(p22.33;p11.2) male with schizophrenia.* J Med Genet 2001; 38: 710-719.
- Rossi E, Floridia G, Casali M, Danesino C, Chiumello G, et coll. *Types, stability, and phenotypic consequences of chromosome rearrangements leading to interstitial telomeric sequences.* J Med Genet 1993; 30: 926-931.
- Röttger S, Yen PH, Schempp W. *A fiber-FISH contig spanning the non-recombining region of the human Y chromosome.* Chromosome Res 2002; 10: 621–635.

- Rouyer F, Simmler M-C, Johnsson C, Vergnaud G, Cooke HJ, et coll. *A gradient of sex linkage in the pseudoautosomal region of the human sex chromosomes*. Nature 1986; 319: 291-295.
- Rouyer F, Simmler M-C, Page DC, Weissenbach J. *A sex chromosome rearrangement in a human XX male caused by Alu-Alu recombination*. Cell 1987; 51: 417-425.
- Rozen S, Skaletsky H, Marszalek JD, Minx PJ, Cordum HS, et coll. *Abundant gene conversion between arms of palindromes in human and ape Y chromosomes*. Nature 2003; 423: 873-876.
- Sahid M, Dhillon VS, Hussain Z, Masa JF, Aslam M, et coll. *Analysis of the SRY gene in two sex-reversed XY sisters identifies two new novel point mutations in the high mobility group box domain*. Fertil Steril 2008; 90:1199.e1-8.
- Sahin FI, Ergün MA, Tan E, Menevse A. *The mechanism of G-banding detected by atomic force microscopy*. Scanning 1999; 22: 24-27.
- Saito T, Parsia S, Papolos DF, Lachman HM. *Analysis of the pseudoautosomal X-linked gene SYBL1 in bipolar affective disorder: Description of a new candidate allele for psychiatric disorders*. Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet) 2000; 96: 317-323.
- Sanlaville D, Vialard F, Thepot F, Vue-Droy L, Ardalan A, et coll. *Functional disomy of Xp including duplication of DAX1 gene with sex reversal due to t(X;Y)(p21.2;p11.3)*. Am J Med Genet Part A 2004; 128A: 325-330.
- Santos FR, Pandya A, Tyler-Smith C. *Reliability of DNA-based sex tests*. Nature 1998; 18: 103.
- Sarafoglou K, Ostrer H. *Familial sex reversal: A review*. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85: 483-493.
- Sargent CA, Briggs H, Chalmers IJ, Lambson B, Walker E, et coll. *The sequence organization of Yp/proximal Xq homologous regions of the human sex chromosomes is highly conserved*. Genomics 1996; 32: 200-209.
- Schell-Apacik CC, Wagner K, Bihler M, Ertl-Wagner B, Heinrich U, et coll. *Agenesis and dysgenesis of the corpus callosum: Clinical, genetic and neuroimaging findings in a series of 41 patients*. Am J Med Genet Part A 2008; 146A: 2501-2511.

- Schepers G, Wilson M, Wilhelm D, Koopman P. *SOX8 is expressed during testis differentiation in mice and synergizes with SF1 to activate the Amh promoter in vitro*. J Biol Chem 2003; 278: 28101-28108.
- Scherer G, Held M, Erdel M, Meschede D, Horst J, et coll. *Three novel SRY mutations in XY gonadal dysgenesis and the enigma of XY gonadal dysgenesis cases without SRY mutations*. Cytogenet Cell Genet 1998; 80: 188-192.
- Scherer G, Schempp W, Baccichetti C, Lenzini E, Bricarelli FD, et coll. *Duplication of an Xp segment that includes the ZFX locus causes sex inversion in man*. Hum Genet 1989; 81: 291-294.
- Schiebel K, Winkelmann M, Mertz A, Xu X, Page DC, et coll. *Abnormal XY interchange between a novel isolated protein kinase gene, PRKY, and its homologue, PRKX, accounts for one third of all (Y+)XX males and (Y-)XY females*. Hum Mol Genet 1997; 6: 1985-1989.
- Schiff JD, Luna M, Evans MI, Pater Z, Berry PK, et coll. *Sex chromosome micromosaicism in infertile men with normal karyotypes*. Fertil Steril 2010; 93: 1903-1906.
- Schinzel A. *Incomplete trisomy 22. II. Familial trisomy of the distal segment of chromosome 22q in two brothers from a mother with a translocation, t(6;22)(q27;q13)*. Hum Genet 1981; 56: 263-268.
- Schinzel A, Schmid W, Auf der Maur P, Moser H, Degenhardt KH, et coll. *Incomplete trisomy 22. I. Familial 11/22 translocation with 3:1 meiotic disjunction. Delineation of a common clinical picture and report of nine new cases from six families*. Hum Genet 1981; 56: 249-262.
- Schlaubitz S, Yatsenko SA, Smith LD, Keller KL, Vissers LE, et coll. *Ovotestes and XY sex reversal in a female with an interstitial 9q33.3-q34.1 deletion encompassing NR5A1 and LMX1B causing features of genitopatellar syndrome*. 2007; 143A: 1071-1081.
- Schmitt-Ney M, Thiele H, Kaltwaber P, Bardoni B, Cisternino M, et coll. *Two novel SRY missense mutations reducing DNA binding identified in XY females and their mosaic fathers*. Am J Hum Genet 1995; 56: 862-869.

- Schnieders F, Dork T, Arnemann J, Vogel T, Werner M, et coll. *Testis-specific protein, Y-encoded (TSPY) expression in testicular tissues*. Hum Mol Genet 1996; 5: 1801–1807.
- Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. *Larsen's Human embryology, 4th edition*. Londres, Royaume-Uni: Churchill Livingstone Elsevier, 2009.
- Schubert R, Eggermann T, Hofstaetter C, von Netzer B, Knopfle G, et coll. *Clinical, cytogenetic, and molecular findings in 45,X/47,XX,+18 mosaicism: Clinical report and review of the literature*. Am J Med Genet 2002; 110: 278-282.
- Schwartz A, Chan DC, Brown LG, Alagappan R, Pettay D, et coll. *Reconstructing hominid Y evolution: X-homologous block, created by X-Y transposition, was disrupted by Yp inversion through LINE-LINE recombination*. Hum Mol Genet 1998; 7: 1-11.
- Schwartz S, Depinet TW, Leana-Cox J, Isada NB, Karson EM, et coll. *Sex chromosome markers: Characterization using fluorescence in situ hybridization and review of the literature*. Am J Med Genet 1997; 71: 1-7.
- Scott SA, Cohen N, Brandt T, Toruner G, Desnick RJ, et coll. *Detection of low-level mosaicism and placental mosaicism by oligonucleotide array comparative genomic hybridization*. Genet Med 2010; 12: 85-92.
- Scully RE. *Gonadoblastoma: A gonadal tumor related to the dysgerminoma (seminoma) and capable of sex-hormone production*. Cancer 1953; 6: 445-463.
- Scully RE. *Gonadoblastoma: A review of 74 cases*. Cancer 1970; 25: 1340–1356.
- Scully RE, Young RH, Clement PB. *Tumors of the ovary, maldeveloped gonads, Fallopian tubes, and broad ligament*. Dans: Rosai J, Sobin LH, eds. *Atlas of tumor pathology*. Washington, États-Unis: Armed Forces Institute of Pathology, under the Auspices of Universities Associated for Research and Education in Pathology, Inc., 1998a; 307-312.
- Scully RE, Young RH, Clement PB. *Tumors and tumor-like lesions associated with abnormal sexual development*. Dans: Rosai J, Sobin LH, eds. *Atlas of tumor pathology*. Washington, États-Unis: Armed Forces Institute of Pathology, under the Auspices of Universities Associated for Research and Education in Pathology, Inc., 1998b: 399-408.

- Scully RE, Young RH, Clement PB. *Tumor-like lesions*. Dans: Rosai J, Sobin LH, eds. *Atlas of tumor pathology*. Washington, États-Unis: Armed Forces Institute of Pathology, under the Auspices of Universities Associated for Research and Education in Pathology, Inc., 1998c: 409-450.
- Seabright M. *A rapid banding technique for human chromosomes*. *Lancet* 1971; 2: 971-972.
- Seeherunvong T, Perera EM, Bao Y, Benke PJ, Benigno A, et coll. *46,XX sex reversal with partial duplication of chromosome arm 22q*. *Am J Med Genet Part A* 2004; 127A: 149-151.
- Sekido R, Lovell-Badge R. *Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer*. *Nature* 2008; 453: 930-934.
- Seraj IM, Chase DR, Chase RL, King A, Jacokes A. *Malignant teratoma arising in a dysgenetic gonad*. *Gynecol Oncol* 1993; 50: 254-258.
- Shapiro LR, Pettersen RO, Wilmot PL, Warburton D, Benn PA, et coll. *Pericentric inversion of the Y chromosome and prenatal diagnosis*. *Prenat Diagn* 1984; 4: 463-466.
- Sharp A, Kusz K, Jaruzelska J, Szarras-Czapnik M, Wolski J, et coll. *Familial X/Y translocation associated with variable sexual phenotype*. *J Med Genet* 2004; 41: 440-444.
- Sharp A, Kusz K, Jaruzelska J, Tapper W, Szarras-Czapnik M, et coll. *Variability of sexual phenotype in 46,XX(SRY+) patients: The influence of spreading X inactivation versus position effect*. *J Med Genet* 2005; 42: 420-427.
- Sharp A, Robinson DO, Jacobs P. *Absence of correlation between late-replication and spreading of X inactivation in an X;autosome translocation*. *Hum Genet* 2001; 109: 295-302.
- Sharp AJ, Spotswood HT, Robinson DO, Turner BM, Jacobs PA. *Molecular and cytogenetic analysis of the spreading of X inactivation in X;autosome translocations*. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 3145-3156.
- Shaw CJ, Lupski JR. *Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: The genomic basis of disease*. *Hum Mol Genet* 2004; 13 (Spec 1): R57-64.

- Shizuya H, Birren B, Kim U-J, Mancino V, Slepak T, et coll. *Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in Escherichia coli using an F-factor-based vector*. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 8794-8797.
- Siffroi JP, Le Bourhis C, Krausz C, Barbaux S, Quintana-Murci L, et coll. *Sex chromosome mosaicism in males carrying Y chromosome long arm deletions*. Hum Reprod 2000; 15: 2559-2569.
- Sigurdardottir S, Goodman BK, Rutberg J, Thomas GH, Jabs EW, et coll. *Clinical, cytogenetic, and fluorescence in situ hybridization findings in two cases of 'complete ring' syndrome*. Am J Med Genet 1999; 87: 384-390.
- Sim H, Argentaro A, Harley VR. *Boys, girls and shuttling of SRY and SOX9*. Trends Endocrinol Metab 2008; 19: 213-222.
- Sivak LE, Esbenshade J, Brothman AR, Issa B, Lemons RS, et coll. *Multiple congenital anomalies in a man with (X;6) translocation*. Am J Med Genet 1994; 51: 9-12.
- Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, et coll. *The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes*. Nature 2003; 423: 825-837.
- Sloan MS, Rosenberg SM, Brown JA. *Primary amenorrhea and virilization in a true hermaphrodite with a rare dicentric Y chromosome*. Obstet Gynecol 1984; 64: 64S-67S.
- Smyk M, Berg JS, Pursley A, Curtis FK, Fernandez BA, et coll. *Male-to-female sex reversal associated with an ~250 kb deletion upstream of NROB1 (DAX1)*. Hum Genet 2007; 122: 63-70.
- Sock E, Schmidt K, Hermanns-Borgmeyer I, Bösl MR, Wegner M. *Idiopathic weight reduction in mice deficient in the high-mobility-group transcription factor Sox8*. Mol Cell Biol 2001; 21: 6951-6959.
- Song Y, Chen Q, Zhang Z, Hou H, Zhang D, et coll. *Effects of age on segregation of the X and Y chromosomes in cultured lymphocytes from Chinese men*. J Genet Genomics 2009; 36: 467-474.
- Speevak MD, Smart C, Unwin L, Bell M, Farrell SA. *Molecular characterization of an inherited ring (19) demonstrating ring opening*. Am J Med Genet Part A 2003; 121A: 141-145.

- Speicher MR, Carter NP. *The new cytogenetic : Blurring the boundaries with molecular biology*. Nat Rev Genet 2005; 6: 782-792.
- Stadler S, Schnapp V, Mayer R, Stein S, Cremer C, et coll. *The architecture of chicken chromosome territories changes during differentiation*. BMC Cell Biol 2004; 5:44 disponible au www.biomedcentral.com/1471-2121/5/44
- Stankiewicz P, Hélias-Rodzewicz Z, Jakubów-Durska K, Bocian E, Obersztyn E, et coll. *Cytogenetic and molecular characterization of two isodicentric Y chromosomes*. Am J Med Genet 2001; 101: 20–25.
- Stone JF, Sandberg AA. *Sex chromosome aneuploidy and aging*. Mutation Res 1995; 338: 107-113.
- Sugimoto M, Abe K. *X chromosome reactivation initiates in nascent primordial germ cells in mice*. PLoS Genetics 2007; 3:e116 disponible au www.plosgenetics.org/article/info:doi/10.1371/journal.pgen.0030116
- Sullivan BA, Willard HF. *Stable dicentric X chromosomes with two functional centromeres*. Nat Genet 1998; 20:227-228.
- Sultana R, Myerson D, Distèche CM. *In situ hybridization analysis of the Y chromosome in gonadoblastoma*. Genes Chromosomes Cancer 1995; 13: 257-262.
- Summersgill B, Goker H, Weber-Hall S, Huddart R, Horwich A, et coll. *Molecular cytogenetic analysis of adult testicular germ cell tumours and identification of regions of consensus copy number change*. Br J Cancer 1998; 77: 305-313.
- Sumner AT. *A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin*. Exp Cell Res 1972; 75: 304-306.
- Sun C, Skaletsky H, Rozen S, Gromoll J, Nieschlag E, Oates R, et coll. *Deletion of azoospermia factor a (AZFa) region of human Y chromosome caused by recombination between HERV15 proviruses*. Hum Mol Genet 2000; 9: 2291-2296.
- Swain A, Narvaez V, Burgoyne P, Camerino G, Lovell-Badge R. *Dax1 antagonizes Sry action mammalian sex determination*. Nature 1998; 391: 761-767.
- Sybert VP, McCauley E. *Turner's syndrome*. N Engl J Med 2004; 351: 1227-1238.
- Takada S, Koopman P. *Origin and possible roles of the SOX8 transcription factor gene during sexual development*. Cytogenet Genome Res 2003; 101: 212-218.

- Takano T, Yamanouchi Y, Tanaka F. *True hermaphroditism with 46,X,+22p/46,XY and gonadal mosaicism detected by fluorescence in situ hybridization*. *Ann Genet* 2003; 46: 57-60.
- Talerman A, Schwartz P. *Mixed germ cell-sex cord-stromal tumours*. Dans: Tavassoli FA, Devilee P, eds. *World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of the breast and female genital organs*. Lyon, France: IARC Press, 2003; 176-179.
- Taylor CR, Shi S-R. *Practical issues: Fixation, processing and antigen retrieval*. Dans: Taylor CR, Cote RJ, eds. *Immunomicroscopy: A diagnostic tool for the surgical pathologist, 3rd edition*. Philadelphie, États-Unis: Saunders Elsevier, 2006; 47-74.
- Telvi L, Ion A, Carel J-C, Desguerre I, Piraud M, et coll. *A duplication of distal Xp associated with hypogonadotrophic hypogonadism, hypoplastic external genitalia, mental retardation, and multiple congenital abnormalities*. *J Med Genet* 1996; 33: 767-771.
- Temel SG, Gulden T, Yakut T, Saglam H, Kilic N, et coll. *Extended pedigree with multiple cases of XX sex reversal in the absence of SRY and of a mutation at the SOX9 locus*. *Sex Dev* 2007; 1: 24-34.
- Therman E, Trunca C, Kuhn EM, Sarto GE. *Dicentric chromosomes and the inactivation of the centromere*. *Hum Genet* 1986; 72: 191-195.
- Thomas NS, Hassold TJ. *Aberrant recombination and the origin of Klinefelter syndrome*. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 309-317.
- Tilford CA, Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Rozen S, Brown LG, et coll. *A physical map of the human Y chromosome*. *Nature* 2001; 409: 943-945.
- Tinkle BT, Walker ME, Blough-Pfau RI, Saal HM, Hopkin RJ. *Unexpected survival in a case of prenatally diagnosed nonmosaic trisomy 22: Clinical report and review of the natural history*. *Am J Med Genet Part A* 2003; 118A: 90-95.
- Tjio JH, Levan A. *The chromosome number in man*. *Hereditas* 1956; 42: 1-6.
- Tomascik-Cheeseman L, Marchetti F, Lowe X, Shamanski FL, Nath J, et coll. *CENP-B is not critical for meiotic chromosome segregation in male mice*. *Mutat Res* 2002; 513: 197-203.

- Tomaselli S, Megiorni F, De Bernardo C, Felici A, Marrocco G, et coll. *Syndromic true hermaphroditism due to an R-spondin1 (RSPO1) homozygous mutation*. Hum Mutat 2008; 29: 220-226.
- Tomizuka K, Horikoshi K, Kitada R, Sugawara Y, Iba Y, et coll. *R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating Wnt-4 signaling*. Hum Mol Genet 2008; 17: 1278-1291.
- Torre R, Savino A, Venturi P, Taverna R, Triacca R, et coll. *Genotypic sex and phenotypic sex: Clinical, biochemical and molecular aspects in a patient with male hypogonadism and 46XX-45,XO karyotype*. Recent Prog Med 2001; 92: 747-750.
- Tremblay JJ, Viger RS. *Nuclear receptor Dax-1 represses the transcriptional cooperation between GATA-4 and SF-1 in Sertoli cells*. Biol Reprod 2001; 64: 1191-1199.
- Tsuchiya K, Reijo R, Page DC, Distèche CM. *Gonadoblastoma: Molecular definition of the susceptibility region on the Y chromosome*. Am J Hum Genet 1995; 57: 1400-1407.
- Tucker JD, Nath J, Hando JC. *Activation status of the X chromosome in human micronucleated lymphocytes*. Hum Genet 1996; 97: 471-475.
- Tuck-Muller CM, Chen H, Martínez JE, Shen C-C, Li S, et coll. *Isodicentric Y chromosome: Cytogenetic, molecular and clinical studies and review of the literature*. Hum Genet 1995; 96: 119-129.
- Turner JAM. *Meiotic sex chromosome inactivation*. Development 2007; 134: 1823-1831.
- Tyler-Smith C, Brown WR. *Structure of the major block of alphoid satellite DNA on the human Y chromosome*. J Mol Biol 1987; 195: 457-470.
- Tyler-Smith C, Taylor L, Müller U. *Structure of a hypervariable tandemly repeated DNA sequence on the short arm of the human Y chromosome*. J Mol Biol 1988; 203: 837-848.
- Tyshchenko N, Lurie I, Schinzel A. *Chromosomal map of human brain malformations*. Hum Genet 2008; 124: 73-80.
- Tzschach A, Chen W, Erdogan F, Hoeller A, Ropers H-H, et coll. *Characterization of interstitial Xp duplications in two families by tiling path array CGH*. Am J Med Genet Part A 2008; 146A: 197-203.

- Udler Y, Kauschansky A, Yeshaya J, Freedman J, Barkai U, et coll. *Phenotypic expression of tissue mosaicism in a 45,X/46,X,dicY(q11.2) female*. Am J Med Genet 2001; 102: 318–323.
- Umehara F, Tate G, Itoh K, Yamaguchi N, Douchi T, et coll. *A novel mutation of desert hedgehog in a patient with 46,XY partial gonadal dysgenesis accompanied by minifascicular neuropathy*. Am J Hum Genet 2000; 67: 1302-1305.
- Vacca M, Matarazzo MR, Jones J, Spalluto C, Archidiacono N, et coll. *Evolution of the X-specific block embedded in the human Xq21.3/Yp11.1 homology region*. Genomics 1999; 62: 293-296.
- Vagnarelli P, Ribeiro SA, Earnshaw WC. *Centromeres: Old tales and new tools*. FEBS Letters 2008; 582: 1950-1959.
- van de Geijn G-JM, Hersmus R, Looijenga LHJ. *Recent development in testicular germ cell tumor research*. Birth Defects Res Part C Embryo Today 2009; 87: 96-113.
- van den Berg IM, Laven JSE, Stevens M, Jonkers I, Galjaard R-J, et coll. *X chromosome inactivation is initiated in human preimplantation embryos*. Am J Hum Genet 2009; 84: 771-779.
- van Echten J, Oosterhuis JW, Looijenga LHJ, van de Pol M, Wiersema J, te Meerman GJ, et coll. *No recurrent structural abnormalities apart from i(12p) in primary germ cell tumors of the adult testis*. Genes Chromosomes Cancer 1995; 14: 133-144.
- van Langen IM, Otter MA, Aronson DC, Overweg-Plandsoen WC, Hennekam RC, et coll. *Supernumerary ring chromosome 20 characterized by fluorescence in situ hybridization*. Clin Genet 1996; 49: 49-53.
- Varley H, Di S, Scherer SW, Royle NJ. *Characterization of terminal deletions at 7q32 and 22q13.3 healed by de novo telomere addition*. Am J Hum Genet 2000; 67: 610-622.
- Varley H, Pickett HA, Foxon JL, Reddel RR, Royle NJ. *Molecular characterization of inter-telomere and intra-telomere mutations in human ALT cells*. Nat Genet 2002; 30: 301-305.
- Vasquez AI, Rivera H, Mayorquin A, Mejia-Baltodano G, Escalante A, et coll. *Sex reversal due to Xp disomy by t(X;Y)(p21;q11)*. Genet Couns 1999; 10: 301-304.

- Veitia R, Nunes M, Brauner R, Doco-Fenzy M, Joanny-Flinois O, et coll. *Deletions of distal 9p associated with 46,XY male to female sex reversal: Definition of the breakpoints at 9p23.3-p24.1*. Genomics 1997; 41: 271-274.
- Velagaleti GV, Bien-Willner GA, Northup JK, Lockhart LH, Hawkins JC, et coll. *Position effects due to chromosome breakpoints that map approximately 900 Kb upstream and approximately 1.3 Mb downstream of SOX9 in two patients with campomelic dysplasia*. Am J Hum Genet 2005; 76: 652-662.
- Verma RS, Babu A. *Human chromosomes: Manual of basic techniques*. New York, États-Unis: Pergamon Press, 1989.
- Verma RS, Rodriguez J, Dosik H. *The clinical significance of a pericentric inversion of the human Y chromosome : A rare 'third' type of heteromorphism*. J Hered 1982; 73: 236-238.
- Vermeesch JR, Petit P, Speleman F, Devriendt K, Fryns JP, et coll. *Interstitial telomeric sequences at the junction site of a jumping translocation*. Hum Genet 1997; 99: 735-737.
- Verp M, Simpson J. *Abnormal sexual differentiation and neoplasia*. Cancer Genet Cytogenet 1987; 25: 191-218.
- Veyrunes F, Waters PD, Miethke P, Rens W, McMillan D, et coll. *Bird-like sex chromosomes of platypus imply recent origin of mammal sex chromosomes*. Genome Res 2008; 18: 965-973.
- Vidal VP, Chaboissier MC, de Rooij DG, Schedl A. *Sox9 induces testis development in XX transgenic mice*. Nat Genet 2001; 28: 216-217.
- Vilain E, McElreavey K, Jaubert F, Raymond J-P, Richaud F, et coll. *Familial case with sequence variant in the testis-determining region associated with two sex phenotypes*. Am J Hum Genet 1992; 50: 1008-1011.
- Vogel T, Schmidtk J. *Structure and function of TSPY, the Y-chromosome gene coding for the 'testis-specific protein'*. Cytogenet Cell Genet 1998; 80: 209-213.
- Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, et coll. *Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11*. Hum Mol Genet 1996; 5: 933-943.

- Vogt PH, Falcao CL, Hanstein R, Zimmer J. *The AZF proteins*. Int J Androl 2008; 31: 383-394.
- Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, et coll. *Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9*. Cell 1994; 79: 1111-1120.
- Wahlström J, Kyllerman M, Hansson A, Taranger J. *Unequal mitotic sister chromatid exchange and different length of Y chromosomes*. Hum Genet 1985; 70: 186-188.
- Wang I, Weil D, Levilliers J, Affara NA, de la Chapelle, et coll. *Prevalence and molecular analysis of two hot spots for ectopic recombination leading to XX maleness*. Genomics 1995; 28: 52-58.
- Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ Jr, Falcone T, et coll. *Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility*. Fertil Steril 2003; 80: 531-535.
- Weil D, Wang I, Dietrich A, Poutska A, Weissenbach J, et coll. *Highly homologous loci on the X and Y chromosomes are hot-spots for ectopic recombination leading to XX maleness*. Nat Genet 1994; 7: 414-419.
- White WM, Willard HF, Van Dyke DL, Wolff DJ. *The spreading of X inactivation into autosomal material of an X;autosome translocation: Evidence for a difference between autosomal and X-chromosomal DNA*. Am J Hum Genet 1998; 63: 20-28.
- Wiersma R, Ramdial PK. *The gonads of 111 South African patients with ovotesticular disorder of sex differentiation*. J Ped Surg 2009; 44: 556-560.
- Wilhelm D, Martinson F, Bradford S, Wilson M, Combes AN, et coll. *Sertoli cell differentiation is induced both cell-autonomously and through prostaglandin signaling during mammalian sex determination*. Dev Biol 2005; 287: 111-124.
- Wilhelm D, Palmer S, Koopman P. *Sex determination and gonadal development in mammals*. Physiol Rev 2007; 87: 1-28.
- Wilkie AO, Lamb J, Harris PC, Finney RD, Higgs DR. *A truncated human chromosome 16 associated with alpha thalassaemia is stabilized by addition of telomeric repeat (TTAGGG)_n*. Nature 1990; 346: 868-871.
- Willard HF. *Tales of the Y chromosome*. Nature 2003; 423: 810-813.

- Willard HF, Latt SA. *Analysis of deoxyribonucleic acid replication in human X chromosomes by fluorescence microscopy*. Am J Hum Genet 1976; 28: 213-227.
- Williams ES, Klingler R, Ponnaiya B, Hardt T, Schrock E, et coll. *Telomere dysfunction and DNA-PKcs deficiency: Characterization and consequence*. Cancer Res 2009; 69: 2100-2107.
- Willis MJH, Bird LM, Dell'Aquila M, Jones MC. *Natural history of prenatally diagnosed 46,X,isodicentric Y*. Prenat Diagn 2006; 26: 134-137.
- Wojda A, Zietkiewicz E, Witt M. *Effects of age and gender on micronucleus and chromosome nondisjunction frequencies in centenarians and younger subjects*. Mutagenesis 2007; 22: 195-200.
- Wolfe J, Darling SM, Erickson RP, Craig IW, Bucke VJ, et coll. *Isolation and characterization of an alphoid centromeric repeat family from the human Y chromosome*. J Mol Biol 1985; 182: 477-485.
- Wu H-H, Lee T-H, Chen C-D, Yeh K-T, Chen M. *Delineation of an isodicentric Y chromosome in a mosaic 45,X/46,X,idic(Y)(qter-p11.3::p11.3-qter) fetus by SRY sequencing, G-banding, FISH, SKY and study of distribution in different tissues*. J Formos Med Assoc 2007; 106: 403-410.
- Xu N, Tsai C-L, Lee JT. *Transient homologous chromosome pairing marks the onset of X inactivation*. Science 2006; 311: 1149-1152.
- Yamakita N, Yasuda K, Mori H, Kuriyama M, Kumamoto Y, et coll. *A case of mixed gonadal dysgenesis (MGD) - with a review of MGD patients reported in Japan*. Jpn J Med 1989; 28: 744-752.
- Yang Y, Ma MY, Xiao CY, Li L, Li SW, et coll. *Massive deletion in AZFb/b+c and azoospermia with Sertoli cell only and/or maturation arrest*. Int J Androl 2007; 31: 573-578.
- Yatsenko SA, Shaw CA, Ou Z, Pursley AN, Patel A, et coll. *Microarray-based comparative genomic hybridization using sex-matched reference DNA provides greater sensitivity for detection of sex chromosome imbalances than array-comparative genomic hybridization with sex-mismatched reference DNA*. J Mol Diagn 2009; 11: 226-237.

- Yen PH, Tsai S-P, Wenger SL, Steel MW, Mohandas T, et coll. *X/Y translocations resulting from recombination between homologous sequences on Xp and Yq*. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 8944-8948.
- Ying KL, Ives EJ. *Mitotic behavior of a human dicentric Y chromosome*. Cytogenetics 1971; 10: 208-218.
- Yong RYY, Gan LSH, Chang YM, Yap EPH. *Molecular characterization of a polymorphic 3-Mb deletion at chromosome Yp11.2 containing the AMELY locus in Singapore and Malaysia populations*. Hum Genet 2007; 122: 237-249.
- Zäh W, Kalderon AE, Tucci JR. *Mixed gonadal dysgenesis: A case report and review of the world literature*. Acta Endocrinol Suppl (Copenh) 1975; 197: 1-39.
- Zahed L, Oreibi G, Azar C, Salti I. *Ring chromosome 18q and jumping translocation 18p in an adult male with hypergonadotrophic hypogonadism*. Am J Med Genet Part A 2004; 129A: 25-28.
- Zahir F, Friedman JM. *The impact of array genomic hybridization on mental retardation research: A review of current technologies and their clinical utility*. Clin Genet 2007; 72: 271-287.
- Zenteno-Ruiz JC, Kofman-Alfaro S, Méndez JP. *46,XX sex reversal*. Arch Med Res 2001; 32: 559-566.
- Zeuthen E, Nielsen J. *Pericentric Y inversion in the general population*. Humangenetik 1973; 19: 265-270.
- Zou YS, Van Dyke DL, Thorland EC, Chhabra HS, Michels VV, et coll. *Mosaic ring 20 with no detectable deletion by FISH analysis: Characteristic seizure disorder and literature review*. Am J Med Genet Part A 2006; 140A: 1696-1706.

Annexes

Article - *Cytogenetic and Genome Research* 2009; 125: 176-185.

**Frequency of chromosome healing and interstitial telomeres in
40 cases of constitutional abnormalities.**

Fléchère Fortin ^{a-c}, Mélanie Beaulieu Bergeron ^{a-c}, Raouf Fetni ^{a,b}, and Nicole
Lemieux ^{a-c}

^a Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal

^b Département de pathologie et ^c Centre de Recherche, Centre Hospitalier Universitaire
Sainte-Justine, Montréal, Qué., Canada

F.F. and M.B.B. contributed equally to this work.

Corresponding author: Nicole Lemieux, Ph.D.
Université de Montréal
Département de pathologie et biologie cellulaire

Accepted after revision: May 25, 2009 by M. Schmid

Abstract

Human telomeres play a major role in stabilizing chromosome ends and preventing fusions. Chromosomes bearing a broken end are rescued by the acquisition of a new telomeric cap without any subtelomeric sequences being present at the breakpoint, a process referred to as chromosome healing. Conversely, a loss of telomeric function or integrity can lead to the presence of interstitial telomeres at the junction site in translocations or ring chromosomes. In order to determine the frequency at which interstitial telomeres or chromosome healing events are observed in target chromosome abnormalities, we conducted a retrospective FISH study using pan-telomeric and chromosome-specific subtelomeric probes on archival material from 40 cases of terminal deletions, translocations or ring chromosomes. Of the 19 terminal deletions investigated, 17 were negative for the subtelomeric probe specific to the deleted arm despite being positive for the pan-telomeric probe. These 17 cases were thus considered as having been rescued through chromosome healing, suggesting that this process is frequent in terminal deletions. In addition, as 2 of these cases were inherited from a parent bearing the same deletion, chromosomes healed by this process are thus stable through mitosis and meiosis. Regarding the 13 cases of translocations and 8 ring chromosomes, 4 and 2 cases respectively demonstrated pan-telomeric sequences at the interstitial junction point. Furthermore, 2 cases of translocations and one ring chromosome had both interstitial pan-telomeres and subtelomeres, whereas 2 other cases of ring chromosomes and one case of translocation only showed interstitial subtelomeres. Therefore, interstitial (sub)telomeric sequences in translocations and ring chromosomes are more common than previously thought, as we found a frequency of 43% in this study. Moreover, our results illustrate the necessity of performing FISH with both subtelomeric and pan-telomeric probes when investigating these rearrangements, as the breakpoints can be either in the distal part of the pan-telomeres, or in between the 2 types of sequences.

Key Words Chromosome healing • FISH • Interstitial telomeres • Ring chromosomes • Subtelomeres • Terminal deletions • Translocations

Introduction

Human telomeres are specialized chromatin structures present at chromosome ends. They consist of (TTAGGG)_n DNA repeat sequences [Moyzis et al., 1988], are highly conserved among vertebrates [Meyne et al., 1989], and contain proteins forming a protective ‘t-loop’ structure capping the chromosome ends [Griffith et al., 1999]. Telomeres are essential for chromosomes, as they prevent degradation or fusion, and enable the cell to distinguish intact chromosome ends from damaged DNA [Hackett et al., 2001]. Furthermore, this structure is necessary for the complete replication of chromosome ends with the help of telomerase, a specialized cellular reverse transcriptase enzyme [Morin, 1989]. In humans, telomerase activity is developmentally regulated and is found in the placenta, liver, hematopoietic and germline cells [Melek and Shippen, 1996] as well as in most tumors [de Lange, 1995].

Broken chromosomes without telomeres will enter in a breakage-fusion-bridge (BFB) cycle if no healing occurs. This cycle will cause chromosomal instability that can induce formation of dicentric, ring or fusion chromosomes [Hackett et al., 2001] and could lead to terminal inverted duplications [Ballif et al., 2003]. Healing of broken ends can occur through 2 general pathways, ensuring the acquisition of a new telomeric cap and stabilizing the deleted chromosome. First, direct addition of telomeric sequences onto the broken end can be achieved through a telomerase-mediated *de novo* telomere addition [Wilkie et al., 1990; Flint et al., 1994; Varley et al., 2000] or a telomerase-independent recombination-based mechanism [Neumann and Reddel, 2002; Varley et al., 2002]. Second, telomeres can also be retrieved from another location through a mechanism called telomere capture, in which subtelomeres and/or pan-telomeres from another chromosome are translocated at the broken end of the deleted chromosome [Meltzer et al., 1993; Bosco and Haber, 1998; Ning et al., 1998]. Although very similar to unbalanced subtelomeric translocations, telomere capture would occur only *de novo*, while unbalanced cryptic translocations would be inherited from a parent carrying a balanced translocation.

On the other hand, some constitutional anomalies are generated when telomeres lose their ability to prevent fusion. For example, although interstitial telomeric sequences can be detected in normal conditions, as indicated by the major telomeric repeat array found at 2q13 [Ijdo et al., 1991], most interstitial telomeres occur at the fusion point in telomeric translocations, jumping translocations or ring chromosomes (reviewed in tables 1 and 2).

In order to further study the frequency of chromosome healing and interstitial telomeres in human constitutional abnormalities, we conducted a retrospective study on cases taken from the 1991-2006 archives of a pediatric hospital, the Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Sainte-Justine.

Materials and methods

Cytogenetics

Searching for chromosome rearrangements possibly containing interstitial telomeres or rescued by telomere healing, we reviewed all cases of deletions, translocations and ring chromosomes seen at CHU Sainte-Justine between 1991 and 2006. We selected all deletion cases where a terminal deletion was apparent as well as all translocation and ring cases in which at least one breakpoint involved the terminal band, as evaluated at the karyotype with a minimal resolution of 500 bands. Therefore, a retrospective study was conducted on 40 cases: 19 terminal deletions, 13 translocations involving a terminal band and 8 ring chromosomes (table 3). Chromosome preparations and GTG-banding were done according to the previously described method [Lemieux et al., 1990]. All but 4 cases were *de novo* abnormalities with normal parental karyotypes: cases 12 and 13 were inherited from the same mother, while cases 28 and 29 were inherited from a father and mother respectively. Parental rearrangements were not included in this study. Four cases from this cohort (cases 12, 13, 23, and 40) were previously published elsewhere [Boutouil et al., 1996; DesGroseilliers et al., 2006; Maranda et al., 2006].

Table 1. Karyotype and FISH results for previously reported cases of translocations with interstitial (sub)telomeres

Reference [Case]	Karyotype(s)	Interstitial pan-telomeric signal	Interstitial sub-telomeric signal
Devriendt et al., 1997	46,XX,der(14)t(14;15)(qter;q24)[120]/46,XX,der(4)t(4;15)(qter;q24)[25]/ 46,XX,der(16)t(15;16)(q24;pter)[3]/46,XX[59]	der(4): + der(14): + der(16): nd	nd
Huang et al., 2004 [Proband]	46,X,tas(Y;15)(qter;pter)[39]/45,X[10]/46,XY[1]	+	Yp+
Huang et al., 2004 [Father]	46,X,tas(Y;19)(qter;pter)[63]/45,X[7]	+	Yq+ 19p+
Jewett et al., 1998	46,XX,der(8)t(8;15;15)(qter;q24;q24),der(15)t(7;15)(p22;q24)[51]/ 46,XX,der(8)t(8;15)(qter;q24),der(15)t(7;15)(p22;q24)[49]/ 46,XX,der(12)t(12;15)(qter;q24),der(15)t(7;15)(p22;q24)[7]/ 46,XX,der(6)t(6;15)(pter;q24),der(15)t(7;15)(p22;q24)[5]/ 46,XX,der(8)t(8;15;15;15)(qter;q24;24;24),der(15)t(7;15)(p22;q24)[4]/ 46,XX,der(8)t(8;15)(pter;q24),der(15)t(7;15)(p22;q24)[1]	der(6): + der(8): + der(12): +	nd
Josifova et al., 2006 [Proband]	45,XY,der(8)t(8;15)(pter;q11.2),-15	+	8p+
Josifova et al., 2006 [Father]	45,XY,der(2)t(2;15)(pter;q11.2),-15	+	2p+
Lefort et al., 1997	46,XY,t(1;2)(pter;p12)/46,XY,t(2;12)(p12;qter)/46,XY,t(2;5)(p12;qter)/46,XY,t(2;6)(p12;qter)	+	nd
Mignon-Ravix et al., 2007 [1]	45,XY,der(3)t(3;15)(qter;q14),-15	+	nd
Mignon-Ravix et al., 2007 [4]	45,XX,der(10)t(10;15)(qter;q14),-15	+	nd
Mignon-Ravix et al., 2007 [6]	45,XX,der(13)t(13;15)(pter;q13),-15	+	nd
Mignon-Ravix et al., 2007 [7]	45,XY,der(13)t(13;15)(q34;q15),-15	-	13q+
Park et al., 1992 [1]	45,XX,-15,der(19)t(15;19)(q13;pter),/45,XX,der(8)t(8;15)(pter;q13),-15/ 45,XX,der(1)t(1;15)(qter;q13),-15	der(1): + der(8): + der(19): +	nd
Park et al., 1992 [2]	45,XY,der(5)t(5;15)(qter;q13),-15	+	nd
Park et al., 1992 [3]	46,XX,der(2)t(2;17)(qter;q23)	+	nd
Park et al., 1992 [5-daughter]	46,XX,der(1)t(1;13 or 14 or 21 or 22)(qter;p?11)pat	+	nd
Park et al., 1992 [5-father]	46,XY,der(1)t(1;13 or 14 or 21 or 22)(qter;p?11)	+	nd
Petit et al., 1998	45,XY,der(15)t(13;15)(q12.1;pter),-13/45,XY,der(15)t(13;15)(q12.1;qter),-13	+	nd
Qu et al., 1994	45,X?,der(2)t(2;21)(pter;q21),-21	+	nd
Reddy and Murphy, 2000	46,XY,der(19)t(9;19)(q10;pter),-9,+i(9)(q10)[100]/ 46,XY,der(8)t(8;9)(pter;q10),-9,+i(9)(q10)[4]	der(8): + der(19): +	nd
Reeve et al., 1993	45,XX,der(12)t(12;15)(qter;q13),-15	+	nd
Rivera et al., 1999	46,XX,der(8)t(8;12)(pter;p10),-12,i(12)(p10)	+	nd
Rossi et al., 1993 [1]	46,XX,tas(17;22)(p13;q13)	+	nd
Rossi et al., 1993 [2]	45,XX,der(5)t(5;15)(qter;q13),-15	+	nd
Rossi et al., 1993 [3]	45,XX,-15,der(18)t(15;18)(q13;qter)/45,X,der(X)t(X;15)(qter;q13),-15	der(18): + der(X): +	nd
Rossi et al., 1993 [4]	45,XX,der(12)t(12;15)(qter;q11.1),-15	+	nd
Rossi et al., 1993 [5]	45,XY,der(9)t(9;15)(qter;q11.1),-15	+	nd
Rossi et al., 1993 [6]	45,XX,der(2)t(2;22)(qter;q11.1),-22	+	nd
Rossi et al., 1993 [7]	45,XY,der(5)t(5;13)(qter;q10),-13/46,XY,der(5)t(5;13)(qter;q10),-13,i(13)(q10)	+	nd
Vermeesch et al., 1997	46,XY,der(18)t(4;18)(qter;q23)/46,XY,der(18)t(4;18)(qter;p11)	+	nd
Zahed et al., 2004	46,XY,der(8)t(8;18)(qter;p11.2),r(8)(p11.1q23)[111]/46,XY,r(18)(p11.1p23)[34]/ 46,XY,r(18)(p11.1q23),der(20)t(18;20)(p11.2;qter)[15]	der(8): + der(20): + r(18): -	nd

nd: Not done Karyotypes were revised to follow the guidelines of ISCN (2009)

Table 2. Karyotype and FISH results for previously reported cases of ring chromosomes with interstitial (sub)telomeres

Reference [Case]	Karyotype(s)	Interstitial pan-telomeric signal	Interstitial sub-telomeric signal
Calabrese et al., 1997	46,XY,r(4)(pterq35.2)/45,XY,-4	+	4p+
Canevini et al., 1998 [1]	46,XY,r(20)(pterqter)[105]/46,XY[69]	+	20p+, 20q+
Canevini et al., 1998 [3]	46,XY,r(20)(pterqter)[20]/46,XY[260]	+	20p+, 20q+
Conte et al., 1997	46,XY,r(16)(p13.3qter)/46,XY	+	16q+
Elghezal et al., 2007	46,XX,r(20)(p13q13.3)[14]/46,XX[6]	nd	20p+, 20q+
Flejter et al., 1996	46,XX,r(19)(p13.2q13.4)[119]/46,XX[1]	+	nd
Henegariu et al., 1997	45,X/46,X,dic r(Y)(pterq11q11pter)/ 46,X,tetra r(Y)(pterq11q11pterpterq11q11pter)/ 47,X,tetra r(Y)(pterq11q11pterpterq11q11pter)x2	+	nd
Kosho et al., 2005	46,XX,r(2)(p25.3q37.3)	nd	2p+, 2q+
Le Caignec et al., 2004 [II-1]	46,XX,r(8)(pterqter)[22]/45,XX,-8[2]/ 47,XX,r(8)(pterqter),+r(8)(pterqter)[1]	+	8p+, 8q+
Le Caignec et al., 2004 [III-1]	46,XY,r(8)(pterqter)[24]/45,XY,-8[2]	+	8p+, 8q+
Park et al., 1992 [4]	45,XY,-18/46,XY,der(18)t(9;18)(?p13;p11.3)/ 46,XY,der(18)r(9;18)(?p11?p13;p11.3q23)	r(18): + der(18): nd	nd
Pezzolo et al., 1993 [1]	46,XX,r(4)(p16q35)	+	nd
Pezzolo et al., 1993 [2]	46,XX,r(16)(p13.3q24)	+	nd
Pezzolo et al., 1993 [3]	46,XX,r(20)(p13q13.3)	+	nd
Ricard-Mousnier et al., 2007	46,XY,r(17)(p1?3qter)	+	17p-, 17q+
Sigurdardottir et al., 1999	46,XX,r(4)(pterqter)	+	4p+, 4q+
Sigurdardottir et al., 1999	45,XY,-9[5]/46,XY,r(9)(p24.3q34.3)[45]	-	9p+, 9q+
Speevak et al., 2003	46,XY,r(19)(pterqter)mat	+	19p+, 19q+
van Langen et al., 1996	47,XY,+r(20)(p13q13.3)/46,XY	+	nd
Zou et al., 2006	46,XX,r(20)(pterqter)[42]/46,XX[178]	+	20p+, 20q+

nd: Not done
Karyotypes were revised to follow the guidelines of ISCN (2009)

Karyotypes of all cases were written following the guidelines of ISCN [2009]. The terminal band was used to designate the breakpoint when only interstitial subtelomeres were present, while pter or qter designate the breakpoint when both interstitial subtelomeres and pan-telomeres were present. In cases with interstitial pan-telomeres in which the presence of interstitial subtelomeres could be not assessed, the terminal band was used when the origin of the pan-telomeric signal was unclear, whereas pter or qter was used in the remaining cases.

Fluorescence in situ hybridization (FISH)

The pan-telomeric peptide nucleic acid (PNA) probe [FITC-(C₃TA₂)₃] from DAKO (Mississauga, ON, Canada) recognizing the consensus sequence (TTAGGG)_n of human pan-telomeres was hybridized after minor modifications to the protocol of Vermeesh et al. [1997]. Slides were counterstained with propidium iodide (PI) (Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville, ON, Canada) or DAPI (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada), and bands were visualized as described by Lemieux et al. [1992], or by the reverse DAPI function of the CytoVision software (Applied Imaging, San Jose, CA, USA).

Subtelomeric probes [TelVysion 1p/1q, 2p/2q, 4p/4q, 5p/5q, 7p/7q, 8p/8q, 9p/9q, 11p/11q, 13q, 14q, 16p/16q, 18p/18q, 20p/20q, 21q, Xp/Yp, and Xq/Yq from Vysis (Downers Grove, IL, USA), and 1p and 6p from AL Technologies (Arlington, VA, USA)] were hybridized according to the company's instructions. 30 metaphases were scored for each probe in order to ensure accuracy and reproducibility of results.

Results

Terminal deletions

Of the 19 cases of terminal deletions studied (table 3), all showed a signal for the pan-telomeric probe at the deleted end. Seventeen of them (89%) showed no signal with the arm-specific subtelomeric probe at the deleted arm (as shown for cases 7 and 12; fig. 1A, B). Furthermore, in these 17 cases, the missing subtelomeric signal was not present on any other chromosomes, ruling out a balanced cryptic translocation. As for the 2 remaining cases (4 and 8), the presence of the arm-specific subtelomeric probe at the deleted end (fig. 1C, D) prompted us to reconsider these deletions as interstitial and revise the breakpoints (table 3).

Translocations and ring chromosomes

Of the 13 translocations investigated with the pan-telomeric probe (table 3), 4 (31%) showed interstitial pan-telomeric sequences at the fusion point (cases 20, 21, 22, and 23; fig. 1E, H, I, K). Also, the presence of subtelomeres could be assessed at the junction point in cases 20 and 22 (fig. 1G, I), while the unbalanced nature of these translocations could be confirmed by the presence of 3 signals of the 7q subtelomere in case 20 (fig. 1F) and of the 14q subtelomere in case 22 (fig. 1J). As for case 32, a balanced t(X;1), no interstitial pan-telomeres were detected by PNA-FISH (fig. 1L), despite the fact that PNA-FISH probes allow detection of shorter pan-telomeric sequences than DNA-FISH probes [Bolzan and Bianchi, 2006]. A signal for the 1p subtelomere was present at the junction point on the der(1) as well as at the distal end of the der(X) (fig. 1M), whereas the Xq subtelomere was only found at the distal end of the der(1) (fig. 1N). This suggests that the breakpoint on 1p was within the subtelomeres, whereas the Xq breakpoint was proximal to the subtelomeres. Unfortunately, FISH with subtelomeric probes could not be performed on any other cases because no more archival material was available.

Table 3. Karyotype and FISH results for 40 cases of deletions, translocations and ring chromosomes

Case	Karyotype(s)	Pan-telomeres	Subtelomeres
Deletions			Deleted end
1	46,XX,del(1)(q42.2)	+	1q-
2	46,XY,del(4)(p16.1)	+	4p-
3	46,XY,del(4)(p16.3)	+	4p-
4	46,XX,del(4)(p16.3p16.3)	+	4p+
5	46,XX,del(4)(q34)	+	4q-
6	46,XY,del(5)(p13.2)	+	5p-
7	46,XX,del(5)(p15.2)	+	5p-
8	46,XY,del(6)(p23p25)	+	6p+
9	46,XX,der(8)del(8)(p23.1)inv dup(8)(p21.2p23.1)	+	8p-
10	46,XY,del(11)(q23.3)	+	11q-
11	46,XX,der(16)del(16)(p13.3)inv(16)(p13.2p13.3)	+	16p-
12 ^a	46,XX,del(18)(p11.2)mat	+	18p-
13 ^a	46,XX,del(18)(p11.2)mat	+	18p-
14	46,XX,del(18)(q21.31)	+	18q-
15	46,XY,del(18)(q21.32)[8]/46,XX[31]	+	18q-
16	46,XY,del(18)(p11.21)	+	18p-
17	46,XY,del(21)(q22)	+	21q-
18	46,X,del(X)(p11.22)	+	Xp-
19	46,X,del(X)(q26.2)	+	Xq-
Translocations			Interstitial signal
20	46,XY,der(9)t(7;9)(q32.3;qter)	+	der(9): 9q+
21	45,XY,der(20)t(15;20)(q14;pter)	+	nd
22	46,XY,der(21)t(14;21)(q24;qter)[25]/46,XY[5]	+	der(21): 21q+
23 ^b	45,X,tas(Y;13)(p11.31;p11.2)[62]/46,XY[7]	+	nd
24	46,XX,t(1;7)(q44;q21.1)	-	nd
25	46,XX,t(1;7)(q32.1;q36.1)	-	nd
26	46,XX,t(2;2)(q37.3;p23)	-	nd
27	46,XX,t(2;5)(q21.1;q35.3)	-	der(5): 5q-
28	46,XX,t(4;15)(p16.3;q12)pat	-	nd
29	46,XY,der(5)t(5;9)(p15.31;q21.2)mat	-	der(5): 5p-
30	46,XX,t(7;11)(q11.21;q25)	-	der(11): 11p-
31	46,XX,der(13)t(2;13)(q33;q34)	-	nd
32	46,X,t(X;1)(q22;p36.3)	-	der(1): 1p+
Ring chromosomes			Interstitial signal
33	46,XX,r(4)(p16q35)	+	nd
34	46,XX,r(20)(pterqter)[45]/46,XY[90]	+	20p+, 20q+
35	46,XY,r(5)(p15.31q35.3)[41]/47,XY,r(5)(p15.31q35.3)x2[1]/45,XY,-5[2]/46,XY[1]	-	5p-, 5q+
36	46,XY,r(18)(p11.3q23)	-	nd
37	46,XY,r(13)(p13q34)[100]/46,XY,r(13)(p13q13)[21]/46,XY,dicr(13)(p13q34q34p13)[3]/45,XY,-13[8]	-	13q-
38	46,XX,dicr(21)(p13q22.3q22.3p13)[32]/45,XX,-21[2]	-	21q-
39	46,XX,r(22)(p13q13.3)[85]/47,XX,r(22)(p13q13.3)x2[2]/45,XX,-22[3]/46,XX[17]	-	nd
40 ^c	46,X,dic r(Y)(p11.3q12q12p11.3)[92]/46,X,tetra r(Y)(p11.3q12q12p11.3p11.3q12q12p11.3)[8]/46,X,tetra r(Y)x2[1]/46,X,del dic r(Y)(p11q12)[4]/45,X[158]	-	Yp-, Yq+

nd: could not be performed due to lack of archival material; previously published by ^a Maranda et al. (2006), ^b Boutouil et al. (1996) and ^c DesGroseilliers et al. (2006)

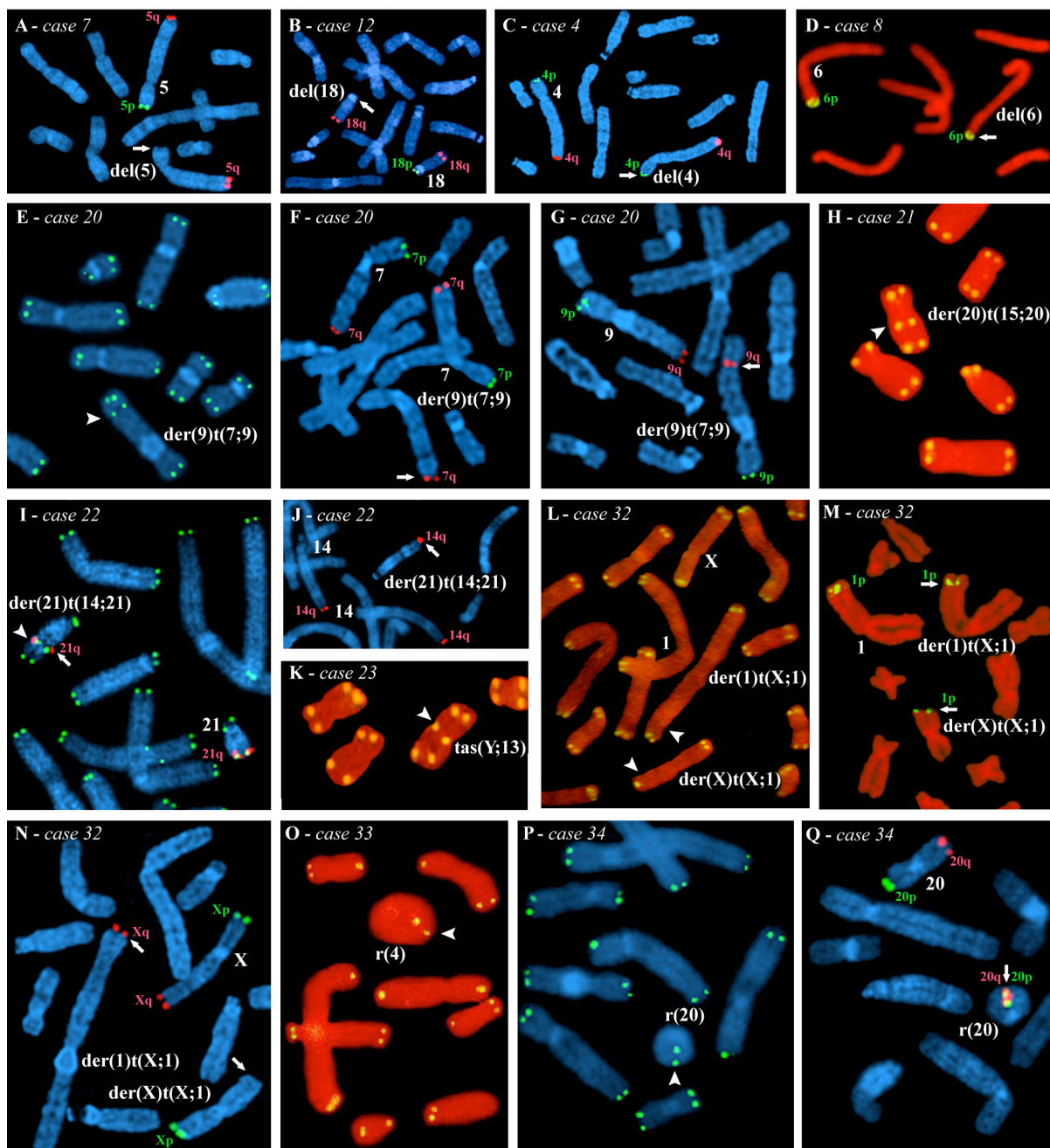


Fig. 1. Partial metaphases showing fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with either pan-telomeric or specific subtelomeric probes. Chromosomes were counterstained with either propidium iodide (red) or DAPI (blue). Arrowheads indicate the presence or absence of an interstitial signal with the pan-telomeric probe on the abnormal chromosomes; arrows show the presence or absence of the subtelomeric signal.

A *Case 7*: absence of the 5p subtelomere on the deleted chromosome 5. **B** *Case 12*: absence of the 18p subtelomere on the deleted chromosome 18. **C** *Case 4*: presence of the 4p subtelomere on the deleted chromosome 4. **D** *Case 8*: presence of the 6p subtelomere on the deleted chromosome 6. *Case 20*: **E** presence of interstitial pan-telomeres at the junction site of the der(9)t(7;9); **F** presence of the 7q subtelomere in terminal position on the der(9); and **G** presence of the subtelomere 9q at the junction site on the der(9). **H** *Case 21*: presence of interstitial pan-telomeres at the junction site of the der(20)t(15;20). *Case 22*: **I** presence of interstitial pan-telomeres and of the 21q subtelomere at the junction site of the der(21)t(14;21); and **J** presence of the subtelomere 14q in terminal position on the der(21). **K** *Case 23*: presence of interstitial pan-telomeres at the junction site of the tas(Y;13). *Case 32*: **L** absence of interstitial pan-telomeres at the junction site of both the der(1) and der(X) of a t(X;1); **M** presence of the subtelomere 1p at the junction site of the der(1) and in terminal position on the der(X); and **N** presence of the subtelomere Xq in terminal position on the der(1) only. **O** *Case 33*: presence of interstitial pan-telomeres on the r(4). *Case 34*: **P** presence of interstitial pan-telomeres on the r(20); and **Q** presence of the subtelomeres 20p and 20q on the r(20).

For the 8 cases of ring chromosomes (table 3), only 2 (25%) presented interstitial pan-telomeric sequences (cases 33 and 34; fig. 1O, P), and 3 cases (37.5%) had interstitial subtelomeres. Indeed, FISH with subtelomeric probes revealed the presence of interstitial subtelomeres in cases 34 (fig. 1Q), 35 and 40. Unfortunately, such analyses could not be performed on the remaining cases due to lack of archival material.

Discussion

Chromosome healing in terminal deletions

Of the 19 deletion cases studied, 17 lacked the specific subtelomeric region of the deleted arm, despite the presence of pan-telomeres at this same deleted end (table 3). In the 2 remaining patients (cases 4 and 8), presence of the arm-specific subtelomere and pan-telomeres at the deleted end indicated that these deletions were interstitial rather than terminal. Consequently, our results suggest that the 17 cases of terminal deletions were subjected to chromosome healing after chromosome breakage. Furthermore, as 2 of these deletions (cases 12 and 13) were inherited from a parent, this implies that such chromosome healing is stable.

Although we did not detect any translocations implicating the deleted chromosomes even after high-resolution analyses, we cannot rule out telomere capture or other unbalanced cryptic translocations as means to repair broken ends in our cohort of patients, as FISH with all the subtelomeric probes could not be performed due to lack of archival material. However, the incidence of telomere capture or unbalanced cryptic translocations was found to be relatively low in the literature. Indeed, Marinescu et al. [1999] found an unbalanced cryptic translocation inherited from the mother in only one of 104 patients carrying a 5p terminal deletion, while Davies et al. [2003] reported that 3 cases out of 16 terminal deletions were cryptic unbalanced translocations (2 of which were *de novo*). More recently, a study by Ravnán et al. [2006], on a population suffering from idiopathic mental retardation or developmental delay, reported that 30.4% of all cryptic subtelomeric rearrangements were unbalanced translocations/telomere capture events. However, as 24% of these were true unbalanced translocations inherited from a parent carrying a balanced form of the translocation, telomere capture events could therefore represent less than 23% of all subtelomeric rearrangements found in that population [Ravnán et al., 2006]. Thus, chromosome healing, i.e. direct addition of telomeric sequences onto the broken end, is the most probable mechanism by which the 17 terminal deletions we report here were stabilized.

Interstitial (sub)telomeres in translocations and ring chromosomes

So far, approximately 30 cases of interstitial telomeres have been reported in the literature, either in stable or jumping translocations, or telomeric associations (table 1). Reports of translocated chromosomes with interstitial telomeres by Park et al. [1992] and Rossi et al. [1993] initially suggested that telomeric translocations were common, as respectively 4/9 and 7/8 translocations presented interstitial pan-telomeres. However, in 1995, the work of Rivera et al. suggested that telomeric translocations were in fact less common, as no interstitial telomeres were found among 16 patients. As for ring chromosomes, approximately 20 cases with interstitial telomeres have been reported in the literature (table 2). In particular, Flejter et al. [1996] reported a case with a familial r(19) which presented interstitial pan-telomeric sequences, while Canevini et al. [1998] reported that 2 out of 3 cases of r(20) had both subtelomeric and telomeric interstitial sequences (table 2). On the other hand, as part of a study of patients with 22q13 deletions, Luciani et al. [2003] tested 17 cases of r(22) and found no interstitial telomeres. That being said, most of the previous reports of interstitial telomeres did not investigate the presence of interstitial subtelomeres, especially in cases of translocations (tables 1 and 2). Since then, several studies have reported the combined hybridization of pan-telomeric and subtelomeric probes on patients presenting chromosomal abnormalities, mostly ring chromosomes (tables 1 and 2). In particular, Sigurdardottir et al. [1999] and Mignon-Ravix et al. [2007] each published a case where interstitial subtelomeres were present, but not pan-telomeres (tables 1 and 2). Altogether, this supports the notion that interstitial (sub)telomeres in ring chromosomes and translocations are more frequent than previously thought.

In our cohort of 21 patients with a translocation or a ring chromosome, 4 translocations and 2 ring chromosomes had interstitial telomeres (cases 20, 21, 22; 23, 33 and 34), while one translocation and 2 ring chromosomes (cases 32, 35 and 40) had interstitial subtelomeres without interstitial detectable pan-telomeric sequences using a PNA-FISH probe (table 3). These results would thus tend to indicate that the frequency of interstitial (sub)telomeres is not as low as reported, given a combined frequency of 43% in our cohort. Furthermore, the impossibility of performing FISH with subtelomeric probes in all cases of translocations and ring chromosomes might have led to an underestimation of

the frequency of interstitial subtelomeres in our patients. In comparison, in their study of telomeric translocation involving chromosome 15, Mignon-Ravix et al. [2007] showed the presence of interstitial subtelomeres and/or pan-telomeres in 4 of the 8 cases (50%) (table 1).

Even though the frequency of interstitial telomeres in translocations and ring chromosomes is not precisely known, there is evidence that acrocentric chromosomes are more frequently implicated. Indeed, Rivera et al. [1999] reviewed 14 cases of jumping translocations and 12 cases of stable translocations published in the literature. Five of the 8 jumping translocations and 9 of the 12 stable translocations with interstitial telomeres implicated acrocentric chromosomes (table 1). Reviewing 15 constitutional telomeric associations, Huang et al. [2004] also found that 12 cases involved acrocentric chromosomes, 3 of which were positive for interstitial telomeres (table 1). Our data is consistent with these observations, since 5 of the 13 stable translocations we report implicate acrocentrics (table 3) and that 3 of these 5 cases were positive for interstitial telomeres (cases 21, 22 and 23).

Although we were not able to rule out the possibility of *de novo* synthesis of telomeres in cases of interstitial (sub)telomeres in translocations and ring chromosomes, we do not believe that this mechanism could be implicated. Indeed, as ring formation or addition of foreign material through translocation would be means to stabilize the broken ends, there would have been no further need for other healing mechanisms. Furthermore, in all 3 cases (20, 22 and 34) with interstitial pan-telomeres where subtelomeric FISH was performed, a signal was present at the junction point, indicating that the breakpoint was not in the subtelomeres, but in the distal part of the telomeric TTAGGG repeats.

The exact mechanism behind the presence of interstitial telomeres in constitutional cases is still unknown. In fact, interstitial telomeres are mostly studied in cancer cells or cell lines, as well as in cells exposed to radiation or with mutations of genes implicated in the maintenance of genomic stability [reviewed in Bolzan and Bianchi, 2006]. In constitutional cases of translocations, such as those reported here, deficiency of proteins implicated in the capping, maintenance or replication of telomeres could have been

responsible for the telomeric loss of function in parental gametes, leading to the abnormality observed in their offspring. For example, single nucleotide polymorphisms (SNPs) in DNA-PKcs, a gene implicated in DNA repair, lead to the presence of uncapped telomeres and radiation-induced telomere-double-strand break (telomere-DSB) fusions as a result of reduced abundance and activity of the protein [Williams et al., 2009]. Also, a simple break in the (sub)telomeric region, followed by the fusion of this broken end with another broken chromosome end could be another mechanism leading to interstitial telomeres in translocations. As for ring chromosomes, intrachromosomal tethering of the p and q arms, as observed in interphase nuclei for chromosomes 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12, 17, 18, and 20 [Daniel and St Heaps, 2004], could explain the presence of both subtelomeric p- and q-arm probes, as well as pan-telomeric probes, in these rearrangements.

Our study indicates that the frequency at which interstitial telomeres occur in ring chromosomes and telomeric translocations might not be as low as previously thought. This discrepancy is possibly due to the lack of subtelomeric FISH in many reports. Additionally, our data further illustrate the necessity of performing FISH with both subtelomeric and pan-telomeric probes in each case, even when one of the probes yields a negative result, as breakpoints may be located between the 2 types of sequences. Our results also confirm that telomeric translocations frequently implicate acrocentric chromosomes. As for terminal deletions, our data suggest that these rearrangements are stabilized through the acquisition of telomeric sequences, probably by chromosome healing, as suggested by the literature. Finally, it also indicates that these stabilization mechanisms are efficient in humans and generate chromosomes that are stable enough to be transmitted to offspring.

Acknowledgements

We would like to thank N. St-Jules, L. Montreuil, S. St-Amand and D. Lachance for their helpful technical skills.

References

- Ballif BC, Yu W, Shaw CA, Kashork CD, Shaffer LG: Monosomy 1p36 breakpoint junctions suggest pre-meiotic breakage-fusion-bridge cycles are involved in generating terminal deletions. *Hum Mol Genet* 12:2153-2165 (2003).
- Bolzan AD, Bianchi MS: Telomeres, interstitial telomeric repeat sequences, and chromosomal aberrations. *Mutat Res* 612:189-214 (2006).
- Bosco G, Haber JE: Chromosome break-induced DNA replication leads to nonreciprocal translocations and telomere capture. *Genetics* 150:1037-1047 (1998).
- Boutouil M, Fetni R, Qu J, Dallaire L, Richer C-L, Lemieux N: Fragile site and interstitial telomere repeat sequences at the fusion point of a de novo (Y;13) translocation. *Hum Genet* 98:323-327 (1996).
- Calabrese G, Giannotti A, Mingarelli R, Di Gilio MC, Piemontese MR, Palka G: Two newborns with chromosome 4 imbalances: Deletion 4q33→q35 and ring r(4)(pterq35.2-qter). *Clin Genet* 51:264-267 (1997).
- Canevini MP, Sgro V, Zuffardi O, Canger R, Carozzo R, et al: Chromosome 20 ring: A chromosomal disorder associated with a particular electroclinical pattern. *Epilepsia* 39:942-951 (1998).
- Conte RA, Kleyman SM, Kharode C, Verma RS: Delineation of a ring chromosome 16 by the FISH-technique: A case report with review. *Clin Genet* 51:196-199 (1997).
- Daniel A, St Heaps L: Chromosome loops arising from intrachromosomal tethering of telomeres occur at high frequency in G1 (non-cycling) mitotic cells: Implications for telomere capture. *Cell Chromosome* 3:3 (2004) at <http://www.celandchromosome.com/content/3/1/3>.
- Davies AF, Kirby TL, Docherty Z, Ogilvie CM: Characterization of terminal chromosome anomalies using multisubtelomere FISH. *Am J Med Genet A* 120A:483-489 (2003).
- de Lange T: Telomere dynamics and genome instability in human cancer, in Blackburn EH, Greider CW (eds): *Telomeres*, pp 265-293 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1995).

- DesGroseilliers M, Fortin F, Lafreniere AM, Brochu P, Lemyre E, Lemieux N: Dynamic increase of a 45,X cell line in a patient with multicentric ring Y chromosomes. *Cytogenet Genome Res* 115:90-93 (2006).
- Devriendt K, Petit P, Matthijs G, Vermeesch JR, Holvoet M, et al: Trisomy 15 rescue with jumping translocation of distal 15q in Prader-Willi syndrome. *J Med Genet* 34:395-399 (1997).
- Elghezal H, Hannachi H, Mougou S, Kammoun H, Triki C, Saad A: Ring chromosome 20 syndrome without deletions of the subtelomeric and *CHRNA4-KCNQ2* genes loci. *Eur J Med Genet* 50:441-445 (2007).
- Flejter WL, Finlinson D, Root S, Nguyen W, Brothman AR, Viskochil D: Familial ring (19) chromosome mosaicism: Case report and review. *Am J Med Genet* 66:276-280 (1996).
- Flint J, Craddock CF, Villegas A, Bentley DP, Williams HJ, et al: Healing of broken human chromosomes by the addition of telomeric repeats. *Am J Hum Genet* 55:505-512 (1994).
- Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, et al: Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97:503-514 (1999).
- Hackett JA, Feldser DM, Greider CW: Telomere dysfunction increases mutation rate and genomic instability. *Cell* 106:275-286 (2001).
- Henegariu O, Pescovitz OH, Vance GH, Verbrugge J, Heerema NA: A case with mosaic di-, tetra-, and octacentric ring Y chromosomes. *Am J Med Genet* 71:426-429 (1997).
- Huang B, Martin CL, Sandlin CJ, Wang S, Ledbetter DH: Mitotic and meiotic instability of a telomere association involving the Y chromosome. *Am J Med Genet A* 129A:120-123 (2004).
- Ijdo JW, Baldini A, Ward DC, Reeders ST, Wells RA: Origin of human chromosome 2: An ancestral telomere-telomere fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9051-9055 (1991).
- ISCN (2009): An international system for human cytogenetic nomenclature (S. Karger, Basel, 2009).
- Jewett T, Marnane D, Stewart W, Hayworth-Hodge R, Finklea L, et al: Jumping translocation with partial duplications and triplications of chromosomes 7 and 15. *Clin Genet* 53:415-420 (1998).

- Josifova DJ, Mazzaschi R, Ballard T, Ogilvie CM, Splitt M: A constitutional telomeric translocation showing meiotic instability. *Am J Med Genet A* 140:1228-1233 (2006).
- Kosho T, Matsushima K, Sahashi T, Mitsui N, Fukushima Y, et al: 'Ring syndrome' involving chromosome 2 confirmed by FISH analysis using chromosome-specific subtelomeric probes. *Genet Couns* 16:65-70 (2005).
- Le Caignec C, Boceno M, Jacquemont S, Nguyen The Tich S, Rival JM, David A: Inherited ring chromosome 8 without loss of subtelomeric sequences. *Ann Genet* 47:289-296 (2004).
- Lefort G, Blanchet P, Chaze A, Sarda P, Demaille J, Pellestor F: PRINS labeling reveals interstitial telomeric sequences in a constitutional jumping translocation. *Am J Hum Genet* 61:A131 Supplement (1997).
- Lemieux N, Drouin R, Richer CL: High-resolution dynamic and morphological G-bandings (GBG and GTG): A comparative study. *Hum Genet* 85:261-266 (1990).
- Lemieux N, Dutrillaux B, Viegas-Pequignot E: A simple method for simultaneous R- or G-banding and fluorescence *in situ* hybridization of small single-copy genes. *Cytogenet Cell Genet* 59:311-312 (1992).
- Luciani JJ, de Mas P, Depetris D, Mignon-Ravix C, Bottani A, et al: Telomeric 22q13 deletions resulting from rings, simple deletions, and translocations: Cytogenetic, molecular, and clinical analyses of 32 new observations. *J Med Genet* 40:690-696 (2003).
- Maranda B, Lemieux N, Lemyre E: Familial deletion 18p syndrome: Case report. *BMC Med Genet* 7:60 (2006) at <http://www.biomedcentral.com/1471-2350/7/60>.
- Marinescu RC, Johnson EI, Grady D, Chen X-N, Overhauser J: FISH analysis of terminal deletions in patients diagnosed with Cri-du-Chat syndrome. *Clin Genet* 56:282-288 (1999).
- Melek M, Shippen DE: Chromosome healing: Spontaneous and programmed *de novo* telomere formation by telomerase. *Bioessays* 18:301-308 (1996).
- Meltzer PS, Guan X-Y, Trent JM: Telomere capture stabilizes chromosome breakage. *Nat Genet* 4:252-255 (1993).

- Meyne J, Ratliff RL, Moyzis RK: Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7049-7053 (1989).
- Mignon-Ravix C, Depetris D, Luciani JJ, Cuoco C, Krajewska-Walasek M, et al: Recurrent rearrangements in the proximal 15q11--q14 region: A new breakpoint cluster specific to unbalanced translocations. *Eur J Hum Genet* 15:432-440 (2007).
- Morin GB: The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 59:521-529 (1989).
- Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, et al: A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:6622-6626 (1988).
- Neumann AA, Reddel RR: Telomere maintenance and cancer -- look, no telomerase. *Nat Rev Cancer* 2:879-884 (2002).
- Ning Y, Liang JC, Nagarajan L, Schrock E, Ried T: Characterization of 5q deletions by subtelomeric probes and spectral karyotyping. *Cancer Genet Cytogenet* 103:170-172 (1998).
- Park VM, Gustashaw KM, Wathen TM: The presence of interstitial telomeric sequences in constitutional chromosome abnormalities. *Am J Hum Genet* 50:914-923 (1992).
- Petit P, Devriendt K, Vermeesch JR, De Cock P, Fryns JP: Unusual *de novo* t(13;15)(q12.1;p13) translocation leading to complex mosaicism including jumping translocation. *Ann Genet* 41:22-26 (1998).
- Pezzolo A, Gimelli G, Cohen A, Lavaggetto A, Romano C, et al: Presence of telomeric and subtelomeric sequences at the fusion points of ring chromosomes indicates that the ring syndrome is caused by ring instability. *Hum Genet* 92:23-27 (1993).
- Qu J, Dallaire L, Fetni R, Lemieux N, Richer CL: Repetitive telomeric sequences in chromosomal translocations involving chromosome 21. *Am J Hum Genet* 55:A115 Supplement (1994).
- Ravnan JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, Lamb AN, Hedrick J, et al: Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: An evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J Med Genet* 43:478-489 (2006).

- Reddy KS, Murphy T: Fusion of 9 beta-satellite and telomere (TTAGGG)(n) sequences results in a jumping translocation. *Hum Genet* 107:268-275 (2000).
- Reeve A, Norman A, Sinclair P, Whittington-Smith R, Hamey Y, et al: True telomeric translocation in a baby with the Prader-Willi phenotype. *Am J Med Genet* 47:1-6 (1993).
- Ricard-Mousnier B, N'Guyen S, Dubas F, Pouplard F, Guichet A: Ring chromosome 17 epilepsy may resemble that of ring chromosome 20 syndrome. *Epileptic Disord* 9:327-331 (2007).
- Rivera H, Sitch FL, Crolla JA: Telomeric translocations are uncommon. *Genet Couns* 6:343-347 (1995).
- Rivera H, Vasquez AI, Perea FJ: Centromere-telomere (12;8p) fusion, telomeric 12q translocation, and i(12p) trisomy. *Clin Genet* 55:122-126 (1999).
- Rossi E, Florida G, Casali M, Danesino C, Chiumello G, et al: Types, stability, and phenotypic consequences of chromosome rearrangements leading to interstitial telomeric sequences. *J Med Genet* 30:926-931 (1993).
- Sigurdardottir S, Goodman BK, Rutberg J, Thomas GH, Jabs EW, Geraghty MT: Clinical, cytogenetic, and fluorescence *in situ* hybridization findings in two cases of 'complete ring' syndrome. *Am J Med Genet* 87:384-390 (1999).
- Speevak MD, Smart C, Unwin L, Bell M, Farrell SA: Molecular characterization of an inherited ring (19) demonstrating ring opening. *Am J Med Genet A* 121A:141-145 (2003).
- van Langen IM, Otter MA, Aronson DC, Overweg-Plandsoen WC, Hennekam RC, et al: Supernumerary ring chromosome 20 characterized by fluorescence *in situ* hybridization. *Clin Genet* 49:49-53 (1996).
- Varley H, Di S, Scherer SW, Royle NJ: Characterization of terminal deletions at 7q32 and 22q13.3 healed by *de novo* telomere addition. *Am J Hum Genet* 67:610-622 (2000).
- Varley H, Pickett HA, Foxon JL, Reddel RR, Royle NJ: Molecular characterization of inter-telomere and intra-telomere mutations in human ALT cells. *Nat Genet* 30:301-305 (2002).

- Vermeesch JR, Petit P, Speleman F, Devriendt K, Fryns JP, Marynen P: Interstitial telomeric sequences at the junction site of a jumping translocation. *Hum Genet* 99:735-737 (1997).
- Wilkie AO, Lamb J, Harris PC, Finney RD, Higgs DR: A truncated human chromosome 16 associated with alpha thalassaemia is stabilized by addition of telomeric repeat (TTAGGG)_n. *Nature* 346:868-871 (1990).
- Williams ES, Klingler R, Ponnaiya B, Hardt T, Schrock E, et al: Telomere dysfunction and DNA-PKcs deficiency: Characterization and consequence. *Cancer Res* 69:2100-2107 (2009).
- Zahed L, Oreibi G, Azar C, Salti I: Ring chromosome 18q and jumping translocation 18p in an adult male with hypergonadotrophic hypogonadism. *Am J Med Genet A* 129A:25-28 (2004).
- Zou YS, Van Dyke DL, Thorland EC, Chhabra HS, Michels VV, et al: Mosaic ring 20 with no detectable deletion by FISH analysis: Characteristic seizure disorder and literature review. *Am J Med Genet A* 140:1696-1706 (2006).

Curriculum vitae abrégé

Formation académique universitaire

Université de Montréal	B.Sc. Sciences biomédicales	(2000-2003)
Université de Montréal	M.Sc. Pathologie et biologie cellulaire	(2003-2005)
Université de Montréal	Ph.D. Pathologie et biologie cellulaire	(2005-2011)

Bourses

Schering	3 600\$	(2002)
Fonds de la recherche en santé du Québec	30 000\$	(2003-2005)
Rédicy Inc.	4 000\$	(2005)
Département de pathologie et biologie cellulaire, UdeM	1 900\$	(2005)
Fondation du CHU Sainte-Justine	12 500\$	(2005)
Fonds de la recherche en santé du Québec	60 000\$	(2006-2009)
Banque de Montréal	10 000\$	(2006)
Groupe Financier Banque TD	6 000\$	(2007)
Faculté des études supérieures et permanentes, UdeM	1 000\$	(2007)
Bourse de voyage Olive-Beaudry-Leriché	1 000\$	(2008)
Fondation J. Armand Bombardier	10 000\$	(2008)
Programme de pathologie et biologie cellulaires, UdeM	1 500\$	(2008)
Département de pathologie et biologie cellulaire, UdeM	2 915\$	(2009-2010)
Société des pathologistes du CHU Sainte-Justine	5 200\$	(2009-2010)
Fondation des Étoiles et du CHU Sainte-Justine	16 600\$	(2009-2010)

Prix de présentation pour des communications scientifiques

Prix d'excellence Apple Canada-Sarstedt Canada	500\$	(2002)
Prix d'Excellence en Génétique, Cancer et Facteurs de risque	300\$	(2003)
Deuxième prix pour une affiche, UdeM	100\$	(2005)
Prix d'Excellence Sarstedt Canada	150\$	(2005)
Prix d'excellence – catégorie argent pour une affiche, Instituts de recherche en santé du Canada	250\$	(2009)

Prix d'excellence à l'oral, Réseau de Médecine Génétique Appliquée	500\$	(2010)
Prix d'excellence pour une présentation orale en médecine génétique	500\$	(2010)

Publications (autre les 9 articles inclus dans cette thèse)

Monographies:

Richer CL, Lemieux N, Beaulieu Bergeron M. *Gènes et chromosomes en médecine: Auto-apprentissage de la génétique en médecine. 5 modules*. Édités par Nicole Lemieux, Faculté de médecine de l'Université de Montréal, Montréal, Canada. 3^e édition; 2007. ISBN 2-921832-14-3; 2-921832-15-1; 2-921832-16-X; 2-921832-17-8 et 2-921832-18-6.

Résumés publiés de communications scientifiques:

- American Journal of Human Genetics 2003; 73 (Suppl): 203 (#210).
- American Journal of Human Genetics 2003; 73 (Suppl): 302 (#775).
- M/S médecine sciences 2003; 19 (Suppl 2): 6 (#20).
- M/S médecine sciences 2003; 19 (Suppl 2): 26 (#140).
- European Journal of Human Genetics 2006; 14 (Suppl 1): 166 (#P0305).
- Modern Pathology 2006; 19 (Suppl 3): 159 (#735).
- M/S Médecine Science 2007; 23 (Suppl 2): 2 (#44).

Communications scientifiques

33 présentations (18 orales et 15 par affiche) à titre de premier auteur, dont 6 dans des congrès internationaux et 5 dans des congrès nationaux; 7 prix de présentation et 2 mentions d'honneur.

10 présentations (5 orales et 5 par affiche) à titre de second auteur, dont 2 dans des congrès internationaux et 1 dans un congrès national.

Entrevues pour des publications de type grand public

- « *La réversion sexuelle: une anomalie qui demeure mystérieuse* », par Daniel Baril, parue dans le FORUM 40 (17) du 23 janvier 2006.
- « *Chromosomes de femme, corps d'homme* », par Mélodie Enguix (Agence Science-Presse), parue dans la CyberPresse du 11 mai 2006.
- « *La triste histoire du chromosome Y* », par Daniel Baril; parue dans le FORUM 44 (23) du 15 mars 2010.