

# THÈSE

## POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE SPÉCIALITÉ BIOLOGIE MÉDICALE

Présentée et soutenue publiquement  
par

**Vuthy EA**

Le 14 octobre 2020

### SÉQUENÇAGE A HAUT-DÉBIT D'UN PANEL DE 336 GÈNES DANS UNE COHORTE DE 284 PATIENTS PRÉSENTANT UN HYPOSPADIAS ISOLÉ

Directeurs de thèse :

Pr Nicolas KALFA et Dr Anne BERGOUGNOUX

#### JURY :

<b>Monsieur le Professeur Thierry LEVADE</b>	<b>Président</b>
<b>Madame le Professeur Peggy GANDIA</b>	<b>Assesseur</b>
<b>Monsieur le Professeur Thierry LAVABRE-BERTRAND</b>	<b>Assesseur</b>
<b>Madame le Professeur Frédérique SAVAGNER</b>	<b>Assesseur</b>
<b>Monsieur le Professeur Nicolas KALFA</b>	<b>Assesseur</b>
<b>Madame le Docteur Anne BERGOUGNOUX</b>	<b>Assesseur</b>



**TABLEAU du PERSONNEL HU  
des Facultés de Médecine de l'Université Paul Sabatier**

au 1<sup>er</sup> septembre 2019

**Professeurs Honoraires**

Doyen Honoraire	M. CHAP Hugues
Doyen Honoraire	M. GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard
Doyen Honoraire	M. LAZORTHES Yves
Doyen Honoraire	M. PUEL Pierre
Doyen Honoraire	M. ROUGE Daniel
Doyen Honoraire	M. VINEL Jean-Pierre
Professeur Honoraire	M. ABBAL Michel
Professeur Honoraire	M. ADER Jean-Louis
Professeur Honoraire	M. ARBUS Louis
Professeur Honoraire	M. ARLET Jacques
Professeur Honoraire	M. ARLET Philippe
Professeur Honoraire	M. ARLET-SUAU Elisabeth
Professeur Honoraire	M. ARNE Jean-Louis
Professeur Honoraire	M. BARRET André
Professeur Honoraire	M. BARTHE Philippe
Professeur Honoraire	M. BAYARD Francis
Professeur Honoraire	M. BOCCALON Henri
Professeur Honoraire	M. BONAFÉ Jean-Louis
Professeur Honoraire	M. BONEU Bernard
Professeur Honoraire	M. BONNEVILLE Paul
Professeur Honoraire	M. BOUNHOURE Jean-Paul
Professeur Honoraire	M. BOUTAULT Franck
Professeur Honoraire Associé	M. BROS Bernard
Professeur Honoraire	M. BUGAT Roland
Professeur Honoraire	M. CAHUZAC Jean-Philippe
Professeur Honoraire	M. CARATERO Claude
Professeur Honoraire	M. CARLES Pierre
Professeur Honoraire	M. CARRIERE Jean-Paul
Professeur Honoraire	M. CARTON Michel
Professeur Honoraire	M. CATHALA Bernard
Professeur Honoraire	M. CHABANON Gérard
Professeur Honoraire	M. CHAMONTIN Bernard
Professeur Honoraire	M. CHAP Hugues
Professeur Honoraire	M. CHAVOIN Jean-Pierre
Professeur Honoraire	M. CLANET Michel
Professeur Honoraire	M. CONTE Jean
Professeur Honoraire	M. COSTAGLIOLA Michel
Professeur Honoraire	M. COTONAT Jean
Professeur Honoraire	M. DABERNAT Henri
Professeur Honoraire	M. DALOUS Antoine
Professeur Honoraire	M. DALY-SCHVEITZER Nicolas
Professeur Honoraire	M. DAVID Jean-Frédéric
Professeur Honoraire	M. DELSOL Georges
Professeur Honoraire	Mme DELISLE Marie-Bernadette
Professeur Honoraire	Mme DIDIER Jacqueline
Professeur Honoraire	M. DUCOS Jean
Professeur Honoraire	M. DUFFAUT Michel
Professeur Honoraire	M. DUPRE M.
Professeur Honoraire	M. DURAND Dominique
Professeur Honoraire associé	M. DUTAU Guy
Professeur Honoraire	M. ESCANDE Michel
Professeur Honoraire	M. ESCHAPASSE Henri
Professeur Honoraire	M. ESCOURROU Jean
Professeur Honoraire	M. ESQUERRE J.P.
Professeur Honoraire	M. FABIÉ Michel
Professeur Honoraire	M. FABRE Jean
Professeur Honoraire	M. FOURNIAL Gérard
Professeur Honoraire	M. FOURNIE Bernard
Professeur Honoraire	M. FOURTANIER Gilles
Professeur Honoraire	M. FRAYSSE Bernard
Professeur Honoraire	M. FREXINOS Jacques
Professeur Honoraire	Mme GENESTAL Michèle
Professeur Honoraire	M. GERAUD Gilles
Professeur Honoraire	M. GHISOLFI Jacques
Professeur Honoraire	M. GOUZI Jean-Louis
Professeur Honoraire	M. GUIRAUD CHAUMEIL Bernard
Professeur Honoraire	M. HOFF Jean
Professeur Honoraire	M. JOFFRE Francis
Professeur Honoraire	M. LACOMME Yves
Professeur Honoraire	M. LAGARRIGUE Jacques
Professeur Honoraire	Mme LARENG Marie-Blanche
Professeur Honoraire	M. LARENG Louis
Professeur Honoraire	M. LAURENT Guy
Professeur Honoraire	M. LAZORTHES Franck
Professeur Honoraire	M. LAZORTHES Yves
Professeur Honoraire	M. LEOPHONTE Paul
Professeur Honoraire	M. MAGNAVAL Jean-François
Professeur Honoraire	M. MANELFE Claude

Professeur Honoraire	M. MANSAT Michel
Professeur Honoraire	M. MASSIP Patrice
Professeur Honoraire	Mme MARTY Nicole
Professeur Honoraire	M. MAZIERES Bernard
Professeur Honoraire	M. MONROZIES Xavier
Professeur Honoraire	M. MOSCOVICI Jacques
Professeur Honoraire	M. MURAT
Professeur Honoraire associé	M. NICODEME Robert
Professeur Honoraire	M. OLIVES Jean-Pierre
Professeur Honoraire	M. PASCAL Jean-Pierre
Professeur Honoraire	M. PESSEY Jean-Jacques
Professeur Honoraire	M. PLANTE Pierre
Professeur Honoraire	M. PONTONNIER Georges
Professeur Honoraire	M. POURRAT Jacques
Professeur Honoraire	M. PRADERE Bernard
Professeur Honoraire	M. PRIS Jacques
Professeur Honoraire	Mme PUEL Jacqueline
Professeur Honoraire	M. PUEL Pierre
Professeur Honoraire	M. PUJOL Michel
Professeur Honoraire	M. QUERLEU Denis
Professeur Honoraire	M. RAILHAC Jean-Jacques
Professeur Honoraire	M. REGIS Henri
Professeur Honoraire	M. REGNIER Claude
Professeur Honoraire	M. REME Jean-Michel
Professeur Honoraire	M. RISCHMANN Pascal
Professeur Honoraire	M. RIVIERE Daniel
Professeur Honoraire	M. ROCHE Henri
Professeur Honoraire	M. ROCHICCIOLI Pierre
Professeur Honoraire	M. ROLLAND Michel
Professeur Honoraire	M. ROQUE-LATRILLE Christian
Professeur Honoraire	M. RUMEAU Jean-Louis
Professeur Honoraire	M. SALVADOR Michel
Professeur Honoraire	M. SALVAYRE Robert
Professeur Honoraire	M. SARRAMON Jean-Pierre
Professeur Honoraire	M. SIMON Jacques
Professeur Honoraire	M. SUC Jean-Michel
Professeur Honoraire	M. THOUVENOT Jean-Paul
Professeur Honoraire	M. TREMOULET Michel
Professeur Honoraire	M. VALDIGUIE Pierre
Professeur Honoraire	M. VAYSSE Philippe
Professeur Honoraire	M. VIRENQUE Christian
Professeur Honoraire	M. VOIGT Jean-Jacques

**Professeurs Emérites**

Professeur ADER Jean-Louis
Professeur ALBAREDE Jean-Louis
Professeur ARBUS Louis
Professeur ARLET Philippe
Professeur ARLET-SUAU Elisabeth
Professeur BOCCALON Henri
Professeur BOUTAULT Franck
Professeur BONEU Bernard
Professeur CARATERO Claude
Professeur CHAMONTIN Bernard
Professeur CHAP Hugues
Professeur CONTÉ Jean
Professeur COSTAGLIOLA Michel
Professeur DABERNAT Henri
Professeur FRAYSSE Bernard
Professeur DELISLE Marie-Bernadette
Professeur GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard
Professeur JOFFRE Francis
Professeur LAGARRIGUE Jacques
Professeur LARENG Louis
Professeur LAURENT Guy
Professeur LAZORTHES Yves
Professeur MAGNAVAL Jean-François
Professeur MANELFE Claude
Professeur MASSIP Patrice
Professeur MAZIERES Bernard
Professeur MOSCOVICI Jacques
Professeur MURAT
Professeur ROQUES-LATRILLE Christian
Professeur SALVAYRE Robert
Professeur SARRAMON Jean-Pierre
Professeur SIMON Jacques

# FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-PURPAN

37 allées Jules Guesde - 31062 TOULOUSE Cedex

Doyen : D. CARRIE

## P.U. - P.H.

### Classe Exceptionnelle et 1ère classe

M. ADOUE Daniel (C.E)	Médecine Interne, Gériatrie
M. AMAR Jacques	Thérapeutique
M. ATTAL Michel (C.E)	Hématologie
M. AVET-LOISEAU Hervé	Hématologie, transfusion
Mme BEYNE-RAUZY Odile	Médecine Interne
M. BIRMES Philippe	Psychiatrie
M. BLANCHER Antoine	Immunologie (option Biologique)
M. BOSSAVY Jean-Pierre (C.E)	Chirurgie Vasculaire
M. BRASSAT David	Neurologie
M. BROUCHET Laurent	Chirurgie thoracique et cardio-vascul
M. BROUSSET Pierre (C.E)	Anatomie pathologique
M. BUREAU Christophe	Hépatogastro-entérologie
M. CALVAS Patrick (C.E)	Génétique
M. CARRERE Nicolas	Chirurgie Générale
M. CARRIE Didier (C.E)	Cardiologie
M. CHAIX Yves	Pédiatrie
Mme CHARPENTIER Sandrine	Médecine d'urgence
M. CHAUVEAU Dominique	Néphrologie
M. CHOLLET François (C.E)	Neurologie
M. DAHAN Marcel (C.E)	Chirurgie Thoracique et Cardiaque
M. DE BOISSEZON Xavier	Médecine Physique et Réadapt Fonct.
M. DEGUINE Olivier (C.E)	Oto-rhino-laryngologie
M. DUCOMMUN Bernard	Cancérologie
M. FERRIERES Jean (C.E)	Epidémiologie, Santé Publique
M. FOURCADE Olivier	Anesthésiologie
M. FOURNIÉ Pierre	Ophthalmologie
M. GAME Xavier	Urologie
M. GEERAERTS Thomas	Anesthésiologie et réanimation
M. IZOPET Jacques (C.E)	Bactériologie-Virologie
Mme LAMANT Laurence (C.E)	Anatomie Pathologique
M. LANG Thierry (C.E)	Biostatistiques et Informatique Médicale
M. LANGIN Dominique (C.E)	Nutrition
M. LAUQUE Dominique (C.E)	Médecine Interne
M. LAUWERS Frédéric	Chirurgie maxillo-faciale
M. LIBLAU Roland (C.E)	Immunologie
M. MALAUAUD Bernard	Urologie
M. MANSAT Pierre	Chirurgie Orthopédique
M. MARCHOU Bruno	Maladies Infectieuses
M. MAZIERES Julien	Pneumologie
M. MOLINIER Laurent	Epidémiologie, Santé Publique
M. MONTASTRUC Jean-Louis (C.E)	Pharmacologie
Mme MOYAL Elisabeth	Cancérologie
Mme NOURHASHEMI Fatemeh (C.E)	Gériatrie
M. OSWALD Eric (C.E)	Bactériologie-Virologie
M. PARANT Olivier	Gynécologie Obstétrique
M. PARIENTE Jérémie	Neurologie
M. PARINAUD Jean (C.E)	Biol. Du Dévelop. et de la Reprod.
M. PAUL Carle	Dermatologie
M. PAYOUX Pierre	Biophysique
M. PAYRASTRE Bernard (C.E)	Hématologie
M. PERON Jean-Marie	Hépatogastro-entérologie
M. PERRET Bertrand (C.E)	Biochimie
M. RASCOL Olivier (C.E)	Pharmacologie
M. RECHER Christian(C.E)	Hématologie
M. SALES DE GAUZY Jérôme	Chirurgie Infantile
M. SALLES Jean-Pierre (C.E)	Pédiatrie
M. SANS Nicolas	Radiologie
Mme SELVES Janick	Anatomie et cytologie pathologiques
M. SERRE Guy (C.E)	Biologie Cellulaire
M. TELMON Norbert (C.E)	Médecine Légale
M. VINEL Jean-Pierre (C.E)	Hépatogastro-entérologie

#### P.U. Médecine générale

M. OUSTRIC Stéphane (C.E)

#### Professeur Associé de Médecine Générale

Mme IRI-DELAHAYE Motoko

## P.U. - P.H.

### 2ème classe

Mme BONGARD Vanina	Epidémiologie
M. BONNEVILLE Nicolas	Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mme CASPER Charlotte	Pédiatrie
M. COGNARD Christophe	Neuroradiologie
M. LAIREZ Olivier	Biophysique et médecine nucléaire
M. LAROCHE Michel	Rhumatologie
M. LEOBON Bertrand	Chirurgie Thoracique et Cardiaque
M. LOPEZ Raphael	Anatomie
M. MARTIN-BLONDEL Guillaume	Maladies infectieuses, maladies tropicales
M. MARX Mathieu	Oto-rhino-laryngologie
M. MAS Emmanuel	Pédiatrie
M. OLIVOT Jean-Marc	Neurologie
M. PAGES Jean-Christophe	Biologie cellulaire
M. PORTIER Guillaume	Chirurgie Digestive
M. RONCALLI Jérôme	Cardiologie
Mme RUYSSSEN-WITRAND Adeline	Rhumatologie
Mme SAVAGNER Frédérique	Biochimie et biologie moléculaire
M. SOL Jean-Christophe	Neurochirurgie
Mme TREMOLLIERES Florence	Biologie du développement
Mme VEZZOSI Delphine	Endocrinologie

#### P.U. Médecine générale

M. MESTHÉ Pierre

#### Professeur Associé Médecine générale

M. ABITTEBOUL Yves

M. POUTRAIN Jean-Christophe

#### Professeur Associé en Bactériologie-Hygiène

Mme MALAUAUD Sandra

# FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-RANGUEIL

133, route de Narbonne - 31062 TOULOUSE Cedex

Doyen : E. SERRANO

## P.U. - P.H.

### Classe Exceptionnelle et 1ère classe

M. ACAR Philippe	Pédiatrie
M. ACCADBLED Franck	Chirurgie Infantile
M. ALRIC Laurent (C.E)	Médecine Interne
Mme ANDRIEU Sandrine	Epidémiologie
M. ARBUS Christophe	Psychiatrie
M. ARNAL Jean-François	Physiologie
Mme BERRY Isabelle (C.E)	Biophysique
M. BONNEVILLE Fabrice	Radiologie
M. BUJAN Louis (C. E)	Urologie-Andrologie
Mme BURA-RIVIERE Alessandra	Médecine Vasculaire
M. BUSCAIL Louis (C.E)	Hépto-Gastro-Entérologie
M. CANTAGREL Alain (C.E)	Rhumatologie
M. CARON Philippe (C.E)	Endocrinologie
M. CHAUFOUR Xavier	Chirurgie Vasculaire
M. CHAYNES Patrick	Anatomie
M. CHIRON Philippe (C.E)	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
M. CONSTANTIN Arnaud	Rhumatologie
M. COURBON Frédéric	Biophysique
Mme COURTADE SAIDI Monique	Histologie Embryologie
M. DAMBRIN Camille	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire
M. DELABESSE Eric	Hématologie
M. DELOBEL Pierre	Maladies Infectieuses
M. DELORD Jean-Pierre	Cancérologie
M. DIDIER Alain (C.E)	Pneumologie
Mme DULY-BOUHANICK Béatrice (C.E)	Thérapeutique
M. ELBAZ Meyer	Cardiologie
M. GALINIER Michel (C.E)	Cardiologie
M. GLOCK Yves (C.E)	Chirurgie Cardio-Vasculaire
Mme GOMEZ-BROUCHET Anne-Muriel	Anatomie Pathologique
M. GOURDY Pierre	Endocrinologie
M. GRAND Alain (C.E)	Epidémiologie. Eco. de la Santé et Prévention
M. GROLLEAU RAOUX Jean-Louis (C.E)	Chirurgie plastique
Mme GUIMBAUD Rosine	Cancérologie
Mme HANAIRE Héléne (C.E)	Endocrinologie
M. HUYGHE Eric	Urologie
M. KAMAR Nassim (C.E)	Néphrologie
M. LARRUE Vincent	Neurologie
M. LEVADE Thierry (C.E)	Biochimie
M. MALECAZE François (C.E)	Ophtalmologie
M. MARQUE Philippe	Médecine Physique et Réadaptation
M. MAURY Jean-Philippe	Cardiologie
Mme MAZEREEUW Juliette	Dermatologie
M. MINVILLE Vincent	Anesthésiologie Réanimation
M. RAYNAUD Jean-Philippe (C.E)	Psychiatrie Infantile
M. RITZ Patrick (C.E)	Nutrition
M. ROLLAND Yves (C.E)	Gériatrie
M. ROUGE Daniel (C.E)	Médecine Légale
M. ROUSSEAU Hervé (C.E)	Radiologie
M. ROUX Franck-Emmanuel	Neurochirurgie
M. SAILLER Laurent	Médecine Interne
M. SCHMITT Laurent (C.E)	Psychiatrie
M. SENARD Jean-Michel (C.E)	Pharmacologie
M. SERRANO Elie (C.E)	Oto-rhino-laryngologie
M. SOULAT Jean-Marc	Médecine du Travail
M. SOULIE Michel (C.E)	Urologie
M. SUC Bertrand	Chirurgie Digestive
Mme TAUBER Marie-Thérèse (C.E)	Pédiatrie
Mme URO-COSTE Emmanuelle	Anatomie Pathologique
M. VAYSSIERE Christophe	Gynécologie Obstétrique
M. VELLAS Bruno (C.E)	Gériatrie

#### Professeur Associé de Médecine Générale

M. STILLMUNKES André

## P.U. - P.H.

### 2ème classe

M. AUSSEIL Jérôme	Biochimie et biologie moléculaire
M. BERRY Antoine	Parasitologie
M. BOUNES Vincent	Médecine d'urgence
Mme BOURNET Barbara	Gastro-entérologie
M. CHAPUT Benoit	Chirurgie plastique et des brûlés
Mme DALENC Florence	Cancérologie
M. DECRAMER Stéphane	Pédiatrie
M. FAGUER Stanislas	Néphrologie
Mme FARUCH BILFELD Marie	Radiologie et imagerie médicale
M. FRANCHITTO Nicolas	Addictologie
Mme GARDETTE Virginie	Epidémiologie
M. GARRIDO-STÖWHAS Ignacio	Chirurgie Plastique
Mme LAPRIE Anne	Radiothérapie
Mme LAURENT Camille	Anatomie Pathologique
M. LE CAIGNEC Cédric	Génétique
M. LEANDRI Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
M. MARCHEIX Bertrand	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
M. MEYER Nicolas	Dermatologie
M. MUSCARI Fabrice	Chirurgie Digestive
M. REINA Nicolas	Chirurgie orthopédique et traumatologique
M. SILVA SIFONTES Stein	Réanimation
M. SOLER Vincent	Ophtalmologie
Mme SOMMET Agnès	Pharmacologie
Mme SOTO-MARTIN Maria-Eugénia	Gériatrie et biologie du vieillissement
M. TACK Ivan	Physiologie
M. VERGEZ Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
M. YSEBAERT Loic	Hématologie

#### P.U. Médecine générale

Mme ROUGE-BUGAT Marie-Eve

#### Professeur Associé de Médecine Générale

M. BOYER Pierre

**FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-PURPAN**  
**37, allées Jules Guesde – 31062 Toulouse Cedex**

**M.C.U. - P.H.**

M. ABBO Olivier	Chirurgie infantile
M. APOIL Pol Andre	Immunologie
Mme ARNAUD Catherine	Epidémiologie
Mme BERTOLI Sarah	Hématologie, transfusion
M. BIETH Eric	Génétique
Mme CASPAR BAUGUIL Sylvie	Nutrition
Mme CASSAGNE Myriam	Ophtalmologie
Mme CASSAING Sophie	Parasitologie
M. CAVAIGNAC Etienne	Chirurgie orthopédique et traumatologie
Mme CHANTALAT Elodie	Anatomie
M. CONGY Nicolas	Immunologie
Mme COURBON Christine	Pharmacologie
Mme DAMASE Christine	Pharmacologie
Mme de GLISEZENSKY Isabelle	Physiologie
M. DUBOIS Damien	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme FILLAUX Judith	Parasitologie
M. GANTET Pierre	Biophysique
Mme GENNERO Isabelle	Biochimie
Mme GENOUX Annelise	Biochimie et biologie moléculaire
M. HAMDI Safouane	Biochimie
Mme HITZEL Anne	Biophysique
M. IRIART Xavier	Parasitologie et mycologie
Mme JONCA Nathalie	Biologie cellulaire
M. KIRZIN Sylvain	Chirurgie générale
Mme LAPEYRE-MESTRE Maryse	Pharmacologie
M. LHERMUSIER Thibault	Cardiologie
M. LHOMME Sébastien	Bactériologie-virologie
Mme MONTASTIER Emilie	Nutrition
Mme MOREAU Marion	Physiologie
Mme NOGUEIRA M.L.	Biologie Cellulaire
Mme PERROT Aurore	Hématologie
M. PILLARD Fabien	Physiologie
Mme PUISSANT Bénédicte	Immunologie
Mme RAYMOND Stéphanie	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme SABOURDY Frédérique	Biochimie
Mme SAUNE Karine	Bactériologie Virologie
M. TAFANI Jean-André	Biophysique
M. TREINER Emmanuel	Immunologie
Mme TRUDEL Stéphanie	Biochimie
Mme VAYSSE Charlotte	Cancérologie
M. VIDAL Fabien	Gynécologie obstétrique

**M.C.U. Médecine générale**

M. BRILLAC Thierry  
Mme DUPOUY Julie

**M.C.A. Médecine Générale**

Mme FREYENS Anne  
M. CHICOULAA Bruno  
Mme PUECH Marielle

**FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE- RANGUEIL**  
**133, route de Narbonne - 31062 TOULOUSE cedex**

**M.C.U. - P.H**

Mme ABRAVANEL Florence	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme BASSET Céline	Cytologie et histologie
Mme CAMARE Caroline	Biochimie et biologie moléculaire
M. CAMBUS Jean-Pierre	Hématologie
Mme CANTERO Anne-Valérie	Biochimie
Mme CARFAGNA Luana	Pédiatrie
Mme CASSOL Emmanuelle	Biophysique
M. CHASSAING Nicolas	Génétique
M. CLAVEL Cyril	Biologie Cellulaire
Mme COLOMBAT Magali	Anatomie et cytologie pathologiques
Mme CORRE Jill	Hématologie
M. DE BONNECAZE Guillaume	Anatomie
M. DEDOUIT Fabrice	Médecine Légale
M. DEGBOE Yannick	Rhumatologie
M. DELPLA Pierre-André	Médecine Légale
M. DESPAS Fabien	Pharmacologie
M. EDOUARD Thomas	Pédiatrie
Mme ESQUIROL Yolande	Médecine du travail
Mme EVRARD Solène	Histologie, embryologie et cytologie
Mme FLOCH Pauline	Bactériologie-Virologie
Mme GALINIER Anne	Nutrition
Mme GALLINI Adeline	Epidémiologie
M. GASQ David	Physiologie
M. GATIMEL Nicolas	Médecine de la reproduction
Mme GRARE Marion	Bactériologie Virologie Hygiène
M. GUIBERT Nicolas	Pneumologie
Mme GUILBEAU-FRUGIER Céline	Anatomie Pathologique
M. GUILLEMINAULT Laurent	Pneumologie
Mme GUYONNET Sophie	Nutrition
M. HERIN Fabrice	Médecine et santé au travail
Mme INGUENEAU Cécile	Biochimie
M. LEPAGE Benoit	Biostatistiques et Informatique médicale
Mme MAUPAS SCHWALM Françoise	Biochimie
M. MOULIS Guillaume	Médecine interne
Mme NASR Nathalie	Neurologie
Mme QUELVEN Isabelle	Biophysique et médecine nucléaire
M. RIMAILHO Jacques	Anatomie et Chirurgie Générale
M. RONGIERES Michel	Anatomie - Chirurgie orthopédique
Mme VALLET Marion	Physiologie
M. VERGEZ François	Hématologie
M. YRONDI Antoine	Psychiatrie d'adultes

**M.C.U. Médecine générale**

M. BISMUTH Michel

**M.C.A. Médecine Générale**

M. BIREBENT Jordan  
Mme BOURGEOIS Odile  
Mme BOUSSIER Nathalie  
Mme LATROUS Leila

# Remerciements

## **A mon jury de thèse**

### **Monsieur le Professeur Thierry LEVADE,**

Vous me faites un grand honneur en acceptant de présider ce jury. Merci de nous partager votre passion pour les maladies métaboliques, pour lesquelles j'ai beaucoup apprécié de préparer mes cas cliniques lors de mes passages dans ce qui est désormais votre service, plus que je ne l'aurais pensé !

### **Madame le Professeur Peggy GANDIA,**

Merci de me faire l'honneur de participer à ce jury. C'est grâce à ton investissement en faveur des internes et ton soutien que j'ai pu réaliser ce parcours plus proche de chez moi et des miens. Je t'en suis énormément reconnaissant et te remercie chaleureusement.

### **Monsieur le Professeur Thierry LAVABRE-BERTRAND,**

Vous m'avez accueilli avec bienveillance dans votre service durant 2 semestres, et vous étiez déjà là il y a 14 ans lorsque j'ai découvert le désormais retraité amphi Giraud. Merci pour vos enseignements, tant Médecine qu'en Histoire (de la Médecine). Soyez assuré de mon profond respect.

### **Madame le Professeur Frédérique SAVAGNER,**

Vous m'avez donné l'opportunité de découvrir le secteur de biologie moléculaire et ainsi renouer avec mes premières aspirations, ainsi que me frotter au NGS au sein d'une équipe remarquable. Soyez assurée de ma sincère considération et de ma reconnaissance pour siéger dans ce jury.

### **Monsieur le Professeur Nicolas KALFA,**

Un grand merci pour m'avoir permis de participer à ce projet et que j'en tire autant profit... Je suis ravi d'avoir eu la chance de pouvoir travailler avec toi et bénéficier d'un fragment de tes connaissances, ainsi que de ton humour remarquable ! J'espère qu'en retour, les patients bénéficieront de ce travail et de ce qui en suivra.

### **Madame le Docteur Anne BERGOUGNOUX,**

Quel plaisir d'avoir pu travailler ensemble, 10 ans après le M2 ! Merci de m'avoir si bien vendu ce projet pour que je rejoigne votre équipe. Ce semestre a été extrêmement enrichissant et je suis heureux d'avoir pu bénéficier de tes connaissances et de ton expérience. Nos échanges m'ont été précieux et j'espère qu'ils se poursuivront à l'avenir.

## **Aux personnes qui ont permis ce travail**

M. le Professeur Michel Koenig : merci de m'avoir ouvert les portes du laboratoire de génétique de l'IURC et laissé choisir mon secteur.

Mme le Professeur Françoise Paris : Françoise, je te suis particulièrement reconnaissant de m'avoir accueilli à bras ouverts dans l'équipe, permis de travailler sur un projet de recherche en plus de la participation à la validation des résultats de "routine", mais aussi de profiter de ton expertise clinico-biologique sur les DSD et de ton expérience pour avoir un aperçu du PFMG 2025. Merci infiniment.

Nadège, la mémoire du labo, tu techniques les runs plus vite qu'on les rend ! Ta bonne humeur est une philosophie qui m'a accompagné durant ce semestre.

David, merci pour ta disponibilité pour les rudiments de code, de manipulation des vcf, et bien évidemment MobiDetails+++ sans quoi tout ça aurait été beaucoup moins sympa.

## **Aux collègues de l'internat**

A l'équipe de cytogénétique du CHU de Nîmes : Mélanie, Jean, Dorothée, Cécile, Christine, Mireille, Mélanie, Magalie, Virginie, Maurane, ainsi que les autres secteurs et secrétaires du labo. Vous avez su me faire découvrir, apprécier (puis revenir !) un domaine que je n'avais jamais voulu envisager (malgré un résumé et un projet fictif tous deux rédigés sur... la trisomie 21). Merci pour cette formation accélérée, le travail déjà accompli - et ce qui viendra ensuite !

Aux autres membres de l'IURC du CHU de Montpellier, et en particulier Victoria bien avant tout cela : tout simplement Merci pour ton soutien depuis 10 ans.

Aux filles du SBMGC1 du CHU de Toulouse : Virginie, Elisa, Elodie, Valérie et Vera. Vous m'avez fait remettre la main à la pâte, merci d'avoir toujours la pêche. Christophe, merci de m'avoir mis dans le bain avec BD\_NGS.

Aux co-internes Toulousains qui ont fait que finalement, ces 2 ans et demi sont passés assez vite quand même. Mention spéciale à Alizée et Bastien pour ce top niveau 1, et puis Léa, comme dire, merci d'être toi xD

Aux co-internes Nîmois que je n'aurais pas connus sans les gardes, bon vent à tous.

Aux équipes de l'IFB / PTA Rangueil / hémato IUC : chefs, techs, ingés et secrétaires, merci pour tout ce que vous m'avez fait découvrir pendant le niveau 1, et les gardes. Chaque semestre est un recommencement pour vous, mais on sait qu'on est vos préférés (jusqu'aux suivants...) !

A l'équipe des urgences de Purpan, grâce à qui je garde finalement un bon souvenir de ces gardes interminables, mais pleines d'humanité.

## **Avant l'internat**

Aux Pr Jean-Claude Chottard et Philippe Ascher : merci d'avoir fait l'École de l'Inserm, avec le soutien de la Fondation Bettencourt-Schueller par la suite.

Aux équipes qui ont encadré mon parcours de recherche : Frédéric et Gaspard puis Sylvie, Elodie, Stéphan et le Pr Touitou pour le M1 ; Arnaud et Gwenaëlle pour le M2 ; Thierry, Guy et Marie-Noëlle pour la thèse de sciences. Vous m'avez beaucoup appris.

Je vous dois beaucoup et ce parcours n'aurait pas été sans vous...

Aux thésards de l'IGMM, en particulier Serena et Tran : la thèse n'aurait pas été la même sans vous, les pizzas, le volley, les soirées labos avec heureusement pas que du labo...

Aux thésards de CBS<sup>2</sup> : Oussama, Andrés, Selma, Adeline, Tania, et puis tous les petits nouveaux (qui n'en sont plus depuis le temps !)... Ces 5 années associatives ont été un petit peu éprouvantes et incroyablement marquantes.

Aux Z'élus que j'ai côtoyés lors de ces campagnes et mandats qui ont été de super expériences. Merci à vous pour ces parenthèses hors du temps.

### **A mes amis**

Aux amis du tuto, l'ex-ATM<sup>2</sup> et les années d'après ont été une formidable aventure avec vous. Alice, Claire, Linda, Vincent, Jess, Chloé, Michou : les routes s'étirent avec le temps, mais peuvent aussi se rapprocher. Vous m'avez été indispensables en m'accompagnant tout au long de cette plus que décennie, votre soutien m'a été si précieux. En espérant de nouvelles aventures, notamment ces imprévisibles et inoubliables Jaudonnades...

A Nico, tu sais qu'il aura fallu genre 6 ans de fac pour qu'on se rencontre ? Notre soutien réciproque compte beaucoup pour moi et je suis heureux que tes projets se concrétisent.

A la Dream Team qui m'accueille depuis bientôt 5 ans, je suis ravi que vous soyez là.

Aux teams Hors-service, VLM, VOCA et VBSMT pour ces indispensables bouffées d'oxygène. Jérem, David (again !), Ben, et tous les autres... Vous me manquez déjà !

### **A ma famille**

Maman, Papa : merci pour tout. Merci de nous avoir offert cette enfance chaleureuse et déjà riche en aventures. Vous m'avez permis de suivre cette voie un peu alambiquée que j'ai toujours eue du mal à expliquer mais cette fois ça y est, la fac c'est fini ! (en théorie...)

Visseth : merci d'être toujours là. Je sais que je peux toujours compter sur toi et c'est tout simplement énorme. Bopha : merci aussi d'être là. Sache que je suis heureux de pouvoir être là quand tu en as besoin, ça compte beaucoup pour moi. Et merci à Fraxa de te supporter pour nous... xD

Papy, Mamie : je vous dois tout... Merci d'être toujours là pour prendre soin de nous.

Tata Pheap, Tonton Ny, Tonton Loth : vous êtes partis beaucoup trop tôt en laissant un vide immense. Nous avons eu une enfance heureuse avec vous et les valeurs que vous nous avez transmises sont précieuses. Vous me manquez beaucoup.



Enfin, merci à mon « 5ème élément » d'avoir chamboulé mon existence depuis bientôt 5 ans, ce qui est si long et si court à la fois vu tout ce chemin déjà parcouru et ses multiples péripéties. Je pourrais juste dire que tu as déjà tout synthétisé, ce qui est vrai, mais serait un peu facile... Alors pour le dire autrement, tu as ouvert des perspectives que je n'aurais envisagées, autour d'un chemin que je n'imagine pas parcourir sans toi. Merci pour nos voyages autour du globe, nos escapades imprévues, nos surprises, nos rires et sourires au quotidien. Car chaque journée est une aventure de plus. Nous construisons ce chemin ensemble petit à petit, et derrière chaque pic se cachent de magnifiques vallées et forêts luxuriantes (de la verdure !). Ce qui est génial dans notre voyage, c'est que le trajet est aussi beau que la destination... A toi qui n'es encore que ma « future femme », mais déjà bien plus que ma moitié. Merci pour tout ce que tu m'as déjà apporté, et pour tout ce qui reste à venir...

A mes déjà beaux-parents : merci pour votre présence et votre soutien inconditionnel.

Et pour vraiment terminer : merci à Lucky de nous avoir déjà fait découvrir que les nuits agitées ne sont qu'une étape à franchir, et d'être déjà un formidable compagnon !

*When life gets you down, you know what you gotta do?  
Just keep swimming. Just keep swimming. Just keep swimming, swimming,  
swimming.*

*Mais elle roule !  
Laura*

# Table des matières

Introduction .....	14
Généralités .....	14
Définitions .....	14
Epidémiologie .....	15
Eléments d'embryologie .....	16
Principaux facteurs de la détermination sexuelle.....	16
Développement précoce indéterminé des organes génitaux externes.....	18
Développement de l'urètre pénien.....	19
Génétique de l'hypospadias .....	21
Gènes impliqués dans le développement précoce du tubercule génital .....	21
Gènes impliqués dans le processus de masculinisation .....	22
Hypospadias et facteurs environnementaux.....	24
Problématique .....	25
Résultats .....	26
Discussion .....	48
Aspects cytogénétiques .....	48
Evaluation du rendement .....	49
Pertinence de l'analyse génétique dans l'hypospadias mineur .....	50
Bénéfices cliniques du diagnostic moléculaire .....	52
Limites de l'étude.....	53
Conclusion .....	56
Bibliographie.....	57

# Liste des illustrations

Figure 1 : Anatomie chirurgicale de l'hypospadias.....	15
Figure 2 : Classification des hypospadias selon la localisation du méat urétral. ....	15
Figure 3 : Déterminants moléculaires de la détermination et la différenciation sexuelle chez l'homme .....	17
Figure 4 : Tubercule génital humain à 9 semaines de gestation. ....	20
Figure 5 : formation de l'urètre, analysée par tomographie par projection optique (parties supérieures) et immunohistochimie (partie inférieure) .....	20
Figure 6 : Voie classique de synthèse des androgènes. ....	23
Tableau 1 : Récapitulatif des précédentes études NGS dans le cadre de 46,XY DSD .....	50

# Liste des abréviations

ACPA : Analyse Chromosomique sur Puce à ADN  
ACMG : American College of Medical Genetics and Genomics  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
AKR1C3 : Aldo-keto réductase famille 1 membre C3  
AMH : Hormone anti-müllérienne  
AR : Androgen Receptor  
BMP : Bone Morphogenetic Protein  
CNV : Copy Number Variation  
DES : Diéthylstilbestrol  
DHT : Dihydrotestostérone  
DHX37 : DEAH-Box Helicase 37  
DSD : anomalies du développement et de la différenciation sexuelle (*Disorders of Sex Development*)  
FGF : Fibroblast Growth Factor  
GATA4 : GATA Binding Protein 4  
HMG : High Mobility Group  
HSD3B2 : 3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase 2  
HSD17B3 : Testostérone 17 $\beta$ -déshydrogénase 3  
MAMLD1 : Mastermind Like Domain Containing 1  
MID1 : Midline 1  
NGS : Next Generation Sequencing  
NR5A1 : Nuclear Receptor Subfamily 5 Group A Member 1  
OGE : Organes Génitaux Externes  
PAR1 : Pseudoautosomal Region 1  
PFMG : Plan France Médecine Génomique  
PML : PML Nuclear Body Scaffold  
PolyPhen-2 : Polymorphism Phenotyping v2  
RARA : Retinoic Acid Receptor Alpha  
RAR $\beta$  : Retinoic Acid Receptor Beta  
REVEL : Rare Exome Variant Ensemble Learner  
RSV : Rare Sequencing Variant  
SOX9 : SRY-Box Transcription Factor 9  
SF-1 : Steroidogenic Factor-1  
SHH : Sonic Hedgehog  
SHOX : Short Stature Homeobox  
SIFT : Sorting Intolerant From Tolerant  
SRD5A2 : Steroid-5 $\alpha$  reductase  
SRY : Sex-determining Region of Y chromosome  
VSI : Variant de signification inconnue (= VUS)  
WNT: wingless-type MMTV integration site family  
WT1 : Wilm's Tumor 1

# Introduction

## Généralités

### Définitions

Les anomalies du développement et de la différenciation sexuelle (ou DSD pour *Disorders of Sex Development*) regroupent une variété de phénotypes où le sexe chromosomique, gonadique ou anatomique est atypique <sup>1</sup>. Ces termes ont été définis lors de la Conférence de Consensus de Chicago en 2005, suite à une meilleure compréhension des bases moléculaires de ces affections et une nécessité sur le plan éthique. En effet, les termes autrefois employés (comme intersexué, pseudohermaphrodisme, hermaphrodisme, ou réversion sexuelle) étaient perçus comme péjoratifs par les patients et parfois source de confusion pour leurs parents et les professionnels de santé. Dans les DSD les plus fréquents, on observe l'association d'un hypospadias plus ou moins sévère, d'un micropénis et/ou d'une cryptorchidie, avec un caryotype 46,XY. Ces formes appelées « 46,XY DSD » peuvent notamment résulter d'une anomalie de la détermination testiculaire ou d'un défaut de virilisation, lié à une insuffisance dans la synthèse ou l'action des androgènes. Le micropénis se définit par une taille du pénis inférieure à -2,5 écarts-types pour l'âge ou le stade pubertaire, soit inférieure à 25 mm pour un nouveau-né à terme. La cryptorchidie résulte d'une anomalie de migration du testicule, entre l'aire lombaire et le scrotum. Elle peut être unilatérale (le plus souvent) ou bilatérale, liée ou non à la persistance de résidus müllériens (dysgénésie gonadique d'origines multiples), congénitale ou acquise, temporaire physiologique ou pauci-pathologique (avant 6 ans, ou testis ascenseurs) ou permanente, et nécessiter leur abaissement pour préservation de la fertilité. L'hypospadias, qui peut également s'observer à l'état isolé (sans autre anomalie des organes génitaux externes (OGE)) est une malformation résultant d'une hypoplasie congénitale de la face ventrale du pénis. On observe alors (Figure 1) :

- une implantation ectopique, trop précoce, du méat urétral,
- une hypoplasie du corps spongieux, qui se divise en deux piliers juste en amont du méat ectopique,
- une hypoplasie du tissu cutané,
- dans les cas les plus sévères, une couture de la verge.

Figure non reproduite par respect du droit d'auteur :

Mouriquand PDE, Mure P-Y. Current concepts in hypospadiology. BJU Int. 2004;93 Suppl 3:26-34.  
<http://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2004.04706.x>

Figure 1

Figure 1 : Anatomie chirurgicale de l'hypospadias, montrant l'hypoplasie triangulaire de la face ventrale de la verge <sup>2</sup>.

La position du méat urétral définit le type d'hypospadias et sa sévérité : antérieur (de balanique à pénien antérieur), pénien moyen, pénien postérieur, pénoscrotal à périnéal (Figure 2).

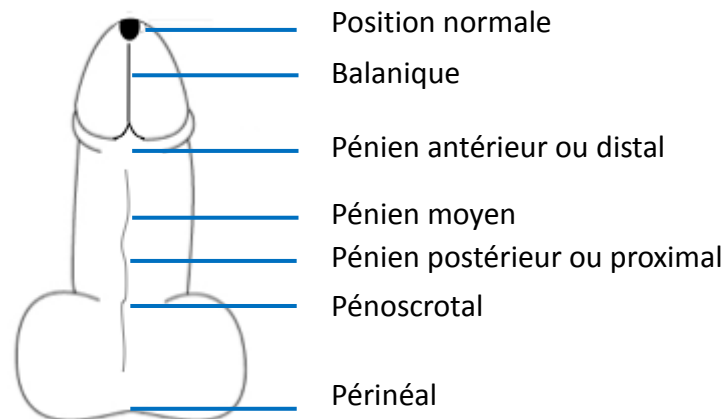


Figure 2 : Classification des hypospadias selon la localisation du méat urétral.

## Epidémiologie

Les données les plus récentes issues de 27 programmes de surveillance réalisés entre 1980 et 2010 indiquent une prévalence globale de 20,9 pour 10 000 naissances <sup>3</sup>,

soit une estimation d'environ 1 garçon atteint sur 250, avec des différences considérables selon les pays (de 2,1 à 39,1 pour 10 000 naissances), probablement liées à différents facteurs, pouvant inclure un défaut d'évaluation. Cette prévalence à la naissance serait, de plus, en augmentation avec le temps, indépendamment de l'évolution des pratiques cliniques ou de la sévérité de l'hypospadias<sup>3,4</sup>. Les causes de cette augmentation ne sont pas encore clairement établies et pourraient impliquer des facteurs de risque tels que l'exposition à des perturbateurs endocriniens, le retard de croissance intra-utérin, mais aussi un degré d'hérédité avec l'amélioration des pratiques chirurgicales permettant à plus d'enfants opérés de devenir pères par la suite<sup>5</sup>.

L'hypospadias concernerait ainsi environ 1500 garçons chaque année en France, ce qui en fait la 2<sup>ème</sup> anomalie congénitale de l'appareil génital masculin, après la cryptorchidie. On estime qu'il est antérieur dans 75 % des cas, moyen dans 10 % des cas, tandis que les formes plus sévères concernent 15 % des patients. Il s'agit donc d'un problème de santé publique relativement important étant donné la prise en charge chirurgicale, médicale voire psychologique nécessaire.

## Eléments d'embryologie

Sans détailler de façon exhaustive l'embryologie du système génital, il est intéressant de rappeler quelques notions concernant la détermination sexuelle et le développement des OGE masculins.

### Principaux facteurs de la détermination sexuelle

De façon générale, le développement embryonnaire répond à un programme génétique et épigénétique complexe, activé dans un ordre précis, qui organise la croissance et la différenciation cellulaire dans le temps et dans l'espace, avec une régulation hormonale et/ou *via* des facteurs de croissance et de différenciation. Les mécanismes de la détermination sexuelle sont extrêmement variables d'une espèce à l'autre.

Chez l'homme, est d'abord déterminé lors de la fécondation le sexe chromosomique (chromosomes sexuels XY chez l'homme et XX chez la femme) ou



génétique (présence du gène *SRY* chez l'homme). Jusqu'à la 7<sup>ème</sup> semaine de gestation, les gonades restent indifférenciées. Elles ont ainsi la particularité d'être bipotentielles. De même, à ce stade, les OGE mâles et femelles sont impossibles à distinguer. A partir de la 8<sup>ème</sup> semaine, l'expression de *SRY* dans les crêtes génitales masculines constitue un tournant (*switch*) et implique de nombreux facteurs (Figure 3).

Figure non reproduite par respect du droit d'auteur :

Bashamboo A, McElreavey K. Mechanism of Sex Determination in Humans: Insights from Disorders of Sex Development. *Sex Dev.* 2016;10(5-6):313-325.  
<http://doi.org/10.1159/000452637>

Figure 2

Figure 3 : Déterminants moléculaires de la détermination et la différenciation sexuelle chez l'homme <sup>6</sup>.

En amont, *WT1* est un régulateur transcriptionnel bien connu en tant que suppresseur de tumeur, impliqué dans le néphroblastome ou tumeur de Wilms. Il possède également une isoforme (*KTS*) capable de transactiver *SRY* (par liaison à l'ADN au niveau des éléments cis-régulateurs) et est ainsi indispensable à la morphogénèse du système uro-génital, puisqu'il déclenche l'expression de *SRY* dans les cellules de Sertoli, en synergie avec *GATA4* (*GATA Binding Protein 4*) <sup>7</sup>. Les variants de *WT1* altérant la transactivation de *SRY* sont donc pathogènes et responsables de 2 syndromes génito-urinaires : le syndrome de Denys-Drash (sclérose mésangiale diffuse avec néphropathie glomérulaire et insuffisance rénale précoce, risque élevé de néphroblastome, 46,XY DSD caractérisé par une dysgénésie gonadique variable avec déficit en hormone anti-

müllérienne (AMH)) pour les substitutions touchant l'exon 8 ou l'exon 9, et le syndrome de Frasier (sclérose focale, insuffisance rénale tardive, risque probablement plus faible de néphroblastome, mais dysgénésie gonadique complète) lorsqu'un variant dans l'intron 9 modifie le ratio entre les isoformes de WT1 <sup>8</sup>.

*NR5A1* code un récepteur nucléaire orphelin, SF-1, qui agit comme facteur de la transcription pour participer à l'activation de *SOX9* <sup>9</sup>. Il est notamment exprimé dans les cellules de Leydig et de Sertoli, et favorise la synthèse des stéroïdes.

SRY est un facteur de transcription central dans la détermination sexuelle puisqu'il déclenche la différenciation testiculaire alors que son absence (caryotype XX) ou sa dysfonction (avec un caryotype XY) ne permet pas le développement testiculaire, entraînant une évolution ovarienne. Il possède un domaine de liaison à l'ADN dit HMG (*high mobility group*) qui lui permet de courber l'ADN. Sa principale fonction serait d'activer l'expression d'un gène codant un autre facteur de transcription, *SOX9*. *SOX9* active l'expression de la prostaglandine-D synthase. La production de prostaglandine D2 est indispensable au recrutement de cellules de soutien qui se différencieront en cellules de Sertoli, les premières à se différencier dans le testicule. De plus, *SOX9* et SF-1 coopèrent pour réguler positivement l'expression de l'AMH <sup>10</sup>, ce qui permet la régression des canaux de Müller et la stimulation de la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig. Le dosage de *SOX9* est par ailleurs critique puisque la délétion ou la duplication d'éléments de régulation situés en amont de *SOX9* sont respectivement responsables de 46,XY DSD ou d'une différenciation testiculaire dans le cadre de 46,XX DSD, en l'absence de *SRY* <sup>11</sup>.

Plus que SRY, *SOX9* est donc l'élément-clé, nécessaire et suffisant (en l'absence de SRY) pour le développement testiculaire. *SOX9* est en fait impliqué de façon globale dans le développement embryonnaire, son altération pouvant être responsable de dysplasie campomélique, mais aussi en pathologies acquises <sup>12</sup>.

### Développement précoce indéterminé des organes génitaux externes

A la 3<sup>ème</sup> semaine de gestation, la membrane cloacale s'étend jusqu'à la base du cordon ombilical. Progressivement, pendant la 4<sup>ème</sup> semaine, la formation de la paroi abdominale sous-ombilicale et la prolifération du mésenchyme la repoussent en direction

caudale. Lors de la 5<sup>ème</sup> semaine, les plis cloacaux se développent de part et d'autre de la membrane cloacale, et se rejoignent à leur extrémité antérieure pour former l'ébauche du tubercule génital. A la 7<sup>ème</sup> semaine, le développement du périnée aboutit à la séparation de la membrane cloacale : la partie ventrale forme la membrane urogénitale, dont dérive la plaque urétrale, tandis que la partie dorsale forme la membrane anale, qui donnera l'orifice anal. De même, chaque pli cloacal se sépare en pli urogénital et pli anal. La morphologie des OGE masculin et féminin est donc identique, jusqu'à la 9<sup>ème</sup> semaine.

### Développement de l'urètre pénien

Simultanément à la différenciation gonadique, le déclenchement de la stéroïdogénèse permet aux OGE de passer d'une phase de développement non hormono-dépendante à une phase hormono-dépendante : la production d'androgènes testiculaires entraîne l'élongation du tubercule génital et l'apparition du sillon urétral, ce qui oriente vers la formation d'un pénis. La formation de l'urètre masculin a été décrite notamment à l'aide d'échantillons génitaux fœtaux de la 7<sup>ème</sup> à la 17<sup>ème</sup> semaine gestationnelle, analysés en tomographie par projection optique et immunohistochimie<sup>13</sup>. A 9 semaines, la plaque urétrale apparaît clairement au niveau de la ligne médiane (Figure 4A). En coupe histologique, se distinguent les 3 feuilletts embryonnaires. L'ectoderme donnera l'épiderme pénien et préputial ; le mésoderme les tissus érectiles, le derme et le stroma ; l'endoderme le futur urètre (Figure 4B). Le mécanisme de son développement est décrit comme une « double fermeture éclair » (*zipper* ou *zip*) (Figure 5). Le premier *zip* (d'ouverture) entraîne un étirement de la fente uro-génitale depuis le méat urétral, qui se forme initialement au niveau de la jonction péno-scrotale. Une prolifération importante (marqueur Ki67) au niveau dorsal de la plaque urétrale permet probablement l'ouverture progressive de cette gouttière ainsi qu'un rapprochement concomitant des replis génitaux, dans un étirement selon un axe proximo-distal. Puis, la fusion de ces replis lors du second *zip* (de fermeture) formera progressivement l'urètre. Il s'agit donc d'une tubulisation progressive du pénis, jusqu'au positionnement normal du méat urétral obtenu à la 17<sup>ème</sup> semaine gestationnelle. En parallèle aux marquages Ki67, des marquages caspase 3 ont aussi été réalisés mais sont restés négatifs<sup>13</sup>. La tubulisation normale de l'urètre ne semble donc pas nécessiter d'apoptose.

Figure non reproduite par respect du droit d'auteur :

Baskin L, Shen J, Sinclair A, et al. Development of the human penis and clitoris. *Differentiation*. 2018;103:74-85. <http://doi.org/10.1016/j.diff.2018.08.001>

Figure 3

Figure 4 : Tubercule génital humain à 9 semaines de gestation. A) La plaque urétrale est clairement visualisée. B) Sur la coupe histologique correspondante, les 3 feuillets embryonnaires sont identifiés <sup>14</sup>.

Figure non reproduite par respect du droit d'auteur :

Li Y, Sinclair A, Cao M, et al. Canalization of the urethral plate precedes fusion of the urethral folds during male penile urethral development: the double zipper hypothesis. *J Urol*. 2015;193(4):1353-1359. <http://doi.org/10.1016/j.juro.2014.09.108>

Figure 1

Baskin L, Shen J, Sinclair A, et al. Development of the human penis and clitoris. *Differentiation*. 2018;103:74-85. <http://doi.org/10.1016/j.diff.2018.08.001>

Figure 4

Figure 5 : Formation de l'urètre humain, analysée par tomographie par projection optique (parties supérieures) et immunohistochimie (partie inférieure). Le sillon urétral (flèches rouges) est bien visualisé autour de la 10<sup>ème</sup> semaine de gestation avec progression puis fusion de l'extrémité des replis génitaux pour former l'urètre (flèches jaunes). Une intense prolifération cellulaire (D-G) est montrée par le marqueur Ki67 <sup>14</sup>. De la 13<sup>ème</sup> à la 17<sup>ème</sup> semaine, fermeture progressive du sillon urétral, jusqu'au positionnement normal du méat urétral (flèches vertes) <sup>13</sup>.

Le diagnostic d'un hypospadias est en principe réalisable en anténatal, lors de l'échographie morphologique du 2<sup>ème</sup> trimestre, qui est réalisée entre la 22<sup>ème</sup> et la 24<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée (soit 20 à 22 semaines de gestation). La publication de cas sévères<sup>15</sup> indique qu'il s'agit en réalité d'un diagnostic difficile. C'est d'autant plus le cas lorsque l'hypospadias est antérieur et isolé, bien que les performances diagnostiques puissent être améliorées par la combinaison des méthodes en deux et trois dimensions<sup>16</sup>. La prévalence élevée de l'hypospadias pose néanmoins la question d'une évaluation échographique systématique des organes génitaux, au-delà de la détermination du sexe fœtal.

## Génétique de l'hypospadias

L'hypospadias aurait une héritabilité élevée, avec un risque de récurrence supérieur à 10 % pour le frère d'un cas index et supérieur à 1 % pour un parent au 3<sup>ème</sup> degré<sup>17</sup>. Le patrimoine génétique semble donc contribuer de façon importante à la survenue d'un hypospadias. De nombreux gènes candidats ont ainsi été étudiés.

## Gènes impliqués dans le développement précoce du tubercule génital

La morphogenèse du tubercule génital implique de nombreuses voies de signalisation. La voie de signalisation Hedgehog est une des plus importantes dans l'embryogenèse. Chez la souris, le gène *Sonic Hedgehog (Shh)* est exprimé dynamiquement lors du développement précoce des OGE, il régule l'expression de *Bmp4*, *Hoxd13* et *Fgf10* dans le tubercule génital, module probablement en faveur de la prolifération plutôt que l'apoptose, et sa délétion empêche le développement des OGE<sup>18</sup>. L'expression de *SHH* est retrouvée chez l'homme dans l'épithélium urétral avec un pic observé lors de la 14<sup>ème</sup> semaine de gestation, ce qui coïncide avec la tubulisation urétrale<sup>19</sup>.

La voie *canonical wingless-type MMTV integration site family (WNT)* est par ailleurs intriquée avec la voie Hedgehog, puisque cette dernière active l'expression de *Wnt5a* dans le tubercule génital. La voie Wnt/ $\beta$ -caténine serait importante au niveau endodermique pour activer et maintenir l'expression du facteur de croissance des

fibroblastes (FGF, pour *fibroblast growth factors*) *Fgf8*, qui dirigerait la croissance du tubercule génital. Chez l'homme, des altérations pathogènes de *WNT5A* sont retrouvés chez les patients présentant un syndrome de Robinow, qui associe petite taille, hypoplasie génitale avec hypospadias et anomalies craniofaciales<sup>20</sup>.

Les gènes homéotiques Hox interviennent de façon globale dans le développement embryonnaire. Ainsi, des variants pathogènes du gène *HOXA13* sont responsables du syndrome « main-pied-utérus » (*hand-foot-genital syndrome*)<sup>21</sup>, caractérisé par des malformations des membres et des malformations urogénitales, notamment un hypospadias plus ou moins sévère chez les garçons. Chez la souris, *Hoxa13* interviendrait d'une part dans la vascularisation du pénis, et serait d'autre part indispensable à l'expression de *Fgf8* et du gène de la protéine morphogénétique osseuse (*bone morphogenetic protein*) *Bmp7* dans l'épithélium de la plaque urétrale, mais aussi du récepteur aux androgènes<sup>22</sup>. Des variants dans *BMP7*, mais aussi *BMP4*, *HOXA4* et *HOXB6* ont par la suite été décrits chez des patients porteurs d'hypospadias sévère<sup>23</sup>, mais leur pathogénicité reste discutable, certains patients portant par ailleurs d'autres variants probablement pathogènes dans les gènes *SRD5A2* (codant la stéroïde-5 $\alpha$  réductase et décrit ci-après) ou *MID1* (impliqué dans les anomalies de la ligne médiane, dont fait partie l'hypospadias).

### Gènes impliqués dans le processus de masculinisation

Le développement normal du pénis lors de la masculinisation répond en premier lieu aux éléments de la détermination sexuelle, décrits plus haut. Cependant, probablement du fait de leur importance précoce, les altérations de *WT1*, *SRY* ou encore *SOX9* ont plutôt été reliées à des tableaux sévères précédemment évoqués. Des variants de *NR5A1* sont généralement décrits chez des patients présentant un hypospadias sévère voire un micropénis, et chez 1 patient avec un hypospadias antérieur isolé<sup>24</sup>. Le gène *MAMLD1* est un cas un peu particulier puisqu'il est localisé sur le chromosome X, et donc présent en 1 seule copie chez les individus 46,XY. La protéine MAMLD1 serait exprimée dans le testicule dès le stade fœtal et serait importante pour le développement sexuel du fœtus et plus tard pour la reproduction, mais sa fonction exacte est mal connue. Des variants à l'état hémizygote de *MAMLD1* ont été retrouvés chez des patients porteurs d'un hypospadias, en général sévère. Il semblerait que seuls soient pathogènes les

variants non-sens et les variants faux-sens entraînant une perte de fonction, représentée par la capacité à transactiver le promoteur de *CYP17A1*<sup>25,26</sup>.

Figure non reproduite par respect du droit d'auteur :  
Bouty A, Ayers KL, Pask A, Heloury Y, Sinclair AH. The Genetic and Environmental Factors Underlying Hypospadias. *Sex Dev.* 2015;9(5):239-259.  
<http://doi.org/10.1159/000441988>  
Figure 3

Figure 6 : Voie classique de synthèse des androgènes. Celle-ci a lieu dans les cellules de Leydig et permet la production de testostérone et de dihydrotestostérone (DHT), à partir de cholestérol. Ces hormones sexuelles sont importantes pour la phase hormono-dépendante du développement pénien et leur déficit contribue à l'hypospadias. Des variants impliqués dans l'hypospadias ont été décrits dans les gènes codant les enzymes marquées d'une étoile orange<sup>32</sup>.

### Synthèse des androgènes

Des défauts de plusieurs enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse ont été rapportés dans la littérature (Figure 6). Une altération de *CYP11A1* à l'état homozygote a été décrite chez un patient 46,XY présentant un hypospadias moyen associé à une insuffisance surrénalienne tardive<sup>27</sup>. La 3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase 2 (*HSD3B2*) catalyse l'oxydation des précurseurs  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hydroxystéroïdes en  $\Delta^4$ -cétostéroïdes. Son déficit impacte donc l'ensemble des hormones stéroïdiennes et les altérations bialléliques de *HSD3B2* conduisent généralement à un tableau d'hyperplasie congénitale des surrénales avec 46,XY DSD sévère (hypospadias, micropénis, scrotum bifide) et déshydratation avec perte de sel pouvant être évocatrice. Un hypospadias moyen non-syndromique serait également possible<sup>28</sup>. Plus en aval, la testostérone 17 $\beta$ -déshydrogénase 3 (*HSD17B3*) permet la conversion de l'androstènedione en testostérone. Les altérations bialléliques de *HSD17B3* ont d'abord été impliquées dans

des 46,XY DSD sévères de transmission autosomique récessive<sup>29</sup>, et plus récemment dans des hypospadias sévères<sup>30</sup>. Pour terminer sur la voie classique de la stéroïdogénèse, la stéroïde-5 $\alpha$  réductase de type 2 (SRD5A2) convertit la testostérone en dihydrotestostérone (DHT). Cette dernière se lie au récepteur aux androgènes (AR) avec une plus grande affinité que la testostérone et possède donc une plus forte action masculinisante sur les OGE. Comme pour *HSD17B3*, en cas d'altération biallélique de *SRD5A2*, le phénotype est variable. Enfin, il existe une voie alternative de synthèse de DHT dans laquelle l'altération de l'aldo-keto réductase famille 1 membre C3 (*AKR1C3*) pourrait contribuer à l'hypospadias<sup>31</sup>.

### Résistance aux androgènes

Le gène du récepteur aux androgènes (*AR*) est localisé sur le chromosome X. Il code un facteur de transcription de la superfamille des récepteurs nucléaires, présent dans le pénis et l'urètre durant l'embryogenèse, où il permet de répondre aux androgènes produits par les gonades. Lorsqu'il est altéré se développe un syndrome d'insensibilité aux androgènes, qui peut être complet ou partiel selon l'impact au niveau protéique. Le tableau est plus sévère en présence de variant non-sens, ou faux-sens qui déstructurent fortement un des domaines en doigt de zinc et neutralisent sa capacité de transactivation<sup>33</sup>. Des variants à l'état hémizygote de *AR* ont également été décrits dans le cas d'hypospadias isolé, sans micropénis, alors que le micropénis est un signe principal d'insensibilité partielle aux androgènes<sup>34</sup>.

### Hypospadias et facteurs environnementaux

Le développement des OGE est également sous l'influence de facteurs environnementaux et notamment hormonaux. L'exposition de femmes au diéthylstilbestrol (DES) durant leur grossesse serait responsable d'un sur-risque d'hypospadias chez leurs petits-fils<sup>35</sup>. L'exposition à des perturbateurs endocriniens pendant la grossesse serait également un facteur de risque<sup>36</sup>. Sont également suspectés les expositions en rapport avec les professions parentales (solvants, polluants) ou leur lieu de résidence (pollution environnementale), le petit poids de naissance voire le retard de croissance intra-utérin, l'hypertension, la pré-éclampsie, le surpoids, la consommation de



toxiques. Cependant les études sont parfois contradictoires, et peuvent subir des biais du fait de leur caractère rétrospectif ou de leur possible lien avec une susceptibilité génétique<sup>32</sup>.

## Problématique

Les capacités de séquençage génétique ont considérablement évolué dans la dernière décennie et ont permis d'explorer de façon plus large les formes les plus sévères de DSD. Conformément aux précédentes prévisions<sup>37</sup>, les patients aujourd'hui adressés pour un hypospadias associé à une autre anomalie génitale se voient en principe proposer une exploration génétique. Cependant, faute d'études correspondantes, aucune recommandation n'existe à ce jour concernant les patients présentant un hypospadias isolé, sans autre anomalie génitale, alors même qu'il existe une variabilité phénotypique pour un variant donné<sup>38</sup>. Dans ce contexte, nous avons complété l'analyse génétique d'une cohorte de 293 patients présentant un hypospadias simple/isolé (pas de micropénis, pas de cryptorchidie). L'étude du gène *AR* ayant précédemment identifié un variant pour 9 d'entre eux<sup>34</sup>, nous avons séquencé les 284 autres individus à l'aide d'un panel NGS composé de 336 gènes, connus pour leur implication dans les DSD ou gènes candidats, incluant des gènes exprimés dans le tubercule génital chez la souris<sup>39</sup>. Ce travail présente les résultats de ce séquençage en se focalisant sur les variants rares.

## Résultats

Les résultats de ces travaux sont présentés sous la forme d'un article présenté ci-après, soumis à *European Urology*. Dans ce travail de thèse, j'ai réalisé, pour l'ensemble de la cohorte, le tri, l'analyse *in silico* et l'interprétation des variants rares (à partir du fichier .vcf obtenu à l'issue de l'appel des variants) et des variations du nombre de copies (CNVs, pour *copy number variations*) à partir du tableur généré par l'outil bioinformatique MobiCNV développé au laboratoire (voir les méthodes de l'article). J'ai enfin créé les illustrations, rédigé la majorité de la première version et participé à la correction de l'article.

*Remarque : par souci de simplification, la bibliographie propre à l'article a été combinée avec la bibliographie de l'ensemble de cette thèse.*

## How far should we explore hypospadias?

### Next-generation sequencing applied to a large cohort of hypospadiac patients

EA Vuthy<sup>a,b,c</sup> (PhD), BERGOUGNOUX Anne<sup>a,b,c</sup> (PharmD, PhD), PHILIBERT Pascal<sup>a</sup> (PharmD, PhD), SERVANT-FAUCONNET Nadège<sup>a,c</sup>, FAURE Alice<sup>d</sup> (MD), BREAUD Jean<sup>e</sup> (MD, PhD), GASPARI Laura<sup>a,f</sup> (MD), SULTAN Charles<sup>a</sup> (MD, PhD), PARIS Françoise<sup>a,c,f</sup> (MD, PhD), KALFA Nicolas<sup>a,b,g\*</sup> (MD, PhD)

- a. Centre de Référence Maladies Rares DEGEN Constitutif Sud, CHU de Montpellier, France
- b. Laboratoire de Génétique de Maladies Rares, EA7402, Université de Montpellier, France
- c. Laboratoire de Génétique Moléculaire, IURC, CHU de Montpellier, France
- d. Service de Chirurgie et Urologie Pédiatrique, Hôpital la Timone, APHM, Marseille, France
- e. Service de Chirurgie et Urologie Pédiatrique, Hôpital Lenval, CHU de Nice, France
- f. Unité d'Endocrinologie Pédiatrique, Service de Pédiatrie, Hopital Arnaud de Villeneuve, Montpellier, France
- g. Chirurgie et Urologie Pédiatrique, Hôpital Lapeyronie, CHU de Montpellier, et Université de Montpellier, France

\*Corresponding author: Nicolas KALFA, MD, PhD

Full mailing address: 371 Av du Doyen Gaston Giraud, 34295 Montpellier, Cedex 5

Telephone number: +33 467 338 784

Fax number: + 33 467 339 512

E-mail address: [nicolaskalfa@gmail.com](mailto:nicolaskalfa@gmail.com)

Keywords: Hypospadias; Next-generation sequencing; Genetics; Disorders of sex development; DSD; Syndrome

**Words:** 2968

## ABSTRACT

Background: Next-generation sequencing (NGS) is generally used for patients with severe disorders of sex development (DSD). However, NGS has not been applied extensively for patients with hypospadias only, and most affected children do not benefit from an etiological diagnosis.

Objective: Evaluate the clinical interest of NGS for patients with hypospadias, regardless of severity.

Design, Setting and Participants: Prospective multicenter study including 293 children with anterior to penoscrotal hypospadias (no cryptorchidism, no micropenis). After excluding likely pathogenic *AR* variants by Sanger sequencing, an NGS panel tested 336 genes including unexplored candidates in 284 patients.

Outcome Measurements and Statistical Analysis: Diagnostic yield for pathogenic and likely pathogenic variants following American College of Medical Genetics and Genomics guidelines.

Results and Limitations: Sixteen likely pathogenic variants were identified, for a diagnostic yield of 5.5% with both Sanger sequencing and NGS taken into account. Some genes were related to DSD (*AR*, *NR5A1*, *HSD17B3*, *MAMLD1*), but reverse-phenotyping revealed two syndromic disorders with midline defects (*MID1*) and alteration in the retinoic acid signaling pathway (*RARA*). Coverage analysis revealed an 18q deletion. Diagnostic yield increased with hypospadias severity, but 63% of diagnoses were found in anterior hypospadias. Other variants of unknown significance (VUS) in genes implicated in hypogonadotropic hypogonadism, Noonan syndrome and genital tubercle development were also identified.

### Conclusions

NGS extends the list of genes linked to hypospadias, indicating that even patients with mild hypospadias benefit from advanced sequencing techniques. Early

molecular diagnosis would help improve follow-up at puberty and medical counseling for initially undiagnosed syndromes. Future studies will improve the diagnostic yield by investigating the contribution of VUS.

### Patient Summary

Next-generation sequencing enables simultaneous testing of numerous genes and should not be limited to DSD cases. Even patients with mild hypospadias would benefit from early diagnosis of a genetic defect implicated in sex development or other syndromes.

## INTRODUCTION

The disorders of sex development (DSD) include a broad range of congenital conditions in which the development of chromosomal, gonadal, or anatomical sex is atypical<sup>1</sup>. The most frequent situation is 46,XY DSD with severe hypospadias and associated micropenis and/or cryptorchidism, which poses both therapeutic and pathophysiologic challenges. Identifying the cause of DSD provides the rationale for optimal treatment, guides pubertal follow-up, and helps in parental counseling. Thus, patients with DSD usually benefit from an extensive hormonal and genetic exploration.

In contrast, patients with hypospadias, especially when it is mild and not associated with other genital abnormality, are underexplored in clinical routine. Hypospadias is at the less severe end of the DSD spectrum and is the second most frequent genital defect (1/150 to 1/250 boys), with an increasing prevalence over the years in some regions<sup>3</sup>. Hormonal disturbance and pubertal deficiency<sup>40</sup> are possible but these children usually do not benefit from multidisciplinary long-term follow-up. Undiagnosed genetic conditions may thus be deleterious in this population.

Various pathways are involved in the development of the genital tubercle (GT), including gonadal determination, steroidogenesis and several other signaling pathways: androgen receptor (AR), Hedgehog (HH), canonical wingless-type MMTV integration site family (WNT), fibroblast growth factor (FGF), and bone morphogenetic protein (BMP). Although all are suspected of contributing to hypospadias, few genes have been unambiguously linked to the mild phenotype. The *AR* gene was thought to be limited to severe DSD, but we identified pathogenic/likely pathogenic (P/LP) variants in mild hypospadias without micropenis or cryptorchidism<sup>34</sup>. This suggests the relevancy of genetic explorations including a wider range of genes and a wider range of phenotypes. Among the new candidate genes are those expressed in the GT, as revealed by gene expression profiling in the mouse urethral plate<sup>39</sup>; those expressed in the testis during the window of masculinization<sup>41</sup>; and those associated with hypospadias in knockout mice models. Evidence of all of them in human pathology is still lacking<sup>32</sup>.

Over the last decade, next-generation sequencing (NGS) has emerged as a powerful tool to investigate Mendelian disorders. Targeted NGS panels and whole exome sequencing (WES) are now diagnostic tools in severe DSD<sup>30,42-49</sup>, but their clinical value in mild isolated hypospadias is unknown. In the present prospective study, we designed an NGS panel of 336 known and candidate genes and explored a cohort of 284 patients with isolated hypospadias of various severities. Based on our findings of rare, likely and possibly deleterious variants, we propose to enlarge the spectrum of phenotypes that should benefit from genetic exploration.

## MATERIAL AND METHODS

### Patients

Two hundred and ninety-seven boys with simple hypospadias (no micropenis, no cryptorchidism) were prospectively included (newborn-12 years) in a multicenter study. This included the remaining *AR*-negative patients of our previous cohort<sup>34</sup>. Clinical diagnosis was made by direct clinical examination by a pediatric urologist and/or endocrinologist. Patients with known karyotype abnormalities were excluded (n=4: 2 Klinefelter syndrome, 1 mosaic 45,X/46,X,i(Y)(p10), 1 mosaic trisomy 14). The location of the urethral meatus ranged from glandular to perineal (glandular and penile anterior: n=204, midshaft: n=64, penile posterior: n=18, penoscrotal and perineal: n=7). Hypospadias was the reason for referral. Extra-genital phenotypes such as neurodevelopmental delay or ophthalmic signs were typically not diagnosed at the time of inclusion.

This study was approved by the Institutional Review Board of the institution (Centre Protection Personnes Sud-Méditerranée 4, CPPSMIV, ID-RCB-n°2008-A00781-54) and written consent was obtained from parents.

### Next-generation DNA sequencing

Most patients were first screened by Sanger sequencing, and LP/P/VUS (Likely pathogenic / Pathogenic / Variant of unknown significance) variants in *AR* were found in 9 patients, as previously reported<sup>34</sup>. Then, NGS was performed for the 284 remaining patients. Genes included in the NGS panel were selected using the OMIM database (keywords: hypospadias, genital differentiation, genital tubercle, disorder of sex development) and PubMed interrogation (keywords: hypospadias gene, external genitalia gene, genital tubercle development, disorder of sex development, midline gene, gonadal determination, sex differentiation gene). A gene was included in the panel if (1) variants of the gene were reported to be associated with hypospadias in humans; (2) variants of the gene were reported in a condition associated with hypospadias; (3) the gene was known to encode for a protein expressed in the GT, external genitalia or gonads in animal and human studies; or (4) an animal knock-out model for the gene exhibited a genital defect. The final panel included



336 genes (Supplementary data), representing 1.19 Mb that were sequenced with 35,181 probes. Details about sequencing, variant calling and data analysis can be found in Supplementary methods. For each rare sequencing variant (RSV), we took into account whether or not it was found in multiple patients, a control group of 288 healthy children, our in-house database, or the literature using LitVar<sup>50</sup> and VarSome<sup>51</sup>. RSVs located in new candidate genes were retained only if found in patients or already described in the literature. Last, RSVs were classified according to the 2015 American College of Medical Genetics and Genomics and Association for Molecular Pathology (ACMG-AMP)<sup>52</sup> using VarSome<sup>51</sup>.

## RESULTS

### Genes classically involved in genital defects

We first focused on a sub-panel of genes known to be involved in 46,XY DSD<sup>47</sup>. We found likely pathogenic (LP) variants in the *NR5A1* gene in 3 patients and 1 pathogenic (P) variant in the *MAMLD1* gene in another (Table 1a). We also identified 2 patients, each with 2 compound heterozygous variants in the *HSD17B3* gene. These 8 variants are rare (VAF range from 0 to 10<sup>-3</sup>) and 7 of them were absent in 288 normal boys. Five of these 7 variants are reported for the first time in hypospadias.

Interestingly, we found simple heterozygosity for 25 patients in DSD-associated genes usually linked to autosomal recessive inheritance (Table 1b), mainly *HSD17B3* and *SRD5A2*. Variants of unknown significance (VUS) were also identified in genes associated with autosomal dominant or X-linked inheritance in 8 patients (Table 1c).

### Syndromes revealed by hypospadias

We then looked for variants in genes responsible for syndromes where hypospadias is one of the main features, even though no syndrome had been diagnosed at the time of study inclusion. Using reverse-phenotyping, we identified 2 P/LP variants in *MID1* and *RARA* (Table 2a), which are respectively altered in X-linked Opitz G/BBB syndrome (OS) and another recently described syndrome<sup>53</sup>. The patient with the *MID1* variant and anterior hypospadias was ultimately diagnosed with facial asymmetry, a naso-ethmoidal dermoid cyst, nasal septum deviation and a coccygeal dermal sinus. The patient with the *RARA* variant was secondarily diagnosed with dysmorphic features, cervical vertebral fusion and scoliosis, hypotonia, clinodactyly, bronchial atrophy with bronchocele, right sigmoid kidney with fused kidneys, secondary retractile testis and moderate neurodevelopmental delay.

### New candidate genes

This NGS panel also screened new candidate genes reported in animal studies but not yet reported in human hypospadias. We found several likely pathogenic RSVs in new relevant genes (Table 2b). Most are involved in

congenital hypogonadotropic hypogonadism (CHH), which has not yet been linked to isolated hypospadias. We also found RSVs in genes implicated in the development of the GT (*SHH*, *WNT5A*) or Noonan syndrome and related disorders (NSRD) (*PTPN11*, *BRAF*). Last, we identified many VUS in other genes expressed in the GT, but definitive conclusions cannot be drawn due to limited *in silico* data.

#### Coverage analysis

Using MobiCNV, we checked that each patient had a chromosomal dosage compatible with a 46,XY karyotype. We found evidence for a *CYB5A* heterozygous deletion in a boy with midshaft hypospadias. He was then diagnosed with developmental delay, hypotonia, kidney asymmetry, epicanthus and clinodactyly. *CYB5A* is located on 18q22.3 and biallelic alterations of *CYB5A* can lead to methemoglobinemia and ambiguous genitalia (OMIM #250790). However, the remaining *CYB5A* allele was normal in our case and we hypothesized a distal 18q deletion, which is known to be associated with hypospadias<sup>54</sup>. Subsequent chromosomal microarray analysis confirmed a *de novo* 12.4 Mb heterozygous deletion (ISCN: arr[GRCh38] 18q22.1q23(63253358\_75721820)x1 *dn*, with Agilent 4x180K Microarray), which was assumed to be responsible for the whole clinical picture. No pathogenic RSV was found for this patient.

## DISCUSSION

### Overall performance of NGS in hypospadias

NGS provides higher throughput than Sanger sequencing and new opportunities to look for RSVs. Previous reports have mainly focused on complex DSD with severe phenotypes or uncertain sex, which are expected to be more often linked to monogenic etiology<sup>37</sup>. We report the first study applying NGS to a cohort of patients with mainly mild forms of hypospadias and no associated genital defects (micropenis or undescended testis). These phenotypes are usually not explored, in line with recommendations<sup>37</sup>. We provided a diagnosis for at least 16 patients (5.5%) but NGS performance may reach 24% in the near future if the next series confirm the role of VUS identified in our patients, whatever the mode of inheritance (Table 3, Figure 1). The role of simple heterozygosity in high candidate recessive genes (Table 1b) may also be underevaluated. A dose effect of gene expression or an associated variant located in an unexplored region of the gene or on the second allele is highly possible.

### No genotype-phenotype correlations in hypospadias

The diagnosis rate increased with hypospadias severity (Table 3), but most diagnoses (63%) were still found in patients with anterior hypospadias. We showed that *AR* variants may be related to a milder phenotype than expected<sup>34</sup>. We extended the phenotype associated with *NR5A1* and *RARA* variants and described VUS in new candidate genes. We applied strict criteria for considering a variant as pathogenic in our series, which may have resulted in an underestimation of the overall diagnostic yield. Incomplete penetrance can lead to a wide spectrum of phenotypes and the misinterpretation of real pathogenic variants as VUS. Examples in the *AR* gene include p.(Ala475Val) and p.(Pro492Ser), which are relatively frequent in the general population (VAF 0.001 and 0.004, respectively). The corresponding phenotypes may be isolated infertility or hypospadias of varying severity<sup>30,34,55,56</sup>. The ACMG-AMP guidelines suggest that these variants are VUS, but these guidelines might be too stringent for mild disorders because they do not take into account incomplete penetrance and variable expressivity. Some endocrine or fertility defects may indeed be

revealed later in life<sup>57</sup>—and may be directly related to the variants. Considering the young age of the patients, we were unable to address this point.

Similarly, biallelic *HSD17B3* variants are usually reported in severe genital defects, yet it is conceivable that a moderate alteration in gene dosage would explain the residual activity of the enzyme and the mild genital defect. Six out of 8 patients with *HSD17B3* single heterozygosity had minor hypospadias in our series. RSVs of *HSD17B3*, which is implicated in androgen biosynthesis, thus raise the question of the potential impact of mild haploinsufficiency in hypospadias.

## Syndromes

Hypospadias is reported in more than 200 syndromes but very few children at the time of hypospadias referral are diagnosed. In our series, no patient had a diagnosis of a syndrome at the time of inclusion. In some patients, secondary associated defects in accordance with our genetic findings were revealed over time. Others benefited from a complete work-up following our results. NGS for minor genital defects could thus be of interest early in life to optimize the diagnosis and follow-up of syndromic boys.

The *MID1* p.(Arg521Cys) variant was published once in a Chinese family with OS<sup>58</sup>. This midline genetic disorder, caused by alteration of the E3-ubiquitin ligase Midline-1, is mainly characterized by hypertelorism, hypospadias and laryngotracheoesophageal abnormalities (OMIM #30000) and is consistent with our patient's phenotype. The *RARA* p.(Arg276Trp) variant was only recently described in a girl with various abnormalities including coloboma, minor dysmorphic features, enlarged pulmonary trunk, additional spleen and ectopic left kidney<sup>53</sup>. Although incomplete, the overlap with our patient harboring the same variant is notable. This strong genotype-phenotype correlation is probably linked to the functional impact of Arg276 substitution on retinoic acid binding<sup>59</sup>. Undoubtedly, early diagnosis would have helped provide this patient with better care. Regarding the other RSVs we found in *RARA* (Table 2c), functional analyses or larger studies would help evaluate their contribution to hypospadias.

## New candidate genes

Given the limited number of genes directly linked to human hypospadias<sup>32</sup>, we investigated new candidate genes and report novel RSVs predicted as deleterious. Some are in genes mediating Hedgehog signaling (Table 2b). *SHH*, a gene altered in holoprosencephaly with incomplete penetrance and variable expressivity, is central in the development of the GT and involves *WNT5A* as a transcriptional target<sup>32,39</sup>. Pathogenic variants of *WNT5A* and subsequent alterations of the Hedgehog pathway may be associated with hypospadias, as in Robinow syndrome (OMIM # 180700). We identified several variants of *WNT5A* in patients with hypospadias only. Whether mildly deleterious RSVs in *WNT5A* could trigger hypospadias as an isolated sign of Robinow syndrome is intriguing.

We also found RSVs in genes involved in CHH (Table 2b). Hypospadias usually does not belong to the spectrum of CHH, but it is well documented that some patients with isolated hypospadias ultimately reveal endocrine dysfunction at puberty, including hypogonadotropic hypogonadism<sup>60</sup>. More recently, two series of Indonesian and Han Chinese boys with various degrees of undervirilization including hypospadias, reported variants in CHH genes, such as *PROKR2*, *WDR11*, *CHD7* or *FGFR1*, and not in DSD genes<sup>61,62</sup>. In our series, several patients exhibited heterozygous *PROKR2* variants and one of them should be considered as LP, according to VarSome. The definitive demonstration that RSVs in CHH genes induce hypospadias would nevertheless require long term follow-up during puberty.

Genes usually involved in NSRD (*PTPN11* and *BRAF*) may also explain the incomplete forms of Noonan syndrome that include hypospadias. Patient 41 with anterior hypospadias harbored the *PTPN11* p.(Arg152His) variant, which is located in a domain where missense variants are not expected to be responsible for NSRD<sup>63</sup>. This may explain a partial form of the syndrome limited to the genital defect. The rarity of this variant—absent from gnomAD—and its prediction as damaging are indeed intriguing. The same questions can be raised about loss-of-function variants like the *BRAF* deletion in a midshaft hypospadiac patient, since no similar case has been yet been documented.

## Chromosome number, structure and copy number variations (CNVs)

In addition to screening of RSVs, we were able to detect CNVs and identified a patient with a distal 18q deletion inferred from a *CYB5A* deletion. Cytogenetics analyses characterized the chromosomal abnormality and enabled appropriate genetic counseling. Targeted NGS may nevertheless miss balanced chromosomal rearrangements (except if a breakpoint is accurately sequenced with consistent coverage) and abnormalities not covered by the probe design.

## Challenging variants previously reported in the literature

Over the years, the suspicion has been that many variants contribute to hypospadias. Our results challenge previous findings. For instance, the p.(Ala215Thr) variant was described in *AKR1C3*<sup>31</sup>, a gene involved in backdoor androgen synthesis. In our cohort, we found no pathogenic missense variant but 4 truncating or frameshift-stop variants in this gene, 2 in patients and 2 in controls. This is consistent with *AKR1C3* haploinsufficiency being most likely benign (ExAC pLI=0, gnomAD LOEUF=1.86). Another typical example is the p.(Cys154Alafs\*62) variant on the *CBX2* isoform 2 (NM\_032647.3:c.460del). This variant was previously described in two 46,XY DSD patients, using WES<sup>64</sup>. We also found it in 5/285 patients. However, we identified this variant in 6/288 controls and in only one of 2 affected brothers. This finding is consistent with gnomAD (VAF=0.003) and this variant is likely benign on its own.

In conclusion, we report the first application of NGS in a large cohort of boys with isolated, mostly mild hypospadias. We were able to identify in our series either minor forms of DSD (*HSD17B3*, *AR*, *NR5A1*), undiagnosed syndromes (*RARA*, *MID1*), or candidate rare variants in new genes (Hedgehog pathway, CHH and NSRD genes). These results challenge the commonly accepted principle of exploring only patients with severe genital defects and illustrate the relevance of genetic exploration even in mild phenotypes. We thus suggest a reconsideration of the genital defects that are likely to benefit from NGS<sup>38</sup>. An accurate and early diagnosis is crucial to improve patient care. Although the question of the cost-effectiveness of screening hypospadiac patients remains debatable, NGS will help determine which patients would benefit from pubertal follow-up, later fertility evaluation, early diagnosis of syndrome, and optimal parental counseling.

Acknowledgments: we would like to thank H el ene Lehors (MD), Myriam Haddad (MD), Jean Michel Guys (MD), Rachel Reynaud (MD, PhD), Pierre Alessandrini (MD), Thierry Merrot (MD, PhD), Kathy Wagner (MD), Jean Yves Kurzenne (MD), Florence Bastiani (MD), Jean Stéphane Valla (MD), Gérard Morisson Lacombe (MD), Eric Dobremez (MD, PhD) for their help in the inclusion process. This work was supported by a public grant from the Programme Hospitalier de Recherche Clinique PHRCI UF8270 and by public funding from the National Reference Network for Rare Disease, Genital Development DSD DevGen.



Patient	Hypospadias	Gene	rsID	HGVS_transcript	HGVS_protein	ACMG	Found in control	gnomAD v2 VAF	REVEL score	REVEL interpretation
<b>a) P/LP variants</b>										
1	Anterior	<i>NR5A1</i>	rs762769507	c.763C>T	p.(Arg255Cys)	LP	-	4.9E-05	0.939	Damaging
2	Anterior	<i>NR5A1</i>	rs141502483	c.769G>A	p.(Asp257Asn)	LP	-	3.3E-05	0.412	Uncertain
3	Anterior	<i>NR5A1</i>	rs1478477850	c.779C>T	p.(Ala260Val)	LP	-	4.1E-06	0.308	Uncertain
4	Posterior	<i>MAMLD1</i>	-	c.885del	p.(Leu296TyrfsTer12)	P	-	0	N/A	N/A
5	Penoscrotal	<i>HSD17B3</i>	-	c.694_698delinsCCCATA	p.(Ser232ProfsTer18)	P	-	0	N/A	N/A
			rs139084702	c.133C>T	p.(Arg45Trp)	LP	2	1.8E-03	0.392	Uncertain
6	Anterior	<i>HSD17B3</i>	rs201115371	c.277+4A>T	p.?	P	-	3.3E-04	N/A	N/A
			rs372430180	c.902C>T	p.(Ala301Val)	LP	-	8.0E-06	0.110	Benign
<b>b) Simple heterozygous variants in genes associated with autosomal recessive inheritance</b>										
7	Penoscrotal	<i>HSD17B3</i>	rs201115371	c.277+4A>T	p.?	P	-	3.3E-04	N/A	N/A
8	Anterior	<i>HSD17B3</i>	rs191153391	c.139A>G	p.(Met47Val)	VUS	-	6.4E-05	0.390	Uncertain
9	Anterior	<i>HSD17B3</i>	rs139084702	c.133C>T	p.(Arg45Trp)	VUS	2	1.8E-03	0.392	Uncertain
10*	Anterior	<i>HSD17B3</i>	rs868469733	c.50G>A	p.(Cys17Tyr)	VUS	-	4.0E-06	0.480	Uncertain
11	Anterior	<i>HSD17B3</i>	rs200961609	c.329A>G	p.(Asp110Gly)	VUS	-	1.1E-04	0.366	Uncertain
12	Midshaft	<i>HSD17B3</i>	rs772813211	c.883C>T	p.(Leu295Phe)	VUS	-	1.6E-05	0.191	Benign
13	Posterior	<i>HSD17B3</i>	rs370264627	c.641A>G	p.(Glu214Gly)	VUS	1	1.2E-05	0.250	Uncertain
14	Anterior	<i>HSD17B3</i>	rs116436956	c.304A>T	p.(Ile102Phe)	VUS	-	2.7E-04	0.475	Uncertain
15	Midshaft	<i>HSD3B2</i>	-	c.453del	p.(Thr152LeufsTer22)	P	-	0	N/A	N/A
16	Posterior	<i>SRD5A2</i>	rs9332964	c.680G>A	p.(Arg227Gln)	LP	-	4.7E-04	N/A	N/A
17	Anterior	<i>SRD5A2</i>	rs34552434	c.644C>T	p.(Ala215Val)	VUS	-	1.6E-05	N/A	N/A
18	Anterior	<i>SRD5A2</i>	-	c.223C>G	p.(Leu75Val)	VUS	-	0	N/A	N/A
19	Anterior	<i>SRD5A2</i>	-	c.223C>G	p.(Leu75Val)	VUS	-	0	N/A	N/A
20*	Anterior	<i>DHH</i>	-	c.191A>T	p.(Glu64Val)	VUS	-	0	0.914	Damaging
21*	Midshaft	<i>STAR</i>	rs34908868	c.361C>T	p.(Arg121Trp)	VUS	-	1.7E-03	0.527	Damaging
22	Anterior	<i>STAR</i>	rs550388651	c.157C>G	p.(Arg53Gly)	VUS	-	8.5E-05	0.434	Uncertain
23	Anterior	<i>STAR</i>	rs779586809	c.164G>A	p.(Arg55Gln)	VUS	-	1.8E-05	0.239	Uncertain

<b>24</b>	Anterior	<i>POR</i>	rs199634961	c.344C>T	p.(Ala115Val)	VUS	-	1.8E-04	0.481	Uncertain
<b>25</b>	Anterior	<i>POR</i>	rs367810540	c.1115C>T	p.(Thr372Met)	VUS	-	1.8E-04	0.652	Damaging
<b>26</b>	Midshaft	<i>POR</i>	rs367810540	c.1115C>T	p.(Thr372Met)	VUS	-	1.8E-04	0.652	Damaging
<b>27</b>	Anterior	<i>POR</i>	rs782248163	c.1586C>T	p.(Thr529Met)	VUS	-	6.3E-05	0.435	Uncertain
<b>28</b>	Anterior	<i>POR</i>	rs72557954	c.1820A>G	p.(Tyr607Cys)	VUS	-	1.0E-04	0.752	Damaging
<b>29</b>	Anterior	<i>POR</i>	-	c.1988A>G	p.(Asp663Gly)	VUS	-	4.0E-06	0.516	Damaging

**c) Variants in genes associated with autosomal dominant or X-linked inheritance**

<b>30</b>	Posterior	<i>AR</i>	rs200390780	c.1424C>T	p.(Ala475Val)	VUS	-	1.4E-03	0.539	Damaging
<b>31</b>	Anterior	<i>AR</i>	rs758361525	c.1368_1370dup	p.(Gly473dup)	VUS	-	7.2E-04	N/A	N/A
<b>32</b>	Anterior	<i>NR5A1</i>	rs761496130	c.460G>A	p.(Ala154Thr)	VUS	-	2.2E-05	0.270	Uncertain
<b>21*</b>	Midshaft	<i>WT1</i>		c.1479T>G	p.(Ser493Arg)	VUS	-	0	0.252	Uncertain
<b>33</b>	Midshaft	<i>WT1</i>	rs138073760	c.830C>T	p.(Thr277Ile)	VUS	-	1.5E-05	0.415	Uncertain
<b>34</b>	Anterior	<i>DMRT1</i>	-	c.823-1G>C	p.?	VUS	-	0	N/A	N/A
<b>35</b>	Anterior	<i>SOX9</i>	-	c.92C>T	p.(Ala31Val)	VUS	-	0	0.283	Uncertain
<b>36</b>	Anterior	<i>WNT4</i>	rs369780122	c.742C>T	p.(Arg248Cys)	VUS	-	4.0E-05	0.460	Uncertain

**Table 1:** Variants found in genes classically involved in DSD. a) Indicates patients with pathogenic (P) or likely pathogenic (LP) variants (diagnosis confirmed). b) Indicates patients with a simple P, LP or variant of unknown significance (VUS) in a gene classically associated with autosomal recessive inheritance. c) Indicates patients with VUS in a gene classically associated with autosomal dominant or X-linked inheritance (might be incomplete penetrance). Patients presenting with multiple RSVs (either in Table 1 or Table 2) are shown with an asterisk (\*). VAF: variant allele frequency.

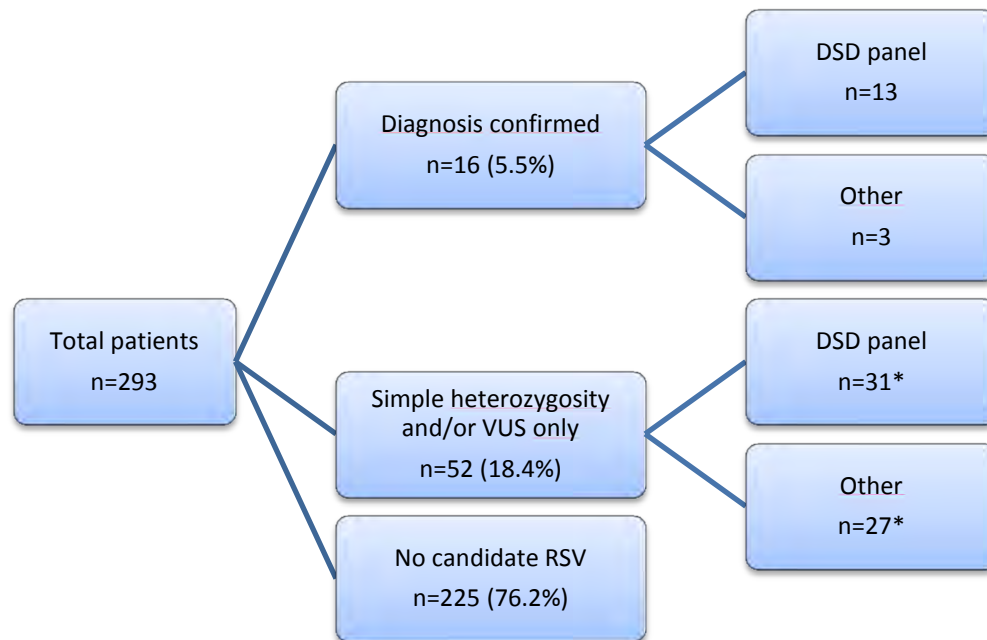
Patient	Hypospadias	Gene	rsID	HGVS_transcript	HGVS_protein	ACMG	Found in control	gnomAD v2 VAF	REVEL score	REVEL interpretation
<b>a) P/LP variants</b>										
<b>37</b>	Anterior	<i>MID1</i>	rs149482288	c.1561C>T	p.(Arg521Cys)	LP	-	5.1E-04	0.396	Uncertain
<b>38*</b>	Anterior	<i>RARA</i>	rs786205678	c.826C>T	p.(Arg276Trp)	LP	-	0	0.886	Damaging
<b>b) Simple heterozygous variants and other VUS</b>										
<b>39</b>	Midshaft	<i>RARA</i>	rs373673287	c.742G>A	p.(Gly248Ser)	VUS	-	4.0E-05	0.782	Damaging
<b>40*</b>	Posterior	<i>RARA</i>	-	c.72C>G	p.(Tyr24Ter)	VUS	-	0	N/A	N/A

<b>41*</b>	Anterior	<i>PTPN11</i>	rs397507521	c.455G>A	p.(Arg152His)	VUS	-	1.8E-05	0.727	Damaging
<b>42</b>	Midshaft	<i>BRAF</i>	-	c.16_40del	p.?	VUS	-	0	N/A	N/A
<b>43</b>	Posterior	<i>WNT5A</i>	-	c.487G>A	p.(Gly163Ser)	VUS	-	0	0.605	Damaging
<b>44</b>	Anterior	<i>WNT5A</i>	-	c.895C>A	p.(Leu299Met)	VUS	-	0	0.817	Damaging
<b>45</b>	Anterior	<i>WNT5A</i>	-	c.65C>T	p.(Ser22Phe)	VUS	-	0	0.303	Uncertain
<b>46</b>	Anterior	<i>WNT5A</i>	rs781527130	c.907G>A	p.(Asp303Asn)	VUS	-	4.0E-06	0.416	Uncertain
<b>47</b>	Posterior	<i>SHH</i>	rs746239519	c.1373C>A	p.(Ala458Glu)	VUS	-	0	0.473	Uncertain
<b>48</b>	Midshaft	<i>SHH</i>	-	c.935G>C	p.(Gly312Ala)	VUS	-	0	0.932	Damaging
<b>40*</b>	Posterior	<i>SHH</i>	-	c.581A>G	p.(Lys194Arg)	VUS	-	0	0.687	Damaging
<b>49</b>	Anterior	<i>SHH</i>	-	c.247G>A	p.(Asp83Asn)	VUS	-	0	0.834	Damaging
<b>50</b>	Posterior	<i>WDR11</i>	-	c.86G>A	p.(Trp29Ter)	VUS	-	0	N/A	N/A
<b>38*</b>	Anterior	<i>WDR11</i>	rs745856006	c.2243A>G	p.(His748Arg)	VUS	-	8.0E-06	0.413	Uncertain
<b>51</b>	Anterior	<i>WDR11</i>	rs745952055	c.3331C>T	p.(Arg1111Trp)	VUS	-	1.2E-05	0.835	Damaging
<b>52</b>	Posterior	<i>WDR11</i>	-	c.3518-47_3522dup	p.?	VUS	-	0	N/A	N/A
<b>53</b>	Anterior	<i>GNRHR</i>	rs104893837	c.785G>A	p.(Arg262Gln)	VUS	1	1.8E-03	0.726	Damaging
<b>54</b>	Midshaft	<i>FGFR1</i>	-	c.455C>T	p.(Ala152Val)	VUS	-	0	0.421	Uncertain
<b>55</b>	Anterior	<i>KAL1</i>	rs375767556	c.1921G>A	p.(Gly641Arg)	VUS	-	4.4E-05	0.730	Damaging
<b>56</b>	Anterior	<i>PROKR2</i>	rs149992595	c.868C>T	p.(Pro290Ser)	VUS	-	1.3E-04	0.939	Damaging
<b>57</b>	Midshaft	<i>PROKR2</i>	-	c.747G>C	p.(Glu249Asp)	VUS	-	8.0E-06	0.287	Uncertain
<b>58</b>	Midshaft	<i>PROKR2</i>	rs149396342	c.403C>T	p.(Arg135Cys)	VUS	-	5.0E-05	0.266	Uncertain
<b>20*</b>	Anterior	<i>CHD7</i>	-	c.3202G>A	p.(Gly1068Ser)	VUS	-	0	0.828	Damaging
<b>10*</b>	Anterior	<i>CHD7</i>	rs369550114	c.7591C>T	p.(Arg2531Trp)	VUS	-	2.5E-05	0.558	Damaging
<b>41*</b>	Anterior	<i>CHD7</i>	rs187751757	c.8740G>A	p.(Gly2914Arg)	VUS	-	2.9E-04	0.399	Uncertain
<b>59</b>	Anterior	<i>HHAT</i>	-	c.498C>G	p.(Tyr166Ter)	VUS	-	0	N/A	N/A
<b>60</b>	Anterior	<i>PROP1</i>	rs121917842	c.218G>A	p.(Arg73His)	VUS	-	8.0E-06	0.763	Damaging

**Table 2:** Variants found in syndromic and candidate genes. a) Indicates patients with a likely pathogenic (LP) variant (diagnosis confirmed). b) Indicates patients with variants in candidate genes. In the absence of consistent evidence of pathogenicity (e.g., clinical data, functional analyses), these were all classified as VUS. Patients presenting with multiple RSVs (either in Table 1 or Table 2) are shown with an asterisk (\*).

	Patient number	Diagnosis by Sanger	Diagnosis by NGS	Overall diagnoses	Overall yield	Proportion by severity
Anterior	204	4	6	10	4.9%	63%
Midshaft	64	2	1	3	4.7%	19%
Posterior	18	1	1	2	11.1%	13%
Penoscrotal	7		1	1	14.3%	6%
<b>Total</b>	<b>293</b>	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>16</b>	<b>5.5%</b>	<b>100%</b>

**Table 3:** Diagnostic yield analysis, according to hypospadias severity. Only P/LP variants (confirmed diagnosis) were considered.



**Figure 1**

Summary of findings of our genetic analyses (NGS and Sanger, combined). Data are separated by result and by type of gene. \*2 patients had only VUS and/or simple heterozygosity in both DSD panel and other genes.

## SUPPLEMENTARY DATA

### List of loci included in the targeted NGS panel

ACPP	CCL2	DMD	FOXA2	IL16	MTHFR	RARA	STAR
AGPS	CDC6	DMRT1	FOXF2	IL17RE	MTOR	RBM33	STARD3
AF230335	CDKN1C	DMRT2	FOXH1	INS-IGF2	MYH6	RET	STON1- GTF2A1L
AHR	CDT1	DRD1	FOXL2	INSL3	NCAM1	RIPK4	STS
AHRR	CDON	EFNB1	FREM2	IRF6	NEK1	ROR2	SUFU
AKAP10	CES3	EFNB2	FZD1	JF432473	NGF	RP5	SYS1- DBNDD2
AKR1C2	CHD7	EGF	GADD45B	KAL1	NGFR	RSPO1	TBC1D8
AKR1C3	CHRNA3	EHMT1	GADD45G	KCTD1	NIPBL	RFXP2	TBX3
AKR1C4	CITED2	ELAVL3	GATA4	KDR	NODAL	RXRA	TCF4
ALDOA	CLDN3	EMX2	GAS1	KIF7	NOTCH1	RXRB	TDGF1
ALG12	CLDN6	ENTPD3	GFRA1	KISS1	NR0B1	RXRG	TGFB1
ALX4	CLDN7	EPG5	GLI1	KISS1R	NR1I2	S100A6	TGFB2
AMH	CNTNAP3	EPHA6	GLI2	KLF6	NR2F1	SALL1	TGFB3
AMHR2	CPA6	EPHA7	GLI3	KLRD1	NR5A1	SETBP1	TGFBR1
ANO9	CSPP1	EPHB2	GLI4	KRAS	NSD1	SEZ6L2	TGFBR2
ANTXR1	CTNNA1	EPHB3	GLS2	KRT19	NTF3	SIM1	TGFBR3
APOA1	CTGF	EPS8L3	GNPAT	KRT6A	OBSL1	SIX1	TGIF1
AR	CUL7	ESCO2	GNRH1	KRT7	ODF2L	SIX3	THBS4
ARHGGEF19	CYB5A	ESR1	GNRHR	KRT8	ORC1	SHH	TMEM70
ARHGGEF33	CYP2B6	EU751619	GPC3	LEP	ORC4	SKI	TP63
ARID1A	CYP3A4	EVC	GPR1	LEPR	ORC6	SLC16A12	TSPYL1
ARID1B	CYP3A7- CYP3AP1	EVC2	GRID1	LETM1	PAX2	SLC4A1	UBR1
ARNT	CYP1B1	EVX2	GSTM1	LHB	PAX3	SMARCB1	UPK1B
ARNT2	CYP11B1	EYA1	HBA1	LHX3	PAX6	SMARCE1	VAMP7
ARX,	CYP11B2	FABP1	HBB	LMBR1	PCDH17	SMARCA4	VEGFA
ASB14	CYP1A1	FAM46C	HDAC4	LOC100507443	PDCD6	SMC1A	VEGF
ATF3	CYP1A2	FBLN2	HHAT	LPHN2	PDGFRA	SMC2	WDR11
ATRX	CYP11A1	FBXW2	HLA-DRB1	MACC1	PEX1	SMO	WHSC1
B3GALT1	CYP17A1	FGD1	HMGXB3	MAL2	PEX7	SNURF	WNT3A
BCOR	CYP19A1	FGF4	HNF1B	MAMLD1	PIP	SPATA12	WNT4
BMP2	CYP24A1	FGF8	HOXA4	MAP3K1	PITX2	SPATA16	WNT5A
BMP4	CYR61	FGF9	HOXB13	MAP3K4	PLXNB3	SOS1	WT1
BMP7	DENND1C	FGF17	HOXD11	MAPK8	POR	SOX2-OT	WTAP
BNC2	DGKH	FGFR1	HOXD12	MAPK9	PPARGC1B	SOX3	WWC2
BNIPL	DGKK	FGFR2	HOXD13	MECP2	PROP1	SOX7	WWOX
BRAF	DHCR7	FGFR3	HPGDS	MED12	PTCH1	SOX8	ZEB1
C1QA	DHH	FIG4	HSD3B2	MID1	PTGDS	SOX9	ZEB2
CAB39L	DISP1	FKBP4	HSD17B2	MIR548AZ	PTPN11	SOX10	ZFPM2
CACNA1B	DLL1	FKBP5	HSD17B3	MIR7851	PROKR2	SRCAP	ZIC2
CBX2	DLL3	FLNA	HSD17B10	MKKS	PUS3	SRD5A1	ZNF214
CCDC8	DLX5	FLNB	IFT122	MPEG1	R3HDM1	SRD5A2	ZNF215
CCL15- CCL14	DLX6-AS1	FOXA1	IL10	MSX1	RAF1	SRY	ZMPSTE24

## SUPPLEMENTARY METHODS

### Targeted NGS panel

Genomic DNA was captured using Agilent's in-solution enrichment methodology with their biotinylated oligonucleotide probe library, followed by paired-end 2×75 bp massive parallel sequencing on Illumina HiSeq4000<sup>65</sup>. Sequence capture, enrichment and elution were performed according to the manufacturer's protocols (SureSelect, Agilent) without modification except for library preparation performed with the NEBNext® Ultra Kit (New England Biolabs®). For library preparation, 200 ng of each genomic DNA was fragmented by sonication and purified to yield fragments of 150-200 bp. Paired-end adaptor oligonucleotides from the NEB Kit were ligated to repaired A-tailed fragments, then purified and enriched by 8 PCR cycles. Next, 1200 ng of these purified libraries were hybridized to the SureSelect oligo probe capture library for 72 hr. After hybridization, washing and elution, the eluted fraction was PCR-amplified with 9 cycles, purified and quantified by qPCR to obtain sufficient DNA template for sequencing. Image analysis and base-calling were performed using Illumina Real-Time Analysis (v2.7.7).

### Variant calling and data analysis

Reads were aligned to the human genome build hg38/GRCh38.p7 using the Burrows-Wheeler Aligner tool<sup>66</sup>. Duplicated reads were removed using Sambamba software<sup>67</sup>. Variant calling of single-nucleotide variants (SNVs) and small insertions/deletions (indels) was performed using the Broad Institute's

GATK HaplotypeCaller tool<sup>68</sup>. Reliable SNVs and small indels were then selected using the following filters according to GATK best practices: —PAS” filter, QualByDepth <2, RMSMappingQuality <40, MappingQualityRankSumTest <-12.5, FisherStrand >60 for SNVs (200 for indels) and ReadPosRankSumTest <-8 for SNVs (-20 for indels).

Data analysis was performed using in-house tools: MPA<sup>69</sup>, Captain ACHAB (<https://github.com/mobidic/Captain-ACHAB>) and MobiDetails (Baux *et al.*, submitted / <https://mobidetails.iurc.montp.inserm.fr/MD/>) for rare sequencing variants (RSVs) annotation and curation, and MobiCNV (<https://github.com/mobidic/MobiCNV>), which relies on inter-sample normalized depth of coverage per probe, in order to highlight potential copy number variations (CNVs). Variants reported in gnomAD (v2.1, general population) with a variant allele frequency (VAF) >0.01 for a dominant hypothesis or >0.05 for a recessive inheritance were filtered out. We used REVEL, an ensemble method that was trained with pathogenic and rare neutral variants<sup>70</sup>, to remove likely benign rare missense variants (REVEL score <0.2), except if a second P/LP variant was found in a patient’s gene with an expected autosomal recessive inheritance. In such cases, compound heterozygosity was only assumed because parental DNA was not available. SNVs, including missense, synonymous and intronic (up to +20/-20 bp from exonic boundaries) variants were assessed for potential splice impact using SpliceAI<sup>71</sup> and dbSNV<sup>72</sup>.

## Discussion

Notre étude est la première à avoir réalisé une exploration génétique large, par panel de gènes en NGS, chez des patients présentant un hypospadias isolé sur le plan génital. Dans notre cohorte, 16 patients ont obtenu un diagnostic moléculaire de certitude, soit 5,5 %. Pour beaucoup d'autres, il sera intéressant de réanalyser à distance les données en fonction de nouvelles connaissances, des possibilités d'analyses fonctionnelles, voire de l'apparition de nouveaux signes cliniques.

### Aspects cytogénétiques

Au total, le taux de diagnostic génétique s'élève à 6,7 %, en comptant les 4 patients présentant une anomalie détectée au caryotype. Nous pouvons à ce sujet noter que pour ces 4 patients, notre panel NGS n'aurait décelé une anomalie que pour les 2 patients présentant un syndrome de Klinefelter : l'outil bioinformatique MobiCNV aurait en effet détecté une anomalie homogène de dosage des chromosomes sexuels, mais n'est, à l'heure actuelle, pas adapté à l'identification de trisomie en mosaïque.

Le caryotype en mosaïque 45,X/46,X,i(Y)(p10) à environ 50 % pour chaque lignée dans le sang total n'aurait pas non plus été détecté par NGS du fait du design du panel utilisé, qui ne comprenait que le gène *SRY* pour le chromosome Y. Localisé sur le bras court du Y, ce patient en possède donc 2 copies sur son isochromosome Yp dans 50 % des cellules sanguines et 0 copie dans les 50 % restantes, soit une moyenne à 1, identique au nombre de chromosome X. Pour ce patient, le résultat du caryotype a conduit au diagnostic de dyschondrostéose de Léri-Weill, conséquence d'une haploinsuffisance du gène *SHOX*. Ce gène se situe dans la région pseudoautosomale PAR1 des gonosomes X (en Xp22.33) et Y (en Yp11.32) et son haploinsuffisance est responsable d'une dysplasie squelettique, incluant une petite taille, caractéristique partagée avec le syndrome de Turner<sup>73</sup>. Ce type de mosaïque est classiquement observé suite à un remaniement du chromosome Y (qui devient alors instable et plus facilement perdu lors de la division cellulaire), et peut être une cause fréquente de 46,XY DSD<sup>74</sup>.

Par ailleurs, parmi les 2 patients présentant un syndrome de Klinefelter, si l'un avait bien un caryotype classique 47,XXY, l'autre présentait un caryotype particulier



46,X,der(X)t(X;Y). La présence du gène *SRY* par translocation sur un chromosome X doit être détectée car elle modifie alors le conseil génétique. Les anomalies génitales ne sont pas particulièrement fréquentes dans le syndrome de Klinefelter <sup>75</sup>, mais leur présence doit motiver la réalisation d'un caryotype qui posera le diagnostic, probablement plus tôt que pour les patients sans anomalie génitale, et permettra une meilleure prise en charge du patient <sup>76</sup>.

Enfin, le patient porteur de la délétion 18q rappelle l'importance du phénotypage, qui doit permettre l'identification d'un tableau syndromique. Il justifie en effet la réalisation d'une analyse chromosomique sur puce à ADN (ACPA) une fois la normalité du caryotype établie <sup>38</sup>.

Pour ces raisons, bien que potentiellement informatif, un panel NGS ne peut donc remplacer une analyse cytogénétique par caryotype, qui reste indiqué en première intention devant un DSD, complété par une ACPA si nécessaire. Eventuellement, ce type d'anomalies chromosomiques pourrait être observé par séquençage du génome entier, sous réserve d'une couverture suffisante, y compris des points de cassure, et à un coût bien supérieur <sup>77</sup>. Des méthodes cytogénétiques de nouvelle génération seraient plus adaptées <sup>78</sup>.

## Evaluation du rendement

Notre rendement diagnostique est inférieur à ceux obtenus dans les études actuellement disponibles dans la littérature (Tableau 1). Bien qu'elles ne soient pas toutes comparables entre elles, notamment par différences de stratégie diagnostique (1<sup>ère</sup> ou 2<sup>ème</sup> intention, pré-exclusion de diagnostics réalisés en Sanger, ciblage sur le gène *DHX37*) ou taille des panels, ces études ont en commun d'avoir étudié une population de patients présentant un 46,XY DSD sévère dans la majorité des cas. Pour les patients présentant un hypospadias, celui-ci était généralement au moins pénien postérieur et/ou associé à un micropénis ou une cryptorchidie. Il apparaît compréhensible que le rendement augmente avec la sévérité du tableau clinique, ce qui semble également le cas pour nos travaux. L'étude la plus proche portait sur 130 patients chinois présentant un hypospadias : leur rendement global était de 15 % mais aucun variant causal n'a été identifié pour les 25 patients présentant un hypospadias isolé <sup>79</sup>, ce qui n'est pas surprenant pour un faible

nombre de patients. Pour les 20 patients identifiés comme porteurs de variants pathogènes, le tableau typique associant à un hypospadias moyen à postérieur la présence d'un micropénis voire une cryptorchidie. De façon cohérente, ces variants se situent majoritairement dans le gène *SRD5A2*, entraînant un déficit en DHT. A noter que les 3 variants les plus impliqués dans cette étude chinoise (p.(Arg227Gln), p.(Gly203Ser) et p.(Gln6Ter)) sont plus fréquemment retrouvés dans la population est-asiatique : ils y ont une fréquence allélique de  $10^{-4}$  à  $10^{-2}$  d'après gnomAD, contre  $10^{-5}$  dans la population européenne non-finnoise et 0 dans la plupart des autres populations. Les anomalies génitales pourraient donc avoir des origines génétiques différentes, étant donné la fréquence variable des variants *SRD5A2* en fonction des régions du monde <sup>80</sup>.

Article	Population étudiée	Nombre de gènes dans le panel	Rendement diagnostique
<b>Baxter</b> <sup>42</sup>	46,XY DSD sévères, en 1ère intention	64	14/40 = 35 %
<b>Dong</b> <sup>43</sup>	46,XY DSD sévères, en 1ère intention	219	6/13* = 46 %
<b>Eggers</b> <sup>30</sup>	46,XY DSD sévères, en 1ère ou 2ème intention	64	106/278* = 38 %
<b>Kim</b> <sup>44</sup>	46,XY DSD sévères, en 1ère ou 2ème intention	67	13/37 = 35 %
<b>Fan</b> <sup>45</sup>	46,XY DSD modérés, en 1ère intention	80	9/27 = 33 %
<b>Wang</b> <sup>46</sup>	46,XY DSD modérés, en 1ère intention	80	30/70 = 43%
<b>Hughes</b> <sup>47</sup>	46,XY DSD sévères, en 1ère ou 2ème intention	30	25/73 = 34 %
<b>Buonocore</b> <sup>48</sup>	46,XY DSD modérés à sévères après exclusion HSD17B3 AR SRD5A2	168	16/52 = 31 %
<b>McElreavey</b> <sup>49</sup>	GD, TRS, PS, anorchie après exclusion DSD classique	Exome + séquençage ciblé <i>DHX37</i>	13/146 = 9 %
<b>Zhang</b> <sup>79</sup>	Hypospadias + micropénis et/ou cryptorchidie	105	20/130* = 15 %

Tableau 1 : Récapitulatif des précédentes études NGS dans le cadre de 46,XY DSD. \* Pour ces études, le rendement diagnostique a été recalculé ici après reclassement si nécessaire de variants considérés comme potentiellement pathogènes par les auteurs, en variants de signification inconnue (VSI) après utilisation plus stricte des recommandations ACMG, ou en bénins suite à la réalisation d'analyses fonctionnelles <sup>81</sup>, pour permettre une meilleure comparaison des rendements.

### Pertinence de l'analyse génétique dans l'hypospadias mineur

Notre étude confirme l'implication d'altérations génétiques y compris pour des patients porteurs d'un hypospadias mineur, ce qui était déjà connu pour *NR5A1* <sup>24</sup> et *AR* <sup>34</sup>, mais pas pour *HSD17B3*. Les patients porteurs d'altérations dans ces gènes ont plutôt été décrits avec un hypospadias sévère voire un DSD <sup>30</sup>. Or, il n'existe pas de franche corrélation génotype-phénotype décrite pour les variants altérant ces gènes : nos

variants de *NR5A1* ont précédemment été décrits chez des femmes présentant une insuffisance ovarienne prématurée pour p.(Arg255Cys)<sup>82</sup>, et un DSD 46,XX pour p.(Ala260Val)<sup>83</sup>; par ailleurs, d'autres variants *NR5A1* sont responsables de ce duo « insuffisance ovarienne prématurée chez les femmes » et « hypospadias / 46,XY DSD chez les hommes » dans une même famille, avec une pénétrance incomplète et une expressivité variable<sup>84</sup>. Pour *HSD17B3*, les données actuelles ne permettent pas de décrire une corrélation génotype-phénotype. Il semblerait que le tableau soit plus sévère en présence de variants non-sens bialléliques<sup>30,85</sup>, tandis que pour les variants faux-sens, la variabilité pourrait dépendre de l'activité résiduelle de la protéine altérée<sup>47</sup>, mais aucune analyse fonctionnelle de ces variants n'a été publiée à ce jour.

Par rapport au séquençage ciblé du gène *AR*, cette analyse par panel NGS permet de doubler le rendement diagnostique. Les altérations de *AR* restent au premier rang dans notre cohorte de patients présentant un hypospadias isolé. S'agissant d'un mode de transmission lié à l'X, les femmes sont conductrices, sans expression phénotypique particulière, ce qui facilite la fixation des variants dans la population générale. Dans ces conditions se pose la question de réaliser en 1<sup>ère</sup> intention un séquençage ciblé de *AR*, avant de proposer une analyse NGS s'il revient normal. En pratique, le clinicien ciblera plus facilement sa demande devant un tableau typique d'insensibilité partielle aux androgènes, qui associe à l'hypospadias un micropénis voire une cryptorchidie et des dosages sériques de testostérone et d'AMH normaux à élevés en néonatal. Cependant, l'analyse en NGS permet d'intégrer des régions régulatrices et/ou transcrites mais non codantes, dans lesquelles peuvent aussi se situer des altérations pathogènes<sup>86</sup>.

La possibilité d'identifier des altérations moléculaires au-delà de la sphère des DSD est également à noter. La présence dans notre cohorte d'un patient porteur d'une anomalie de la ligne médiane (*MID1*) est en accord avec une précédente série de 114 patients avec hypospadias et dans laquelle 1 variant pathogène *MID1* avait été détecté<sup>87</sup>. Ces travaux suggéraient déjà qu'un hypospadias associé avec un hypertélorisme pouvaient correspondre à une forme mineure de syndrome d'Opitz G/BBB. Le phénotype présente cependant une variabilité, y compris intra-familiale, sur la présence de l'hypospadias comme des autres signes cliniques, dont les troubles neurodéveloppementaux<sup>88</sup>.

En outre, nous décrivons le 2<sup>ème</sup> patient porteur d'une altération germinale probablement pathogène du gène *RARA* (p.(Arg276Trp)), plus connu pour son implication dans la leucémie aiguë promyélocytaire avec transcrite de fusion *PML-RARA*<sup>89</sup>, ainsi que 2 patients porteurs de variants de signification inconnue (VSI). La première patiente a été rapportée en 2019 grâce à une approche par séquençage d'exome, indiqué du fait de la présence d'un tableau syndromique associant notamment un colobome chorio-rétinien droit, une dysmorphie (sourcils arqués, colobome irien droit, une racine du nez large, des joues pleines), un retard développemental, et au bilan d'imagerie un tronc pulmonaire dilaté, une rate surnuméraire et un rein gauche ectopique<sup>53</sup>. Le caractère pathogène de ce variant avait été retenu sur sa transmission *de novo*, son absence des populations témoins, sa localisation dans un domaine de liaison au ligand avec des simulations montrant le rôle du résidu Arg276 dans la liaison à l'acide rétinoïque et l'impact de la substitution (p.(Arg276Trp)), le fait que sa survenue dans le gène de fusion *PML-RARA* confère une résistance thérapeutique à l'acide tout-*trans* rétinoïque par diminution de liaison<sup>59</sup>, et la ressemblance du tableau clinique avec la microphthalmie syndromique associée à *RARB*. *RARA* est ainsi également un gène d'intérêt en pathologies constitutionnelles, et on peut s'attendre à retrouver d'autres variants liés une résistance à l'acide tout-*trans* rétinoïque<sup>90</sup>. Pour notre patient, en l'absence de prélèvements parentaux le caractère *de novo* n'a pu être établi mais reste le plus probable. Il avait bénéficié d'une exploration génétique des gènes impliqués dans le syndrome de Noonan, revenue négative. A la suite des analyses cytogénétiques et par panels de gènes, ce cas illustre le bénéfice de l'approche par exome pour identifier de nouveaux gènes candidats et conduire au diagnostic.

### Bénéfices cliniques du diagnostic moléculaire

De manière générale, l'obtention d'un diagnostic moléculaire permet de donner au patient et à sa famille une étiologie à l'hypospadias, un conseil génétique avec enquête génétique familiale, et une prise en charge plus adaptée. Une altération de *AR* fera surveiller la bonne localisation des testicules, évaluer la pertinence d'une supplémentation androgénique, notamment en amont de la chirurgie de l'hypospadias<sup>91</sup> puis à la puberté en cas de micropénis, anticiper l'apparition d'une gynécomastie ou encore une infertilité<sup>33</sup>. Pour *NR5A1*, nous avons vu que l'enquête génétique familiale est

indispensable <sup>84</sup>. Là encore, il faudra anticiper une infertilité, probablement en rapport avec une forme mineure de dysgénésie gonadique <sup>92</sup>. Les données sont plus incertaines pour les altérations pathogènes de *MAMLD1*, mais un modèle murin <sup>93</sup> et une revue récente de la littérature <sup>94</sup> laissent supposer que la production d'androgène et la fertilité ne seraient pas fortement atteintes. La situation est légèrement différente pour les altérations pathogènes bialléliques de *HSD17B3* (et *SRD5A2*, bien que non retrouvées dans cette étude), qui posent surtout le problème de la virilisation à la puberté pour les patients assignés vers un genre féminin à la naissance, avec une éventuelle réassignation. L'hypospadias isolé ne pose pas de problème d'assignation mais dans ce cadre doit se discuter une supplémentation androgénique. La fertilité est possible mais nécessitera probablement le recours à une assistance médicale à la procréation. Enfin, nous avons vu la possibilité de diagnostic précoce de tableaux syndromiques, avec prise en charge plus précoce de troubles neurodéveloppementaux par exemple.

### Limites de l'étude

Si nous avons pu identifier des altérations moléculaires pathogènes dans certains cas, la grande majorité reste cependant à ce jour sans explication sur le plan génétique. En particulier, notre cohorte comporte 7 fratries (dont 1 paire de jumeaux monozygotes) pour lesquels 2 frères atteints ont bénéficié du NGS, sans identifier de variant probablement causal en commun. Pour ces patients, la présomption génétique est forte mais les connaissances actuelles restent insuffisantes. Un variant pathogène pourrait être présent dans une région non explorée, un autre gène, ou avoir été détecté mais sans arguments de pathogénicité suffisants pour poser le diagnostic moléculaire. En effet, si les gènes du panel ont été sélectionnés en fonction d'une implication connue ou supposée dans le développement génital, il est difficile de s'avancer pour des variants présents dans des gènes dont la fonction exacte est mal connue, ou qui sont impliqués en pathologie humaine mais non situés dans des domaines importants pour la fonction protéique, et/ou pour lesquels des analyses fonctionnelles ne sont pas disponibles. Dans ce genre de situations, l'impact potentiel est souvent estimé à l'aide d'outils de prédiction *in silico*. SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant*) et PolyPhen-2 (*Polymorphism Phenotyping v2*) sont parmi les plus connus pour les substitutions d'acides aminés. Ils s'appuient sur des comparaisons d'homologie de séquence et des propriétés physiques des acides

aminés pour calculer un score de pathogénicité. Nous avons préféré utiliser REVEL (*Rare Exome Variant Ensemble Learner*), qui fournit un score plus global, obtenu par méthode d'apprentissage automatique (ou *machine learning*) à l'aide de 13 algorithmes différents et spécifiquement entraîné à détecter les variants faux-sens rares mais neutres, qui posent problème puisqu'ils ne peuvent être écartés simplement sur la fréquence allélique<sup>70</sup>. REVEL laisse cependant une large zone grise. Plus récemment, d'autres algorithmes utilisant également l'intelligence artificielle ont été publiés, comme ClinPred<sup>95</sup> ou MISTIC<sup>96</sup>. Cependant si ces prédictions fournissent des critères cotés dans les recommandations ACMG, elles restent insuffisantes pour affirmer la pathogénicité de variants. D'autres travaux sont donc indispensables pour affiner le tri des variants retrouvés et les retenir comme potentiellement pathogènes. Ils permettront également de mieux définir, dans le cadre d'un panel, quels gènes doivent être conservés pour le diagnostic, à des fins de recherche, ou retirés du panel pour limiter le coût du NGS (réactifs, durée d'analyse notamment requise pour l'interprétation, stockage des données).

En parallèle, le diagnostic étiologique de l'hypospadias isolé bénéficiera potentiellement des possibilités de séquençage d'exome, voire de génome complet. Les DSD sévères non expliqués font en effet partie des premières pré-indications retenues dans le Plan France Médecine Génomique (PFMG) 2025 (<https://pfm2025.aviesan.fr/>), ce qui permettra très probablement l'identification de nouveaux gènes<sup>97</sup>.

Ce travail s'est focalisé sur l'analyse des variants rares, c'est-à-dire rapportés dans gnomAD avec une fréquence allélique inférieure à 1 % ou 5 %, respectivement pour une hypothèse de transmission dominante ou récessive, et des CNVs. Un nombre important de variants fréquents a également été identifié. Avant l'avènement du NGS, des études d'association pangénomiques avaient identifié des variants communs (> 1 %) comme d'importants facteurs de risque d'hypospadias<sup>98,99</sup>. L'hypothèse du gène *DGKK* s'est malheureusement avérée décevante par la suite<sup>100</sup>, bien que ces variants puissent représenter des marqueurs alléliques d'autres variants pathogènes. Peut également se questionner la contribution d'une combinaison de plusieurs variants, certains auteurs ayant suggéré un possible oligogénisme pour expliquer des DSD sans cause monogénique évidente<sup>101</sup>. De telles hypothèses sont cependant difficile à prouver.

Enfin, un ensemble de facteurs environnementaux est également impliqué dans l'hypospadias, dont des substances nocives métabolisées par diverses enzymes <sup>32,36</sup>. Un certain nombre de cas n'aura donc probablement pas d'origine génétique particulière, quand d'autres pourraient être multifactoriels et découler d'une exposition environnementale survenant sur un terrain génétique impliquant des variants altérant les propriétés des enzymes concernées. L'environnement influence de plus les processus physiologiques, comme le développement. L'exposition environnementale peut entraîner des réponses phénotypiques, y compris indépendamment du génotype, en provoquant des modifications épigénétiques. De façon générale, ces modifications épigénétiques, comprenant des variations dans la méthylation de l'ADN, des modifications des histones, l'expression d'ARN non-codants, des changements dans la structure de la chromatine, sont connus et décrits en situations pathologiques <sup>102</sup>. Récemment, une équipe a ainsi montré par études d'associations pan-épigénomiques la persistance de marques de méthylation de l'ADN dans le prépuce de patients au moment de la chirurgie de leur hypospadias, par rapport au prépuce de patients témoins <sup>103</sup>. Celles-ci se situent au niveau de gènes impliqués dans la différenciation cellulaire, la voie de signalisation bêta-caténine, le métabolisme des androgènes, ou encore la fonction reproductive. Les modifications épigénétiques constituent donc une future piste d'études des déterminants moléculaires et de la physiopathologie de l'hypospadias.

## Conclusion

Ce travail montre que l'exploration de patients porteurs d'un hypospadias isolé conduit à l'identification d'une origine génétique dans au moins 5 à 15 % des cas, selon la sévérité de l'atteinte. Il est donc pertinent de ne plus restreindre cette exploration à des phénotypes plus complexes. Le diagnostic moléculaire oriente en effet la prise en charge médicale, chirurgicale et psychologique des patients et de leur entourage, tout en renforçant la pertinence du conseil génétique : discussions autour de l'enquête génétique familiale, du risque de récurrence, de la variabilité phénotypique notamment. L'élargissement de l'indication génétique améliorerait également la connaissance des gènes impliqués dans l'hypospadias, le classement des variants identifiés, et le choix des gènes à analyser.

Toulouse, le 25 septembre 2020

Toulouse, le 24 septembre 2020

Vu permis d'imprimer  
Le Doyen de la Faculté  
de médecine Rangueil  
Elle SERRANNE

Service de Biochimie - Pr T. LEVAIDE  
Institut Fédératif de Biologie  
330 av. de Grande-Bretagne - TSA 40031  
31059 TOULOUSE cedex 9



## Bibliographie

1. Hughes IA, Houk C, Ahmed SF, Lee PA, Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society/European Society for Paediatric Endocrinology Consensus Group. Consensus statement on management of intersex disorders. *J Pediatr Urol.* 2006;2(3):148-162. doi:10.1016/j.jpuro.2006.03.004
2. Mouriquand PDE, Mure P-Y. Current concepts in hypospadiology. *BJU Int.* 2004;93 Suppl 3:26-34. doi:10.1111/j.1464-410X.2004.04706.x
3. Yu X, Nassar N, Mastroiacovo P, et al. Hypospadias Prevalence and Trends in International Birth Defect Surveillance Systems, 1980-2010. *Eur Urol.* 2019;76(4):482-490. doi:10.1016/j.eururo.2019.06.027
4. Chen MJ, Karaviti LP, Roth DR, Schlomer BJ. Birth prevalence of hypospadias and hypospadias risk factors in newborn males in the United States from 1997 to 2012. *J Pediatr Urol.* 2018;14(5):425.e1-425.e7. doi:10.1016/j.jpuro.2018.08.024
5. Springer A, van den Heijkant M, Baumann S. Worldwide prevalence of hypospadias. *J Pediatr Urol.* 2016;12(3):152.e1-7. doi:10.1016/j.jpuro.2015.12.002
6. Bashamboo A, McElreavey K. Mechanism of Sex Determination in Humans: Insights from Disorders of Sex Development. *Sex Dev.* 2016;10(5-6):313-325. doi:10.1159/000452637
7. Miyamoto Y, Taniguchi H, Hamel F, Silversides DW, Viger RS. A GATA4/WT1 cooperation regulates transcription of genes required for mammalian sex determination and differentiation. *BMC Mol Biol.* 2008;9:44. doi:10.1186/1471-2199-9-44
8. Lipska-Ziętkiewicz BS. WT1 Disorder. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. *GeneReviews*®. University of Washington, Seattle; 1993. Accessed September 17, 2020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556455/>
9. Sreenivasan R, Ludbrook L, Fisher B, et al. Mutant NR5A1/SF-1 in patients with disorders of sex development shows defective activation of the SOX9 TESCO enhancer. *Hum Mutat.* 2018;39(12):1861-1874. doi:10.1002/humu.23603
10. De Santa Barbara P, Bonneaud N, Boizet B, et al. Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene. *Mol Cell Biol.* 1998;18(11):6653-6665. doi:10.1128/mcb.18.11.6653
11. Kim G-J, Sock E, Buchberger A, et al. Copy number variation of two separate regulatory regions upstream of SOX9 causes isolated 46,XY or 46,XX disorder of sex development. *J Med Genet.* 2015;52(4):240-247. doi:10.1136/jmedgenet-2014-102864
12. Jo A, Denduluri S, Zhang B, et al. The versatile functions of Sox9 in development, stem cells, and human diseases. *Genes Dis.* 2014;1(2):149-161. doi:10.1016/j.gendis.2014.09.004
13. Li Y, Sinclair A, Cao M, et al. Canalization of the urethral plate precedes fusion of the urethral folds during male penile urethral development: the double zipper hypothesis. *J Urol.* 2015;193(4):1353-1359. doi:10.1016/j.juro.2014.09.108
14. Baskin L, Shen J, Sinclair A, et al. Development of the human penis and clitoris. *Differentiation.* 2018;103:74-85. doi:10.1016/j.diff.2018.08.001

15. Çayan F, Çayan S. Prenatal diagnosis of penoscrotal hypospadias and review of the literature. *Turk J Urol.* 2013;39(2):116-118. doi:10.5152/tud.2013.028
16. Li X, Liu A, Zhang Z, An X, Wang S. Prenatal diagnosis of hypospadias with 2-dimensional and 3-dimensional ultrasonography. *Sci Rep.* 2019;9(1):8662. doi:10.1038/s41598-019-45221-z
17. Schnack TH, Zdravkovic S, Myrup C, et al. Familial aggregation of hypospadias: a cohort study. *Am J Epidemiol.* 2008;167(3):251-256. doi:10.1093/aje/kwm317
18. Haraguchi R, Mo R, Hui C, et al. Unique functions of Sonic hedgehog signaling during external genitalia development. *Development.* 2001;128(21):4241-4250.
19. Shehata BM, Elmore JM, Bootwala Y, et al. Immunohistochemical characterization of sonic hedgehog and its downstream signaling molecules during human penile development. *Fetal Pediatr Pathol.* 2011;30(4):244-251. doi:10.3109/15513815.2011.555809
20. Person AD, Beiraghi S, Sieben CM, et al. WNT5A mutations in patients with autosomal dominant Robinow syndrome. *Dev Dyn.* 2010;239(1):327-337. doi:10.1002/dvdy.22156
21. Mortlock DP, Innis JW. Mutation of HOXA13 in hand-foot-genital syndrome. *Nat Genet.* 1997;15(2):179-180. doi:10.1038/ng0297-179
22. Morgan EA, Nguyen SB, Scott V, Stadler HS. Loss of Bmp7 and Fgf8 signaling in Hoxa13-mutant mice causes hypospadias. *Development.* 2003;130(14):3095-3109. doi:10.1242/dev.00530
23. Chen T, Li Q, Xu J, et al. Mutation screening of BMP4, BMP7, HOXA4 and HOXB6 genes in Chinese patients with hypospadias. *Eur J Hum Genet.* 2007;15(1):23-28. doi:10.1038/sj.ejhg.5201722
24. Allali S, Muller J-B, Brauner R, et al. Mutation analysis of NR5A1 encoding steroidogenic factor 1 in 77 patients with 46, XY disorders of sex development (DSD) including hypospadias. *PLoS ONE.* 2011;6(10):e24117. doi:10.1371/journal.pone.0024117
25. Kalfa N, Fukami M, Philibert P, et al. Screening of MAMLD1 mutations in 70 children with 46,XY DSD: identification and functional analysis of two new mutations. *PLoS ONE.* 2012;7(3):e32505. doi:10.1371/journal.pone.0032505
26. Camats N, Fernández-Cancio M, Audí L, et al. Human MAMLD1 Gene Variations Seem Not Sufficient to Explain a 46,XY DSD Phenotype. *PLoS ONE.* 2015;10(11):e0142831. doi:10.1371/journal.pone.0142831
27. Rubtsov P, Karmanov M, Sverdlova P, Spirin P, Tiulpakov A. A novel homozygous mutation in CYP11A1 gene is associated with late-onset adrenal insufficiency and hypospadias in a 46,XY patient. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(3):936-939. doi:10.1210/jc.2008-1118
28. Kon M, Suzuki E, Dung VC, et al. Molecular basis of non-syndromic hypospadias: systematic mutation screening and genome-wide copy-number analysis of 62 patients. *Hum Reprod.* 2015;30(3):499-506. doi:10.1093/humrep/deu364
29. Andersson S, Geissler WM, Wu L, et al. Molecular genetics and pathophysiology of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3 deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(1):130-136. doi:10.1210/jcem.81.1.8550739

30. Eggers S, Sadedin S, van den Bergen JA, et al. Disorders of sex development: insights from targeted gene sequencing of a large international patient cohort. *Genome Biol.* 2016;17(1):243. doi:10.1186/s13059-016-1105-y
31. Söderhäll C, Körberg IB, Thai HTT, et al. Fine mapping analysis confirms and strengthens linkage of four chromosomal regions in familial hypospadias. *Eur J Hum Genet.* 2015;23(4):516-522. doi:10.1038/ejhg.2014.129
32. Bouty A, Ayers KL, Pask A, Heloury Y, Sinclair AH. The Genetic and Environmental Factors Underlying Hypospadias. *Sex Dev.* 2015;9(5):239-259. doi:10.1159/000441988
33. Hughes IA, Davies JD, Bunch TI, Pasterski V, Mastroyannopoulou K, MacDougall J. Androgen insensitivity syndrome. *Lancet.* 2012;380(9851):1419-1428. doi:10.1016/S0140-6736(12)60071-3
34. Kalfa N, Philibert P, Werner R, et al. Minor hypospadias: the “tip of the iceberg” of the partial androgen insensitivity syndrome. *PLoS ONE.* 2013;8(4):e61824. doi:10.1371/journal.pone.0061824
35. Kalfa N, Paris F, Soyer-Gobillard M-O, Daures J-P, Sultan C. Prevalence of hypospadias in grandsons of women exposed to diethylstilbestrol during pregnancy: a multigenerational national cohort study. *Fertil Steril.* 2011;95(8):2574-2577. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.02.047
36. Kalfa N, Paris F, Philibert P, et al. Is Hypospadias Associated with Prenatal Exposure to Endocrine Disruptors? A French Collaborative Controlled Study of a Cohort of 300 Consecutive Children Without Genetic Defect. *Eur Urol.* 2015;68(6):1023-1030. doi:10.1016/j.eururo.2015.05.008
37. Lee PA, Nordenström A, Houk CP, et al. Global Disorders of Sex Development Update since 2006: Perceptions, Approach and Care. *Horm Res Paediatr.* 2016;85(3):158-180. doi:10.1159/000442975
38. Byers HM, Fossum M, Wu H-Y. How geneticists think about Differences/Disorders of Sexual Development (DSD): A conversation. *J Pediatr Urol.* Published online August 26, 2020. doi:10.1016/j.jpuro.2020.08.015
39. Armfield BA, Seifert AW, Zheng Z, et al. Molecular Characterization of the Genital Organizer: Gene Expression Profile of the Mouse Urethral Plate Epithelium. *J Urol.* 2016;196(4):1295-1302. doi:10.1016/j.juro.2016.04.091
40. Arendt LH, Ernst A, Braskhøj Lauridsen LL, Brix N, Olsen J, Ramlau-Hansen CH. Timing of pubertal development in boys born with cryptorchidism and hypospadias: a nationwide cohort study. *Asian J Androl.* 2019;21(6):551-556. doi:10.4103/aja.aja\_3\_19
41. Kalfa N, Gaspari L, Ollivier M, et al. Molecular genetics of hypospadias and cryptorchidism recent developments. *Clin Genet.* 2019;95(1):122-131. doi:10.1111/cge.13432
42. Baxter RM, Arboleda VA, Lee H, et al. Exome sequencing for the diagnosis of 46,XY disorders of sex development. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(2):E333-344. doi:10.1210/jc.2014-2605

43. Dong Y, Yi Y, Yao H, et al. Targeted next-generation sequencing identification of mutations in patients with disorders of sex development. *BMC Med Genet.* 2016;17:23. doi:10.1186/s12881-016-0286-2
44. Kim JH, Kang E, Heo SH, et al. Diagnostic yield of targeted gene panel sequencing to identify the genetic etiology of disorders of sex development. *Mol Cell Endocrinol.* 2017;444:19-25. doi:10.1016/j.mce.2017.01.037
45. Fan Y, Zhang X, Wang L, et al. Diagnostic Application of Targeted Next-Generation Sequencing of 80 Genes Associated with Disorders of Sexual Development. *Sci Rep.* 2017;7:44536. doi:10.1038/srep44536
46. Wang H, Zhang L, Wang N, et al. Next-generation sequencing reveals genetic landscape in 46, XY disorders of sexual development patients with variable phenotypes. *Hum Genet.* 2018;137(3):265-277. doi:10.1007/s00439-018-1879-y
47. Hughes LA, McKay-Bounford K, Webb EA, et al. Next generation sequencing (NGS) to improve the diagnosis and management of patients with disorders of sex development (DSD). *Endocr Connect.* 2019;8(2):100-110. doi:10.1530/EC-18-0376
48. Buonocore F, Clifford-Mobley O, King TFJ, et al. Next-Generation Sequencing Reveals Novel Genetic Variants (SRY, DMRT1, NR5A1, DHH, DHX37) in Adults With 46,XY DSD. *J Endocr Soc.* 2019;3(12):2341-2360. doi:10.1210/js.2019-00306
49. McElreavey K, Jorgensen A, Eozenou C, et al. Pathogenic variants in the DEAH-box RNA helicase DHX37 are a frequent cause of 46,XY gonadal dysgenesis and 46,XY testicular regression syndrome. *Genet Med.* 2020;22(1):150-159. doi:10.1038/s41436-019-0606-y
50. Allot A, Peng Y, Wei C-H, Lee K, Phan L, Lu Z. LitVar: a semantic search engine for linking genomic variant data in PubMed and PMC. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(W1):W530-W536. doi:10.1093/nar/gky355
51. Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, et al. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics.* 2019;35(11):1978-1980. doi:10.1093/bioinformatics/bty897
52. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-424. doi:10.1038/gim.2015.30
53. Jakubiuk-Tomaszuk A, Murcia Pienkowski V, Zietkiewicz S, et al. Syndromic chorioretinal coloboma associated with heterozygous de novo RARA mutation affecting an amino acid critical for retinoic acid interaction. *Clin Genet.* 2019;96(4):371-375. doi:10.1111/cge.13611
54. Cody JD, Hasi M, Soileau B, et al. Establishing a reference group for distal 18q-: clinical description and molecular basis. *Hum Genet.* 2014;133(2):199-209. doi:10.1007/s00439-013-1364-6
55. Hiort O, Holterhus PM, Horter T, et al. Significance of mutations in the androgen receptor gene in males with idiopathic infertility. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(8):2810-2815. doi:10.1210/jcem.85.8.6713

56. Bhangoo A, Paris F, Philibert P, Audran F, Ten S, Sultan C. Isolated micropenis reveals partial androgen insensitivity syndrome confirmed by molecular analysis. *Asian J Androl.* 2010;12(4):561-566. doi:10.1038/aja.2010.6
57. Skarin Nordenvall A, Chen Q, Norrby C, et al. Fertility in adult men born with hypospadias: A nationwide register-based cohort study on birthrates, the use of assisted reproductive technologies and infertility. *Andrology.* 2020;8(2):372-380. doi:10.1111/andr.12723
58. Ji X, Xing Y, Xu Y, et al. A novel mutation in MID1 in a patient with X-linked Opitz G/BBB syndrome. *Gene.* 2014;537(1):140-142. doi:10.1016/j.gene.2013.12.018
59. Takayama N, Kizaki M, Hida T, Kinjo K, Ikeda Y. Novel mutation in the PML/RARalpha chimeric gene exhibits dramatically decreased ligand-binding activity and confers acquired resistance to retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *Exp Hematol.* 2001;29(7):864-872. doi:10.1016/s0301-472x(01)00651-8
60. Moriya K, Mitsui T, Tanaka H, Nakamura M, Nonomura K. Long-term outcome of pituitary-gonadal axis and gonadal growth in patients with hypospadias at puberty. *J Urol.* 2010;184(4 Suppl):1610-1614. doi:10.1016/j.juro.2010.04.022
61. Ayers KL, Bouty A, Robevska G, et al. Variants in congenital hypogonadotropic hypogonadism genes identified in an Indonesian cohort of 46,XY under-virilised boys. *Hum Genomics.* 2017;11(1):1. doi:10.1186/s40246-017-0098-2
62. Wang Y, Gong C, Qin M, Liu Y, Tian Y. Clinical and genetic features of 64 young male paediatric patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2017;87(6):757-766. doi:10.1111/cen.13451
63. Athota JP, Bhat M, Nampoothiri S, et al. Molecular and clinical studies in 107 Noonan syndrome affected individuals with PTPN11 mutations. *BMC Med Genet.* 2020;21(1):50. doi:10.1186/s12881-020-0986-5
64. Sproll P, Eid W, Gomes CR, et al. Assembling the jigsaw puzzle: CBX2 isoform 2 and its targets in disorders/differences of sex development. *Mol Genet Genomic Med.* 2018;6(5):785-795. doi:10.1002/mgg3.445
65. Gnirke A, Melnikov A, Maguire J, et al. Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. *Nature Biotechnology.* 2009;27(2):182-189. doi:10.1038/nbt.1523
66. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2010;26(5):589-595. doi:10.1093/bioinformatics/btp698
67. Tarasov A, Vilella AJ, Cuppen E, Nijman IJ, Prins P. Sambamba: fast processing of NGS alignment formats. *Bioinformatics.* 2015;31(12):2032-2034. doi:10.1093/bioinformatics/btv098
68. McKenna A, Hanna M, Banks E, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 2010;20(9):1297-1303. doi:10.1101/gr.107524.110
69. Yaay K, Baux D, Pegeot H, et al. MoBiDiC Prioritization Algorithm, a Free, Accessible, and Efficient Pipeline for Single-Nucleotide Variant Annotation and Prioritization for Next-

- Generation Sequencing Routine Molecular Diagnosis. *J Mol Diagn.* 2018;20(4):465-473. doi:10.1016/j.jmoldx.2018.03.009
70. Ioannidis NM, Rothstein JH, Pejaver V, et al. REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *Am J Hum Genet.* 2016;99(4):877-885. doi:10.1016/j.ajhg.2016.08.016
71. Jaganathan K, Kyriazopoulou Panagiotopoulou S, McRae JF, et al. Predicting Splicing from Primary Sequence with Deep Learning. *Cell.* 2019;176(3):535-548.e24. doi:10.1016/j.cell.2018.12.015
72. Jian X, Boerwinkle E, Liu X. In silico prediction of splice-altering single nucleotide variants in the human genome. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(22):13534-13544. doi:10.1093/nar/gku1206
73. Ross JL, Scott C, Marttila P, et al. Phenotypes Associated with SHOX Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(12):5674-5680. doi:10.1210/jcem.86.12.8125
74. García-Acero M, Moreno-Niño O, Suárez-Obando F, et al. Disorders of sex development: Genetic characterization of a patient cohort. *Mol Med Rep.* 2020;21(1):97-106. doi:10.3892/mmr.2019.10819
75. Lee YS, Cheng AWF, Ahmed SF, Shaw NJ, Hughes IA. Genital anomalies in Klinefelter's syndrome. *Horm Res.* 2007;68(3):150-155. doi:10.1159/000106375
76. Bonomi M, Rochira V, Pasquali D, et al. Klinefelter syndrome (KS): genetics, clinical phenotype and hypogonadism. *J Endocrinol Invest.* 2017;40(2):123-134. doi:10.1007/s40618-016-0541-6
77. Hochstenbach R, van Binsbergen E, Schuring-Blom H, Buijs A, Ploos van Amstel HK. A survey of undetected, clinically relevant chromosome abnormalities when replacing postnatal karyotyping by Whole Genome Sequencing. *Eur J Med Genet.* 2019;62(9):103543. doi:10.1016/j.ejmg.2018.09.010
78. Mantere T, Neveling K, Pebrel-Richard C, et al. Next generation cytogenetics: genome-imaging enables comprehensive structural variant detection for 100 constitutional chromosomal aberrations in 85 samples. *bioRxiv.* Published online July 16, 2020:2020.07.15.205245. doi:10.1101/2020.07.15.205245
79. Zhang W, Shi J, Zhang C, et al. Identification of gene variants in 130 Han Chinese patients with hypospadias by targeted next-generation sequencing. *Mol Genet Genomic Med.* 2019;7(8):e827. doi:10.1002/mgg3.827
80. Batista RL, Mendonca BB. Integrative and Analytical Review of the 5-Alpha-Reductase Type 2 Deficiency Worldwide. *Appl Clin Genet.* 2020;13:83-96. doi:10.2147/TACG.S198178
81. van den Bergen JA, Robevska G, Eggers S, et al. Analysis of variants in GATA4 and FOG2/ZFPM2 demonstrates benign contribution to 46,XY disorders of sex development. *Mol Genet Genomic Med.* 2020;8(3):e1095. doi:10.1002/mgg3.1095
82. Philibert P, Paris F, Lakhil B, et al. NR5A1 (SF-1) gene variants in a group of 26 young women with XX primary ovarian insufficiency. *Fertil Steril.* 2013;99(2):484-489. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.10.026

83. Knarston IM, Robevska G, van den Bergen JA, et al. NR5A1 gene variants repress the ovarian-specific WNT signaling pathway in 46,XX disorders of sex development patients. *Hum Mutat.* 2019;40(2):207-216. doi:10.1002/humu.23672
84. Bertrand-Delepine J, Manouvrier-Hanu S, Cartigny M, et al. In cases of familial primary ovarian insufficiency and disorders of gonadal development, consider NR5A1/SF-1 sequence variants. *Reprod Biomed Online.* 2020;40(1):151-159. doi:10.1016/j.rbmo.2019.10.002
85. Phelan N, Williams EL, Cardamone S, et al. Screening for mutations in 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and androgen receptor in women presenting with partially virilised 46,XY disorders of sex development. *Eur J Endocrinol.* 2015;172(6):745-751. doi:10.1530/EJE-14-0994
86. Hornig NC, de Beaufort C, Denzer F, et al. A Recurrent Germline Mutation in the 5'UTR of the Androgen Receptor Causes Complete Androgen Insensitivity by Activating Aberrant uORF Translation. *PLoS ONE.* 2016;11(4):e0154158. doi:10.1371/journal.pone.0154158
87. Zhang X, Chen Y, Zhao S, Markljung E, Nordenskjöld A. Hypospadias associated with hypertelorism, the mildest phenotype of Opitz syndrome. *J Hum Genet.* 2011;56(5):348-351. doi:10.1038/jhg.2011.17
88. Maia N, Nabais Sá MJ, Tkachenko N, et al. Two Novel Pathogenic MID1 Variants and Genotype-Phenotype Correlation Reanalysis in X-Linked Opitz G/BBB Syndrome. *Mol Syndromol.* 2017;9(1):45-51. doi:10.1159/000479177
89. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127(20):2391-2405. doi:10.1182/blood-2016-03-643544
90. Tomita A, Kiyoi H, Naoe T. Mechanisms of action and resistance to all-trans retinoic acid (ATRA) and arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in acute promyelocytic leukemia. *Int J Hematol.* 2013;97(6):717-725. doi:10.1007/s12185-013-1354-4
91. Krishnan A, Chagani S, Rohl AJ. Preoperative Testosterone Therapy Prior to Surgical Correction of Hypospadias: A Review of the Literature. *Cureus.* 2016;8(7):e677. doi:10.7759/cureus.677
92. Bashamboo A, Ferraz-de-Souza B, Lourenço D, et al. Human male infertility associated with mutations in NR5A1 encoding steroidogenic factor 1. *Am J Hum Genet.* 2010;87(4):505-512. doi:10.1016/j.ajhg.2010.09.009
93. Miyado M, Yoshida K, Miyado K, et al. Knockout of Murine Mamld1 Impairs Testicular Growth and Daily Sperm Production but Permits Normal Postnatal Androgen Production and Fertility. *Int J Mol Sci.* 2017;18(6). doi:10.3390/ijms18061300
94. Li L, Su C, Fan L, Gao F, Liang X, Gong C. Clinical and molecular spectrum of 46,XY disorders of sex development that harbour MAMLD1 variations: case series and review of literature. *Orphanet J Rare Dis.* 2020;15(1):188. doi:10.1186/s13023-020-01459-9
95. Alirezaie N, Kernohan KD, Hartley T, Majewski J, Hocking TD. ClinPred: Prediction Tool to Identify Disease-Relevant Nonsynonymous Single-Nucleotide Variants. *Am J Hum Genet.* 2018;103(4):474-483. doi:10.1016/j.ajhg.2018.08.005

96. Chennen K, Weber T, Lornage X, et al. MISTIC: A prediction tool to reveal disease-relevant deleterious missense variants. *PLoS ONE*. 2020;15(7):e0236962. doi:10.1371/journal.pone.0236962
97. Audi L, Ahmed SF, Krone N, et al. GENETICS IN ENDOCRINOLOGY: Approaches to molecular genetic diagnosis in the management of differences/disorders of sex development (DSD): position paper of EU COST Action BM 1303 'DSDnet.' *Eur J Endocrinol*. 2018;179(4):R197-R206. doi:10.1530/EJE-18-0256
98. van der Zanden LFM, van Rooij IALM, Feitz WFJ, et al. Common variants in DGKK are strongly associated with risk of hypospadias. *Nat Genet*. 2011;43(1):48-50. doi:10.1038/ng.721
99. Geller F, Feenstra B, Carstensen L, et al. Genome-wide association analyses identify variants in developmental genes associated with hypospadias. *Nat Genet*. 2014;46(9):957-963. doi:10.1038/ng.3063
100. Richard MA, Sok P, Canon S, et al. The role of genetic variation in DGKK on moderate and severe hypospadias. *Birth Defects Res*. 2019;111(13):932-937. doi:10.1002/bdr2.1522
101. Flück CE, Audí L, Fernández-Cancio M, et al. Broad Phenotypes of Disorders/Differences of Sex Development in MAMLD1 Patients Through Oligogenic Disease. *Front Genet*. 2019;10:746. doi:10.3389/fgene.2019.00746
102. Cavalli G, Heard E. Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. *Nature*. 2019;571(7766):489-499. doi:10.1038/s41586-019-1411-0
103. Richard MA, Sok P, Canon S, et al. Altered mechanisms of genital development identified through integration of DNA methylation and genomic measures in hypospadias. *Sci Rep*. 2020;10(1):12715. doi:10.1038/s41598-020-69725-1



AUTEUR : Vuthy EA

TITRE : Séquençage à haut-débit d'un panel de 336 gènes dans une cohorte de 284 patients présentant un hypospadias isolé

DIRECTEURS DE THESE : Pr Nicolas KALFA et Dr Anne BERGOUGNOUX

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Faculté de Médecine de Purpan, Toulouse, 14 octobre 2020

---

#### Résumé en français

Actuellement, un séquençage haut-débit (NGS) est généralement réalisé pour les patients présentant une anomalie du développement ou de la différenciation sexuelle (DSD), mais pas en cas d'hypospadias isolé. Après exclusion de variants *AR* potentiellement pathogènes, nous avons séquençé par panel NGS 336 gènes chez 284 enfants présentant un hypospadias isolé (pas de micropénis ni cryptorchidie). L'analyse NGS a identifié 9 variants potentiellement pathogènes dans des gènes liés aux DSD (*AR*, *NR5A1*, *HSD17B3* et *MAMLD1*) ou non (*MIDI1*, *RARA*), une délétion 18q, et des variants de signification inconnue dans des gènes intéressants. Le rendement diagnostique combiné (Sanger + NGS) atteint 5,5% et augmente avec la sévérité de l'hypospadias, mais 63% des diagnostics restent obtenus dans le cadre d'hypospadias antérieurs. Le NGS améliore donc le diagnostic moléculaire dans l'hypospadias, est informatif même dans les formes mineures, et améliorerait la prise en charge précoce et le suivi du patient.

---

#### Titre et résumé en anglais

Next-generation sequencing targeting a panel of 336 genes in a cohort of 284 patients with isolated hypospadias

Next-generation sequencing (NGS) is generally used for patients with severe disorders of sex development (DSD) but is not applied yet for patients with hypospadias only. After excluding likely pathogenic *AR* variants by Sanger sequencing, we applied an NGS panel of 336 genes in 284 children with anterior to penoscrotal hypospadias (no cryptorchidism, no micropenis). NGS identified 9 likely pathogenic variants in both DSD (*AR*, *NR5A1*, *HSD17B3*, *MAMLD1*) and non-DSD (*MIDI1*, *RARA*) related genes, an 18q deletion following coverage analysis, and variants of unknown significance in genes of interest (hypogonadotropic hypogonadism, Noonan syndrome and genital tubercle development). Diagnostic yield reached 5.5% considering both Sanger sequencing and NGS and increased with hypospadias severity, but 63% of the diagnoses were found in anterior hypospadias. NGS enhances the molecular diagnosis of hypospadias, is helpful even in mild phenotype and improves early patient care and follow-up.

---

**Mots-Clés :** Hypospadias, DSD, séquençage, NGS, diagnostic

**Keywords:** Hypospadias, DSD, NGS, diagnosis

---

**Discipline administrative :** BIOLOGIE MEDICALE

---

Laboratoire de Génétique Moléculaire IURC – CHU de Montpellier – Montpellier – France  
Équipe « Développement Génital : du fœtus à l'adulte » (DSD)

Faculté de Médecine Rangueil – 133 route de Narbonne – 31062 TOULOUSE Cedex 04 – France