

# Une forme de cryptorchidie d'origine génétique : le syndrome de persistance des canaux de Müller

Corinne BELVILLE <sup>1</sup>, Jacques GONZALES <sup>1,2</sup>, Nathalie JOSSO <sup>1</sup>,  
Nathalie DI CLEMENTE <sup>1</sup>, Jean-Yves PICARD <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unité de Recherches sur l'Endocrinologie du Développement, (INSERM U493), Clamart

<sup>2</sup> Pitié-Salpêtrière - Biologie de la reproduction, Paris

## RESUME

Le syndrome de persistance des canaux de Müller (PMDS) est une forme rare de pseudohermaphrodisme masculin caractérisé par la présence de dérivés Müllériens chez un sujet 46, XY normalement virilisé. Les circonstances de découverte sont chirurgicales, à l'occasion d'une intervention pour une cryptorchidie ou pour une cure de hernie inguinale.

Une étude génétique réalisée sur 76 familles de sujets porteurs d'un PMDS a montré que des anomalies de l'hormone anti-Müllérienne (AMH) ou de l'un de ses récepteurs (AMHR-II) étaient observées chez 85% des familles étudiées, ce syndrome se transmettant selon un mode autosomique récessif. Pour les 15% des cas restants, l'origine du PMDS reste encore inconnue, aucune anomalie n'ayant été trouvée sur ces deux gènes.

L'AMH est synthétisée par les cellules de Sertoli dès le début de la différenciation testiculaire. Cette glycoprotéine, qui fait partie de la famille du Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), présente une mutation chez 47% des familles de PMDS.

Le récepteur de type II de l'AMH (AMHR-II) est exprimé par les cellules mésenchymateuses entourant le canal de Müller. Il n'a qu'un seul domaine transmembranaire et possède une activité sérine/thréonine kinase. Chez 38% des familles PMDS étudiées, une anomalie de ce récepteur a été observée.

**Mots clés :** hormone anti-Müllérienne, différenciation sexuelle, tractus génital, syndrome de persistance des canaux de Müller, pseudohermaphrodisme, mutation

## I. INTRODUCTION

Le testicule fœtal synthétise deux hormones qui participent activement à la différenciation sexuelle, la testostérone et l'hormone anti-Müllérienne. La testostérone produite par les cellules de Leydig maintient et permet l'évolution des canaux de Wolff en épидидymes, canaux déférents et vésicules séminales. Cet androgène entraîne également la virilisation du sinus urogénital et des organes génitaux externes.

L'hormone anti-Müllérienne (AMH) appelée aussi Müllerian inhibiting substance (MIS) a été mise en évidence grâce aux travaux d'Alfred Jost [10] réalisés dans les années cinquante. Cette hormone synthétisée par les cellules de Sertoli très tôt après la différenciation de la gonade (vers la 7<sup>ème</sup> semaine chez l'homme) est seule capable de faire régresser les canaux de Müller, ébauches des trompes, utérus et partie supérieure du vagin chez la femme (Figure 1). Elle est synthétisée en quantité importante durant la vie fœtale puis sa concentration sérique diminue jusqu'à la puberté, l'AMH n'est ensuite détectable qu'en très faible quantité dans le liquide spermatique.

L'AMH fait partie de la famille du Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) qui rassemble différentes molécules régulant la croissance et la différenciation cellulaire (Figure 2). Cette glycoprotéine homodimérique de 140 kDa, composée de 560 acides aminés, subit comme les autres membres de la famille du TGF- $\beta$  un clivage protéolytique dans le deuxième tiers de la molécule. Le complexe ainsi

Correspondance :

Dr Corinne Belville - Unité de Recherches sur l'Endocrinologie du Développement  
(INSERM U493), 32, rue des carnets, 92140 Clamart -  
Tel 01.41.28.80.34 - Fax 01.41.28.80.28 -  
Email corinne.belville@inserm.ipsc.u-psud.fr

formé est constitué d'un fragment C-terminal de 109 acides aminés biologiquement actif et d'un long fragment représentant la partie N-terminale de la protéine. Cette extrémité ne possède pas d'activité biologique propre mais peut potentialiser l'effet du fragment C-terminal [16].

Le gène de l'AMH cloné en 1986 chez l'homme [1] est situé sur le chromosome 19 (bande p13.3) [3]. Long de 2,8 kpbases, il comprend 5 exons. La partie C-terminale biologiquement active est codée par le dernier tiers du 5ème exon.

La cascade de transduction du signal des membres de la famille du TGF- $\beta$  fait participer deux récepteurs à un seul domaine transmembranaire possédant chacun une activité sérine/thréonine kinase. Le récepteur dit de type II se lie au ligand puis recrute le récepteur de type I qu'il phosphoryle au niveau d'une région riche en glycines et sérines, appelée domaine GS. Le signal est ensuite transmis par le recrutement d'une protéine cytoplasmique Smad, qui une fois phosphorylée par le récepteur de type I, s'associe à une autre molécule appelée Co-Smad. Le complexe ainsi formé est transloqué dans le noyau et peut activer la transcription des gènes cibles [11] (Figure 3).

Le récepteur de type II de l'AMH (AMHR-II) a été cloné en 1995 chez l'homme [6], le poids moléculaire de la protéine mature est de 82 kDa [4]. Localisé sur le chromosome 12 (bande q13), il comporte 11 exons sur 8 kpb. Les exons 1 à 3 codent pour le peptide signal et la partie extracellulaire de la molécule, l'exon 4 pour le domaine transmembranaire, les exons 5 à 11 pour le domaine intracellulaire. Le récepteur de type I n'a pu être cloné par les techniques classiques de biologie moléculaire. Cependant, des approches différentes ont montré qu'ils pouvaient s'agir de récepteurs déjà clonés de la famille des Bone Morphogenetic Proteins, BMPR-IB [5], BMPR-IA [8] ou ALK2 [2, 15].

Le syndrome de persistance des canaux de Müller (PMDS) ou syndrome des hommes à utérus est un pseudohermaphrodisme masculin caractérisé par la présence d'un utérus et de trompes de Fallope chez des garçons 46, XY dont les organes génitaux externes sont parfaitement virilisés (Figure 4). Une cryptorchidie soit bilatérale soit unilatérale associée à une hernie inguinale où se trouvent l'utérus et le testicule est souvent observée [14]. La prévalence de ce syndrome méconnu – de l'ordre d'une naissance sur 100 000 garçons en France – est probablement sous estimée.

Depuis une dizaine d'années, des recherches ont été développées afin de connaître l'origine moléculaire de ce syndrome. Cet article est une synthèse des derniers résultats obtenus.

## II. MATERIEL ET METHODES

L'étude a été réalisée sur des prélèvements biologiques de 76 familles PMDS originaires du monde entier.

Une mesure de l'AMH sérique de ces patients a été effectuée en utilisant une trousse de dosage commercialisée par Beckman-Coulter [12]. Brièvement, ce dosage ELISA permet de fixer l'AMH présente dans l'échantillon biologique entre deux anticorps monoclonaux, la quantité d'hormone est proportionnelle à l'intensité de la réaction colorimétrique développée.

L'ADN génomique, extrait des lymphocytes circulant, a servi de matrice pour amplifier par la technique d'amplification génique *in vitro* ou par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) différentes portions du gène de l'AMH ou de l'AMHR-II, fragments comprenant les exons et les sites donneur et accepteur d'épissage [7]. La recherche de mutations a été effectuée par séquençage direct sur les produits de PCR purifiés, technique permettant d'identifier les anomalies génétiques présentes sur les deux allèles d'un gène donné.

## III. RESULTATS

Des mutations des gènes de l'AMH et de l'AMHR-II sont observées chez les familles de PMDS, elles se transmettent selon un mode autosomique récessif.

### 1. Dosage de l'AMH sérique de patients PMDS

Les patients présentant une anomalie de l'AMH ont une concentration fortement abaissée pour l'âge, par contre ceux qui présentent des mutations du récepteur de type II ont une concentration sérique normale (Figure 5).

### 2. Le gène de l'AMH

Dans 47% des ces familles, 35 mutations différentes du gène de l'AMH ont été identifiées dans les différents exons exceptés le 4ème ainsi que dans certains sites d'épissage. Il s'agit de mutations faux-sens ou non-sens, d'anomalies perturbant le cadre de lecture telles que des délétions ou des additions de bases, ainsi que de mutations modifiant l'épissage. Neuf d'entre elles sont récurrentes dans deux ou trois familles différentes (Figure 6A).

Du fait d'une forte proportion de patients originaires d'Afrique du Nord et de pays Méditerranéens où la consanguinité existe à un taux élevé, les anomalies sont observées majoritairement à l'état homozygote [9].

### 3. Le gène du récepteur de type II de l'AMH

Vingt-cinq mutations différentes ont été identifiées chez 38% des patients PMDS. Cinq sont récurrentes (Figure 6B), elles ne sont observées que dans quelques familles. Cependant la d6331-6357 fait exception. Cette délétion de 27 paires de bases, dans le 10ème exon, est observée dans près de la moitié des familles présentant une anomalie de ce récepteur, que ce soit au stade homozygote ou hétérozygote, associée à une mutation faux-sens.

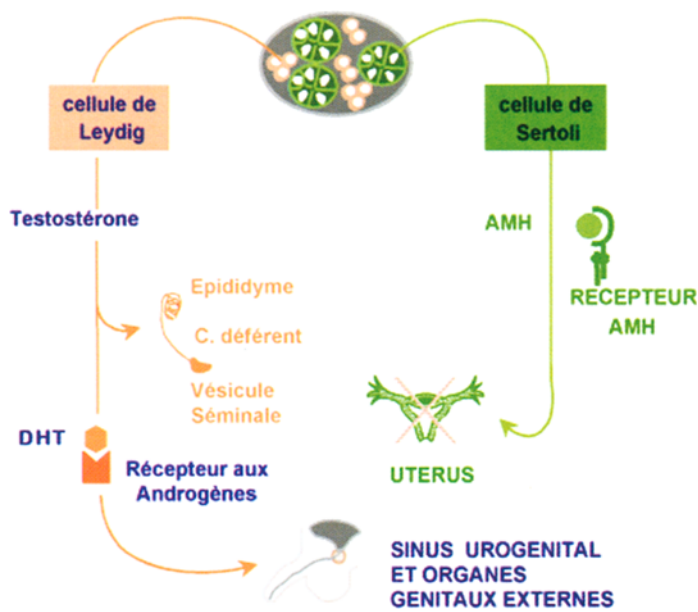


Figure 1 : Contrôle hormonal de la différenciation du tractus génital masculin.

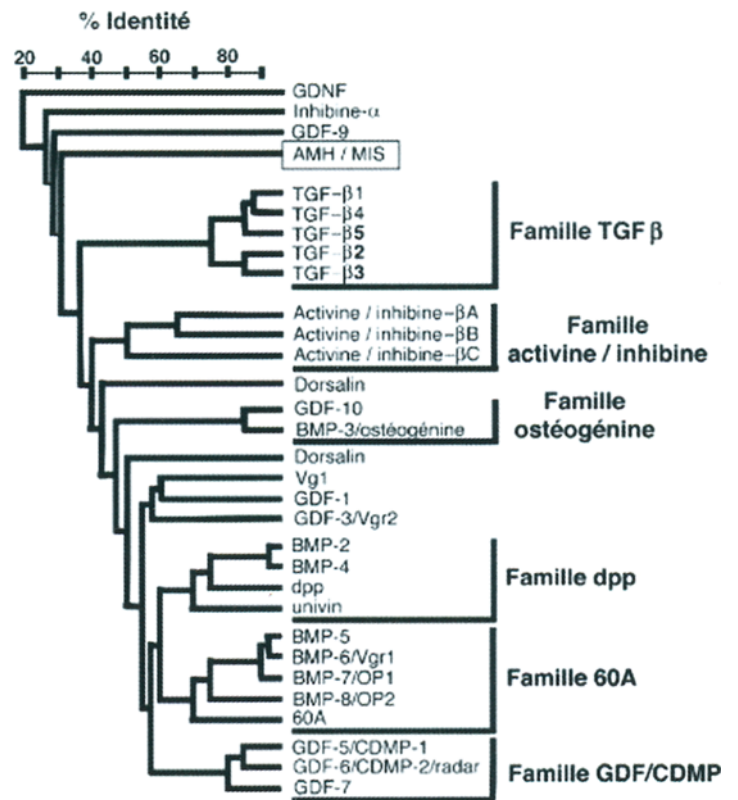


Figure 2 : L'AMH est un des membres de la famille du Transforming Growth Factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ ).

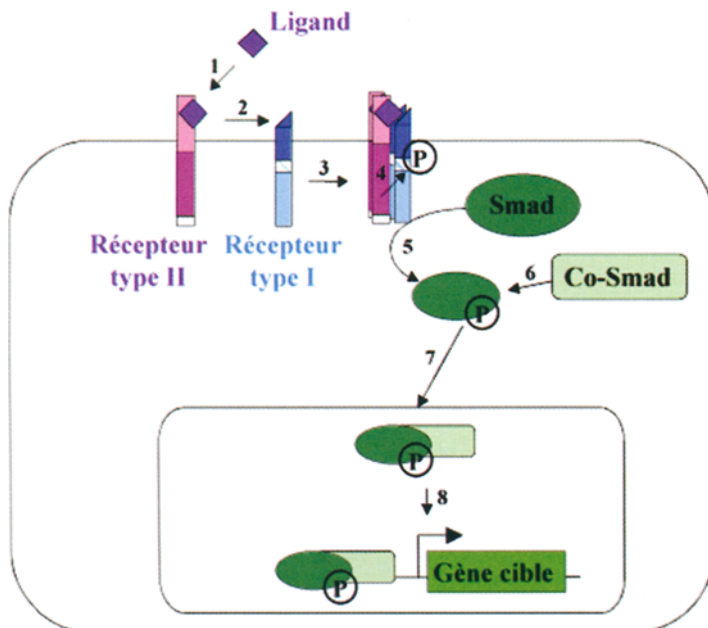
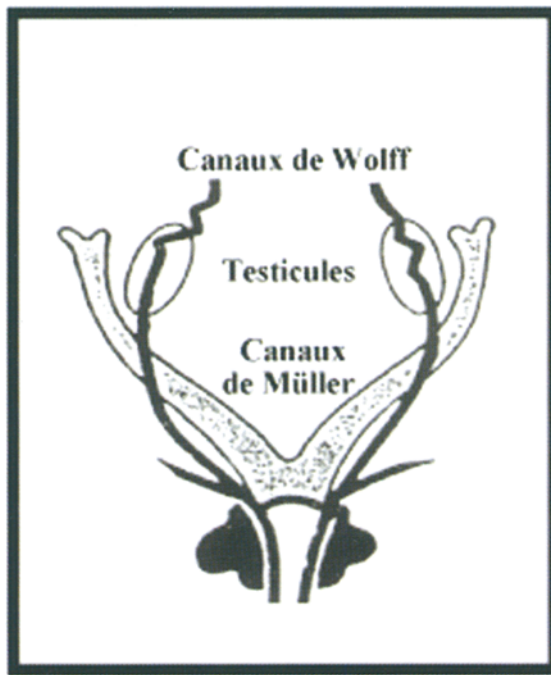
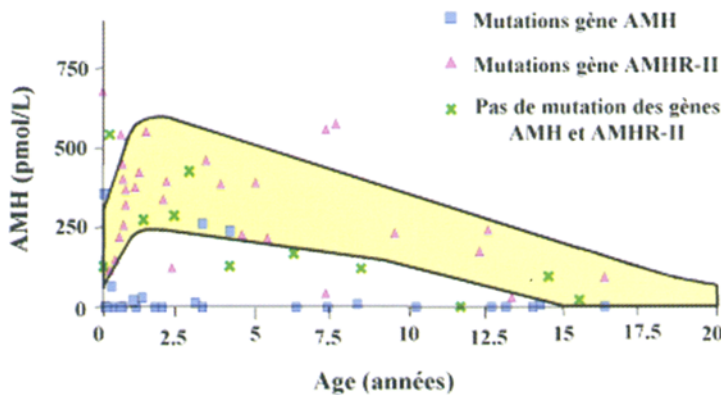


Figure 3 : Transduction du signal de la famille du Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Les étapes successives sont numérotées de 1 à 8.



**Figure 4 : Schéma anatomique et photographie opératoire d'un patient atteint du syndrome de persistance des canaux de Müller (PMDS). Les testicules sont liés aux dérivés Müllériens.**



**Figure 5 : Concentrations de l'AMH sérique dosée par un test immuno-enzymatique chez les patients PMDS en fonction de leur âge.**

Chez le sujet normal, la variation des taux est représentée en jaune. Les valeurs trouvées en cas de mutation du gène de l'AMH sont représentées par un carré bleu, de son récepteur de type II par un triangle rose, et en l'absence d'anomalies génétiques par une croix verte.

#### 4. Les patients ne présentant aucune anomalie des gènes de l'AMH et de l'AMHR-II

Les patients qui n'ont pas d'anomalies de l'AMH et de l'AMHR-II ont une concentration d'AMH sérique normale ou légèrement inférieure à ce qui est attendu (Figure 5).

### IV. DISCUSSION

Les échantillons biologiques (sérums et ADNs génomiques) des 76 familles PMDS ont été collectés sur une dizaine d'années. Dans 85% des cas, une anomalie du gène de l'AMH ou de son récepteur de type II a été observée chez ces patients, avec le même phénotype.

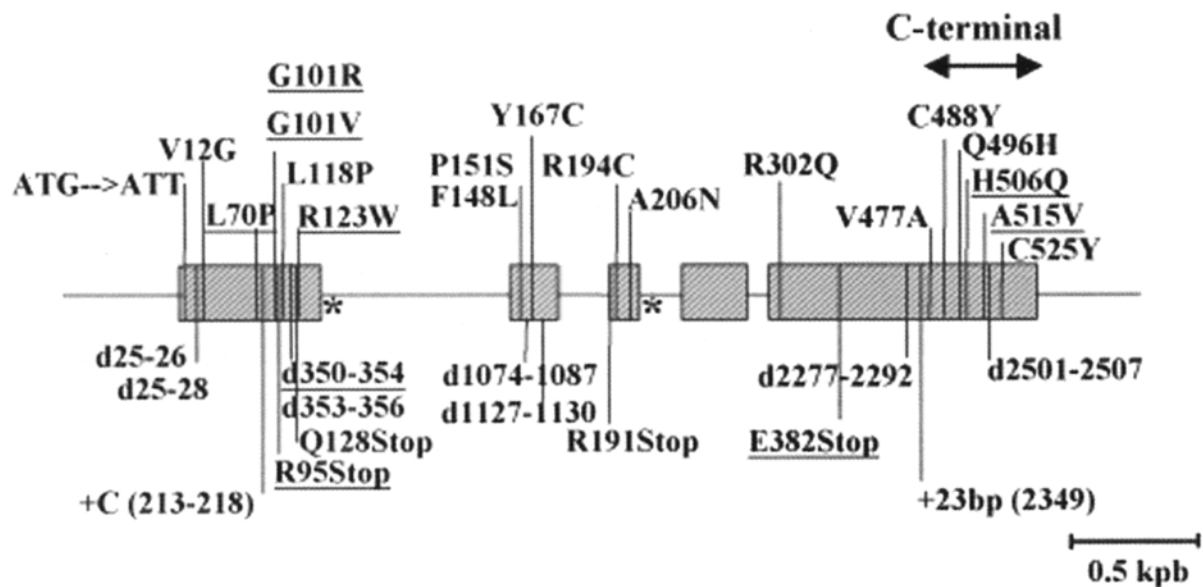
Le dosage de l'AMH sérique est un outil essentiel dans

l'investigation biologique du PMDS. En pratique, il permet d'orienter le diagnostic moléculaire chez les patients pré-pubères. Si la concentration d'AMH est nulle ou très basse, une mutation de cette hormone est probable. Si cette valeur est normale, une anomalie de son récepteur AMHR-II est attendue. Chez les patients adultes, le dosage ELISA n'est pas informatif car sa valeur est toujours basse, la testostérone inhibant la synthèse de l'AMH [13].

Les mutations du gène de l'AMH n'affectent pas que la seule partie de l'exon 5, une région codant pour le domaine C-terminal de la molécule porteur de l'activité biologique. De nombreuses autres anomalies ont été observées sur le gène en particulier dans la première partie de l'exon 1.

Dans presque 50% des familles de PMDS porteurs d'une

## A) Mutations du gène de l'AMH



## B) Mutations du gène de l'AMHR-II

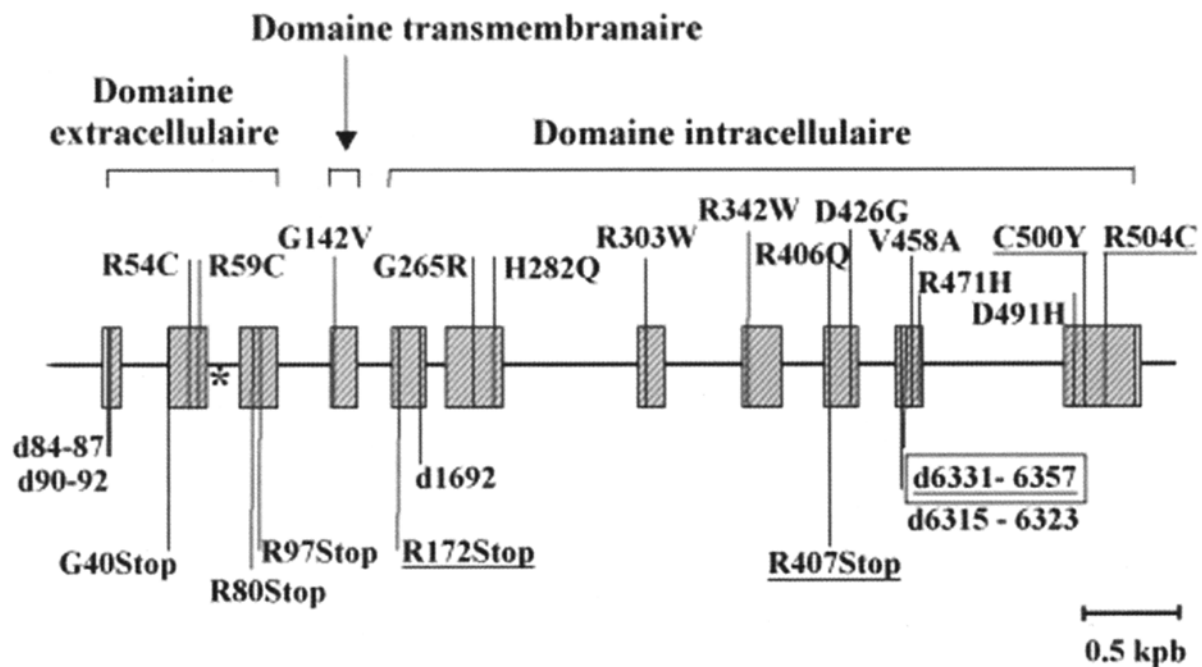


Figure 6 : (A) Mutations du gène de l'AMH, (B) Mutations du gène du récepteur de type II (AMHR-II). Les exons sont grisés.

Les mutations récurrentes sont soulignées, la mutation récurrente la plus fréquente (d6331-6357) observée sur le gène de l'AMHR-II est encadrée.

anomalie de l'AMHR-II, une délétion de 27 paires de bases, d6331-6357, est observée. Lorsque la concentration d'AMH sérique est normale pour l'âge, il est judicieux de commencer la recherche de cette délétion par PCR, au lieu de réaliser le séquençage complet du gène de l'AMHR-II d'emblée.

Aucune anomalie des gènes de l'AMH et de l'AMHR-II n'a été observée pour 15% des familles de PMDS, leur taux d'AMH est intermédiaire voire légèrement abaissé. Certains de ces patients présentent des malformations extra-génitales, urinaires et abdominales. Sont elles dues à des anomalies génétiques de l'enzyme de clivage de l'AMH ou à d'autres éléments de la cascade de transduction du signal de cette hormone (Figure 3) ? Des études génétiques complémentaires seront nécessaires pour répondre à cette question ; elles devront porter sur un plus grand nombre de patients couplées à une analyse clinique complète. Le diagnostic de PMDS est difficile et probablement sous estimé. La présence dans un même canal inguinal de deux testicules, une constatation faite par échographie, est par exemple très évocatrice [17]. Le traitement de la cryptorchidie est très important pour prévenir le risque de dégénérescence testiculaire. Le pronostic d'un PMDS dans lequel la cryptorchidie est d'origine génétique, permettra d'attirer l'attention du clinicien et des parents sur la nécessité d'un contrôle chez les garçons nés et à naître.

## REFERENCES

1. CATE R.L., MATTALIANO R.J., HESSION C. et al. : Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell*, 1986, 45 : 685-698.
2. CLARKE T.R., HOSHIYA Y., YI S.E., LIU X.H., LYONS K.M., DONAHOE P.K. : Mullerian inhibiting substance signaling uses a bone morphogenetic protein (BMP)-like pathway mediated by ALK2 and induces Smad6 expression. *Mol. Endocrinol.*, 2001, 15 : 946-959.
3. COHEN-HAGUENAUER O., PICARD J.Y., MATTEI M.G. et al. : Mapping of the gene for anti-Müllerian hormone to the short arm of human chromosome 19. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 1987, 44 : 2-6.
4. FAURE E., GOUÉDARD L., IMBEAUD S., CATE, R.L. et al. : Mutant isoforms of the anti-Müllerian hormone type II receptor are not expressed at the cell membrane. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271 : 30571-30575.
5. GOUÉDARD L., CHEN Y.G., THEVENET L. et al. : Engagement of bone morphogenetic protein type IB receptor and Smad1 signaling by anti-Müllerian hormone and its type II receptor. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275 : 27973-27978.
6. IMBEAUD S., FAURE E., LAMARRE I. et al. : Insensitivity to anti-Müllerian hormone due to a spontaneous mutation in the human anti-Müllerian hormone receptor. *Nat. Genet.*, 1995, 11 : 382-388.
7. IMBEAUD S., BELVILLE C., MESSIKA-ZEITOUN L. et al. : A 27 base-pair deletion of the anti-Müllerian type II receptor gene is the most common cause of the persistent Müllerian duct syndrome. *Hum. Mol. Genet.*, 1996, 5 : 1269-1279.
8. JAMIN S.P., ARANGO N.A., MISHINA Y., HANKS M.C., BEHRINGER R.R. : Requirement of BMPR-1A for Müllerian duct regression during male sexual development. *Nat. Genet.*, 2003, 32 : 408-410.
9. JOSSO N., BELVILLE C., PICARD J.Y. : Persistence of Müllerian derivatives in males. In : Fauser, B.C.J.M. eds. *Molecular, cellular and genetic fundamentals in reproductive medicine*. New-York, Parthenon Publishing, 2002 : 575-586.
10. JOST A. : Problems of fetal endocrinology : the gonadal and hypophyseal hormones. *Rec. Progr. Horm. Res.*, 1953, 8 : 379-418.
11. MASSAGUÉ J., CHEN Y.G. : Controlling TGF-beta signaling. *Gene. Develop.*, 2000, 14 : 627-644.
12. REY R.A., BELVILLE C., NIHOUL-FÉKÉTÉ C. et al. : Evaluation of gonadal function in 107 intersex patients by means of serum anti-Müllerian hormone measurement. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1999, 84 : 627-631.
13. REY R., LORDEREAU-RICHARD I., CAREL J.C., et al. : Anti-Müllerian hormone and testosterone serum levels are inversely related during normal and precocious pubertal development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1993, 77 : 1220-1226.
14. VAN KOTE G. : Anomalies of Müllerian origin in men and prostatic anomalies. *Prog. Urol.*, 2001, 11 : 712-728.
15. VISSER J.A., OLASO R., VERHOEFPOST M., KRAMER P., THEMME A.P.N., INGRAHAM H.A. : The serine/threonine transmembrane receptor ALK2 mediates Müllerian inhibiting substance signaling. *Mol. Endocrinol.*, 2001, 15 : 936-945.
16. WILSON C.A., DI CLEMENTE N., EHRENFELS C. et al. : Müllerian inhibiting substance requires its N-terminal domain for maintenance of biological activity, a novel finding within the TGF- $\beta$  superfamily. *Mol. Endocrinol.*, 1993, 7 : 247-257.
17. ZELLER J., IMBEAUD S., REY R. et al. : Le syndrome de persistance des dérivés Müllériens (homme à utérus) : un problème pédiatrique. *Arch. Pédiatr.*, 1994, 1 : 991-997.

## ABSTRACT

A genetic form of cryptorchidism:  
Persistent Müllerian duct syndrome

Corinne BELVILLE, Jacques GONZALES, Nathalie JOSSO, Nathalie DI CLEMENTE, Jean-Yves PICARD

Persistent Müllerian duct syndrome (PMDS), a rare form of male pseudohermaphroditism, is characterized by lack of regression of Müllerian derivatives. These patients are externally phenotypic males in whom the presence of a uterus and Fallopian tubes is discovered during surgical correction of cryptorchidism and/or inguinal hernia. Molecular studies, in a total of 76 PMDS families, were performed by automatic sequencing after amplification by polymerase chain reaction (PCR) of different parts of the gene.

AMH, synthesized by Sertoli cells, is a member of the Transforming Growth Factor- $\beta$  superfamily. The 560 amino-acid glycoprotein is formed by two 70 kDa monomers linked by disulfide bonds. This hormone is cleaved at a proteolytic site 109 amino acids upstream of the C-terminus, yielding the bioactive C-terminal domain and a N-terminus which is not itself bioactive, but which enhances the bioactivity of the C-terminus. The gene, composed of five exons, is located on chromosome 19 (band p13.3). AMH gene mutations are present on the whole length of the gene in 47% of PMDS families. Sixty-one per cent were homozygous due to a high proportion of patients from Arabic or Mediterranean countries, characterized by a high rate of consanguinity. The serum AMH level, assessed by a commercially available enzyme immunoassay technique (ELISA), is extremely low in the great majority of patients, even before puberty when AMH levels are normally high.

AMH binds to two distinct membrane-bound receptors, both serine/threonine kinases. The type II AMH receptor (AMHR-II) binds to the ligand, and this complex recruits receptor type I, which acts as a signal transducer by activating specific cytoplasmic substrates, the Smad molecules.

AMHR-II, coded by a 8 kbp gene on chromosome 12 (band q13), contains 11 exons. Exons 1-3 encode the extracellular domain, exon 4 encodes the transmembrane part and exons 5-11 encode the intracellular serine/threonine kinase domain. An AMHR-II mutation was detected in 38% of PMDS families, characterized by a normal AMH level for the patient's

age. A particular mutation, a deletion of 27 bp in exon 10, was present in 45% of families of this group.

No mutation of either AMH or the AMHR-II gene could be detected in 11 PMDS families.

**Key-Words:** anti-Müllerian hormone, sexual differentiation, genital tract, persistent Müllerian duct syndrome, pseudohermaphroditism, mutation