

Génétique et pathologie moléculaire de l'hormone anti-müllérienne et de son récepteur

Jean-Yves Picard & Corinne Belville

Unité de Recherches sur l'Endocrinologie du Développement, INSERM U493, École Normale Supérieure, Département de Biologie, 92120 Montrouge

Reçu le 10 avril 2002

RÉSUMÉ

L'hormone anti-müllérienne (AMH) est une glycoprotéine produite par les cellules de Sertoli du testicule immature, responsable chez le fœtus mâle de la régression des canaux de Müller, qui donneront, chez la femme, les trompes de Fallope et l'utérus. Elle agit par liaison à un récepteur membranaire de type II (AMHR-II) à activité sérine-thréonine kinase.

Une pathologie connue de l'AMH et de son récepteur est le syndrome de persistance des dérivés müllériens (PMDS) ou syndrome de «l'homme à utérus», un cas particulier de pseudo-hermaphroditisme masculin qui se manifeste, chez des garçons normalement

virilisés, par la présence d'un utérus et/ou de trompes. Il s'agit d'un syndrome familial se transmettant habituellement sur un mode autosomique récessif. L'étude de 76 familles de patients provenant de nombreux pays a permis d'identifier dans 45 % des cas des mutations du gène de l'AMH, et dans 39 % des mutations du gène du récepteur AMHR-II (dont une délétion de 27 bases présente dans près de la moitié des cas). Chez 15 % des patients, l'origine génétique n'a pas encore été identifiée, il pourrait s'agir de mutations de facteurs intervenant en aval dans la cascade de transduction de l'AMH.

SUMMARY Genetic and molecular pathology of anti-müllerian hormone and its receptor

Anti-müllerian hormone (AMH), a glycoprotein produced by immature Sertoli cells, is responsible in male fetuses for regression of müllerian ducts, the anlagen of Fallopian tubes and uterus in females. AMH binds to a specific type II serine-threonine kinase transmembrane receptor (AMHR-II).

A known pathology of AMH and its receptor is the persistent müllerian ducts syndrome (PMDS), a peculiar case of male pseudohermaphroditism, presenting

with retention of tubes and uterus in otherwise normally virilized boys, and transmitted with an autosomic recessive mode. Genetic studies on 76 families of patients allowed identification of AMH gene mutations in 45 %, and AMHR-II gene mutations in 39 % (including a 27 bases deletion in half of the latter). In 15 % mutation of none of the two genes was detected, thus mutations are expected in genes coding for other factors of the AMH transduction cascade.

La différenciation du tractus génital est le résultat de l'action de deux hormones produites par le testicule fœtal immature. La testostérone, produite par les cellules de Leydig, est responsable du maintien des canaux de Wolff, qui donneront l'épididyme, les canaux déférents, et les vésicules séminales. Réduite en dihydrotestostérone par la 5 α -réductase, elle masculinise le sinus urogénital et les organes génitaux externes. L'hormone anti-müllérienne (AMH), aussi appelée Müllerian inhibiting substance (MIS), et dont l'existence avait été prédite par A. Jost (Jost, 1953), est produite par les cellules de Sertoli du tube séminifère. Entre la 8^{ème} et la 10^{ème} semaine de gestation, elle fait régresser les canaux de Müller, qui donneront, chez la femme, les trompes, l'utérus et la partie supérieure du vagin (Fig. 1).

L'HORMONE ANTI-MÜLLÉRIENNE

L'AMH est une glycoprotéine formée de 2 sous-unités de 70 kiloDaltons (kDa) et 560 acides aminés, liées par des ponts disulfures. Elle appartient à la superfamille des facteurs de régulation de la prolifération cellulaire du "transforming growth factor" TGF β , et, comme lui, elle subit pour son activation un clivage de 109 acides aminés dans sa partie C-terminale, fragment qui porte l'activité biologique. Mais, dans le cas de l'AMH, la partie N-terminale a la particularité de potentialiser l'activité du peptide actif C-terminal (Wilson *et al.*, 1993), peut-être en le stabilisant. La production d'AMH peut être suivie dans le sérum grâce à un dosage ELISA, maintenant commercialisé (Kit AMH/MIS, Immunotech Coulter,

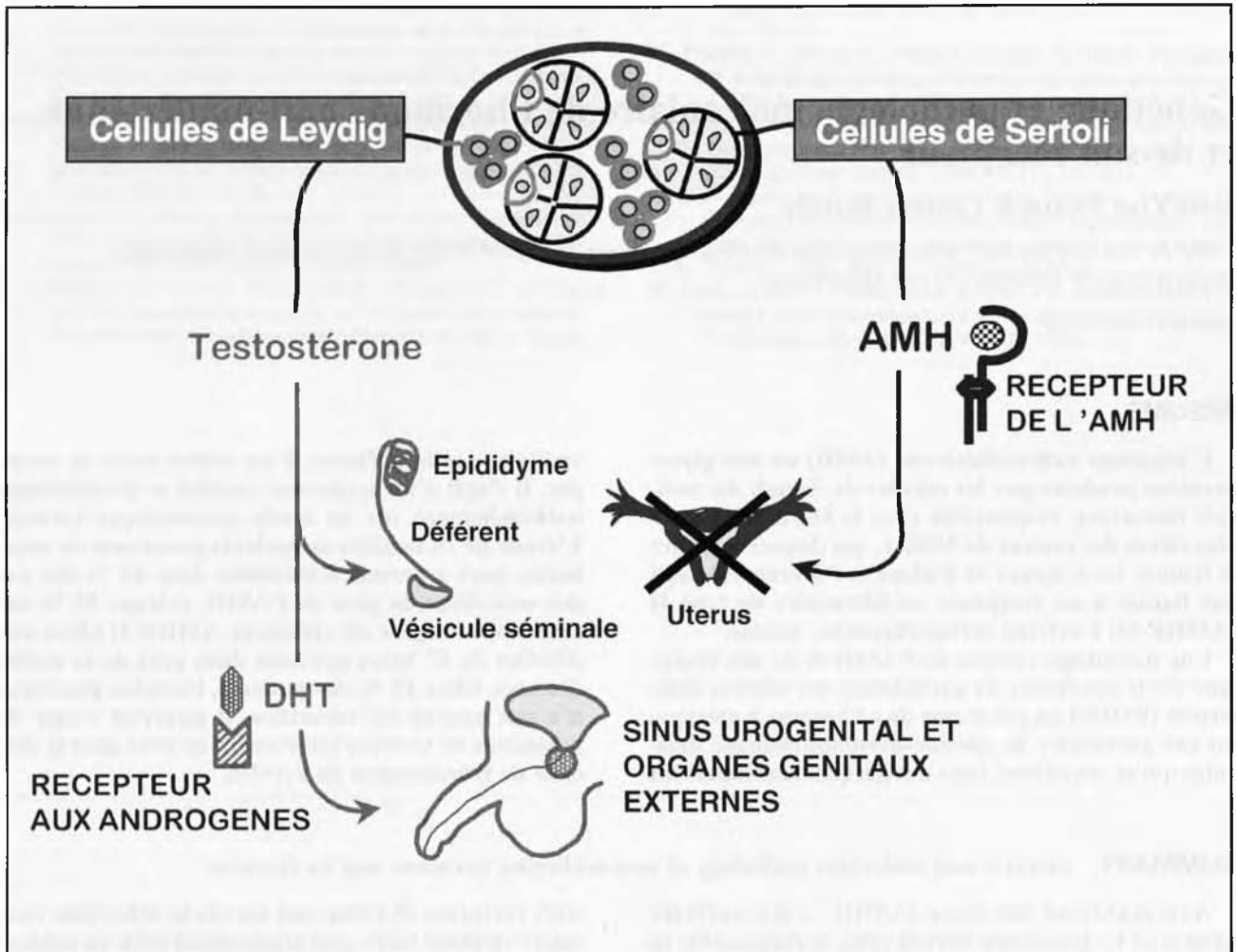


FIG. 1. – Contrôle hormonal de la différenciation du tractus génital mâle.

Marseille). L'AMH apparaît à la 8^{ème} semaine de gestation, période de sensibilité du canal de Müller, elle diminue ensuite légèrement jusqu'à la naissance, puis progressivement jusqu'à la puberté, où elle disparaît, réprimée par les androgènes testiculaires (Al-Attar *et al.*, 1997). Chez l'adulte elle n'est plus détectable que dans le liquide séminal, à une faible concentration. Le dosage de l'AMH a révélé son grand intérêt dans l'étude des ambiguïtés sexuelles (Rey *et al.*, 1999).

L'AMH n'est pas une spécificité du sexe mâle puisqu'elle est aussi produite chez la femme, mais seulement après la puberté, où elle est sécrétée dans le liquide folliculaire par les cellules de la granulosa du follicule ovarien. Le taux d'AMH sérique reste très faible chez la femme, il s'élève en cas de cancer des cellules de la granulosa et le dosage d'AMH s'est révélé d'un grand intérêt pour le dépistage des récidives, fréquentes et souvent très tardives dans ce type de cancer (Rey *et al.*, 1996).

Le gène de l'hormone anti-müllérienne (AMH) a été cloné. De petite taille, il comporte 5 exons sur 2,8 kpb

(Cate *et al.*, 1986), localisé sur un autosome, le chromosome 19, à l'extrémité du bras court, sur la bande p13.3 (Cohen-Haguenauer *et al.*, 1986).

LES RÉCEPTEURS DE L'AMH

Les facteurs de la famille du TGF β transduisent leur signal par une famille particulière de récepteurs à un seul domaine transmembranaire, à activité sérine-thréonine kinase. Un premier récepteur, dit de type II, lie son ligand et s'autophosphoryle. Un second récepteur, de type I, est alors recruté par le complexe, qui le phosphoryle dans un domaine appelé GS, riche en glycine et sérine. Le signal est ensuite transduit par la voie de protéines Smad spécifiques jusqu'au noyau, pour réguler l'expression de gènes cibles (Massagué & Chen, 2000).

Le récepteur de type II de l'AMH (AMHR-II) a été cloné et localisé sur le bras long du chromosome 12, sur la bande q13 (Imbeaud *et al.*, 1995). Il comporte 11 exons,

sur 8 kpb, et code pour un récepteur mature de 82 kDa (Faure *et al.*, 1996). La situation reste encore peu claire concernant le récepteur de type I de l'AMH, puisque des résultats ont été publiés montrant que plusieurs récepteurs de type I déjà clonés pourraient transduire le signal de l'AMH : BMPR-IB (Gouédard *et al.*, 2000), et ActR-I ou ALK2 (Clarke *et al.*, 2001 ; Visser *et al.*, 2001), récepteurs de type I intervenant dans la transduction des "bone morphogenetic proteins". La transduction de l'AMH est complexe, puisqu'en plus de l'utilisation d'une voie classique des protéines de la superfamille du TGF β , la voie Smad, l'AMH faisant appel à la Smad spécifique Smad 1 (Gouédard *et al.*, 2000), son signal peut aussi passer par la voie β -caténine-LEF1 (Allard *et al.*, 2000).

LE SYNDROME DE PERSISTANCE DES DÉRIVÉS MÜLLÉRIENS

Le syndrome de persistance des dérivés müllériens, parfois aussi appelé syndrome de « l'homme à utérus », est un cas particulier de pseudo-hermaphroditisme masculin se manifestant par la persistance d'un utérus et/ou de trompes chez des garçons dont les organes génitaux externes sont normalement virilisés. Le signe d'appel est en général une cryptorchidie souvent détectée à la naissance, ou une hernie inguinale. À l'exploration plus approfondie, on découvre la présence de testicules histologiquement normaux, liés à des résidus utérins qui ont généralement perturbé la descente testiculaire, et deux formes anatomiques principales: dans la première, la plus fréquente, la cryptorchidie est unilatérale, avec une hernie du côté opposé, alors que plus rarement, dans

la seconde, la cryptorchidie est bilatérale. Ces deux formes ne semblent pas avoir de déterminisme génétique spécifique, et elles peuvent être observées dans une même fratrie (Guerrier *et al.*, 1989).

Les testicules, si la cryptorchidie a été de durée limitée, sont en général normalement différenciés et contiennent des cellules germinales. L'acte chirurgical, après vérification, par une biopsie, de la nature de la gonade et de son absence de dégénérescence, consiste à replacer les testicules en position normale, ce qui devrait permettre de préserver la fertilité des patients. Mais c'est une opération délicate en raison de la présence de cordons spermatiques courts, les déférents étant étroitement liés aux résidus müllériens (Loeff *et al.*, 1994). Cette difficulté de l'acte chirurgical explique sans doute pourquoi la fertilité après opération a été rapportée comme rare, de l'ordre de 11 %, par une étude réalisée au Koweït (Farg, 1993).

La prévalence du PMDS a été estimée en France à au moins une naissance de garçon sur 100 000. Actuellement, la recherche des bases moléculaires a été faite chez 76 patients. L'exploration inclut d'abord un dosage de l'AMH plasmatique, chez les patients suffisamment jeunes pour que le test soit informatif. La présence ou l'absence d'AMH orientera la recherche vers une mutation du gène AMHR-II ou de celui de l'AMH, respectivement (Fig. 2).

LES BASES MOLÉCULAIRES DU PMDS

Des mutations des gènes AMH et AMHR-II responsables du PMDS ont été identifiées dans 85 % des

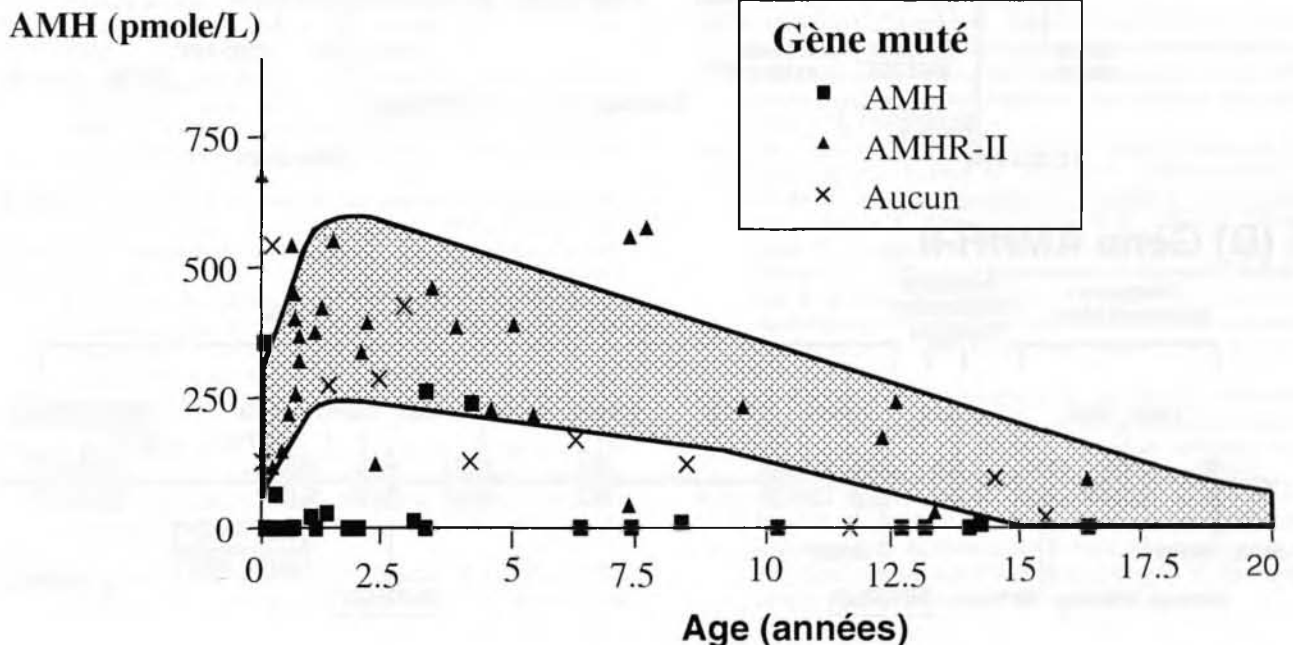


FIG. 2. – Taux d'AMH sérique mesuré par test immuno-enzymatique chez les patients PMDS informatifs, et corrélation avec les mutations détectées. L'intervalle normal est représenté en grisé.



familles (Belville *et al.*, 1999), montrant une très large concordance avec les orientations tirées des dosages d'AMH informatifs (Fig. 2).

Mutations de l'AMH

Elles sont impliquées dans 45 % des cas et, si elles sont, comme on pouvait le prévoir, nombreuses dans la fin du 5^{ème} exon codant pour le peptide C-terminal responsable de l'activité biologique, elles sont également observées sur toute la longueur du gène, sauf dans le 4^{ème} exon. Elles sont variées, certaines sont faiblement récurrentes. Outre faux sens, non sens et délétions, on a observé deux mutations d'épissage de l'ARN messager et une mutation de l'ATG initiateur de la traduction (Fig. 3A).

Mutations du gène du récepteur de type II de l'AMH

La première mutation identifiée, une mutation d'épissage, a permis d'apporter la preuve de la nature du récep-

teur AMHR-II qui avait été cloné (Imbeaud *et al.*, 1995). Des mutations de ce gène sont impliquées dans 39 % des cas, et touchent tous les exons et domaines de la molécule (Fig. 3B). Quelques mutations sont récurrentes, mais une seule est très fréquente : il s'agit d'une délétion de 27 paires de bases au début du 10^{ème} exon (Imbeaud *et al.*, 1996). Cette mutation est présente, à l'état homo- ou hétérozygote, chez 45 % des patients ayant des mutations du gène AMHR-II. C'est donc la première mutation à rechercher chez un patient ayant un taux normal d'AMH circulante, et la réponse peut être obtenue rapidement après une amplification de son ADN génomique par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

Quels sont les autres gènes mutés ?

Dans les 15 % de familles n'ayant pas permis l'identification de mutations des gènes AMH et AMHR-II, les patients ont souvent un taux intermédiaire d'AMH (Fig. 2). Le séquençage du promoteur de l'AMH n'a pas non plus permis d'identifier des anomalies. Y a-t-il d'autres gènes impliqués ? On peut imaginer des muta-

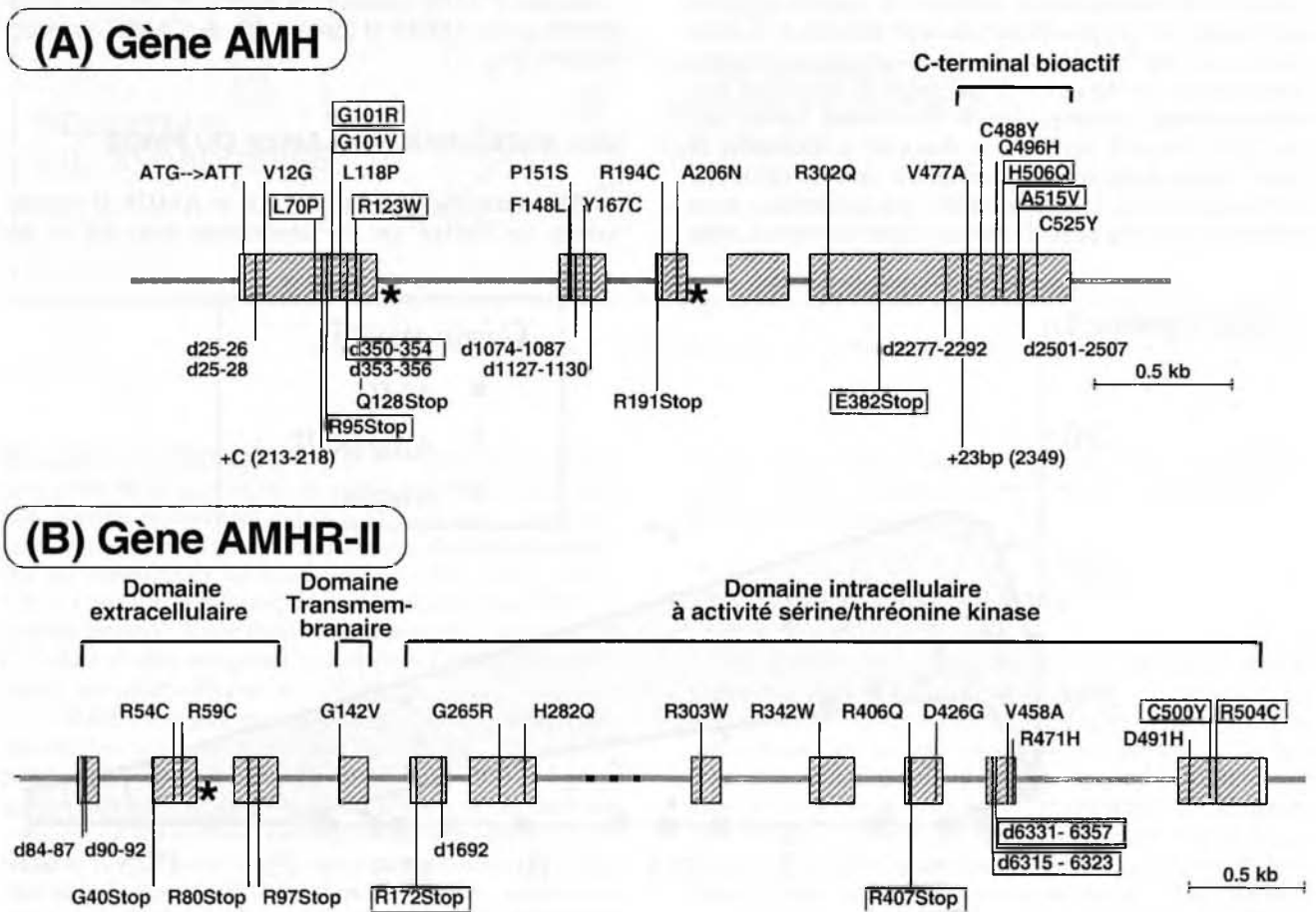


FIG. 3. – Mutations des gènes AMH (A) et AMHR-II (B). Les exons sont représentés en grisé, les mutations récurrentes sont encadrées, la mutation fréquente a un double cadre. Les mutations faux-sens sont représentées au-dessus des gènes, les mutations non sens et délétions en dessous. Les mutations d'épissage sont représentées par une étoile.

tions de gènes codant pour des facteurs régulateurs de l'AMH, ou d'autres éléments intervenant en aval dans la cascade de transduction du signal. Les récepteurs de type I sont actuellement en cours d'étude, mais dans la mesure où les candidats actuellement connus, BMPR-IB et ActR-I, sembleraient pouvoir aussi médier les effets d'autres facteurs que l'AMH, il serait assez étonnant que leur mutation puisse être responsable d'une persistance isolée des dérivés müllériens, sans autre anomalie associée. Par contre, ces mutations d'un récepteur de type I pourraient peut-être expliquer certaines anomalies multiples observées chez des patients particuliers, sortant de la définition stricte du PMDS.

CONCLUSION

Les mutations des gènes de l'AMH et de son récepteur de type II, AMHR-II, outre leur intérêt clinique et génétique, constituent un matériel de choix pour étudier le mode d'action des facteurs de régulation de la différenciation et de la prolifération cellulaire de la famille du TGF β , et leurs récepteurs sérine/thréonine kinase de type II et type I. Ces mutations ont été pendant une dizaine d'années les seules connues dans ces familles de ligands et de récepteurs protéiques. Elles sont actuellement exploitées pour mieux comprendre leur rôle, tout-à-fait capital, dans le développement.

BIBLIOGRAPHIE

- Al-Attar L., Noël K., Dutertre M., Belville C., Forest M. G., Burgoyne P. S., Josso N. & Rey R., Hormonal and cellular regulation of Sertoli cell anti-Müllerian hormone production in the postnatal mouse. *J. Clin. Invest.*, 1997, 100, 1335-1343.
- Allard S., Adin P., Gouédard L., di Clemente N., Josso N., Orgebin-Crist M. C., Picard J. Y. & Xavier F., Molecular mechanisms of hormone-mediated Müllerian duct regression: involvement of β -catenin. *Development*, 2000, 127, 3349-3360.
- Belville C., Josso N. & Picard J. Y., Persistence of Müllerian derivatives in males. *Am. J. Med. Genet.*, 1999, 89, 218-223.
- Cate R. L., Mattaliano R. J., Hession C., Tizard R., Faber N. M., Cheung A., Ninfa E. G., Frey A. Z., Gash D. J., Chow E. P., Fisher R. A., Bertoni J. M., Torres G., Wallner B. P., Ramachandran K. L., Ragin R. C., Manganaro T. F., McLaughlin D. T. & Donahoe P. K., Isolation of the bovine and human genes for müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell*, 1986, 45, 685-698.
- Clarke T. R., Hoshiya Y., Yi S. E., Liu X. H., Lyons K. M. & Donahoe P. K., Müllerian inhibiting substance signaling uses a bone genetic protein (BMP)-like pathway mediated by ALK2 and induces Smad6 expression. *Mol. Endocrinol.*, 2001, 15, 946-959.
- Cohen-Haguenuer O., Picard J. Y., Mattéi M. G., Serero S., Nguyen V. C., de Tand M. F., Guerrier D., Hors-Cayla M. C., Josso N. & Frézal J., Mapping for the gene of anti-Müllerian hormone to the short arm of human chromosome 19. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 1987, 44, 2-6.
- Farag T. I., Familial persistent Müllerian duct syndrome in Kuwait and neighboring populations. *Am. J. Med. Genet.*, 1993, 47, 432-434.
- Faure E., Gouédard L., Imbeaud S., Cate R. L., Picard J. Y., Josso N. & di Clemente N., Mutant isoforms of the anti-Müllerian hormone type II receptor are not expressed at the cell membrane. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 30571-30575.
- Guerrier D., Tran D., van der Winden J. M., Hideux S., Van Outryve L., Legeai L., Bouchard M., van Vliet G., de Laet M. H., Picard J. Y., Kahn A. & Josso N., The persistent müllerian duct syndrome: a molecular approach. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1989, 68, 46-52.
- Gouédard L., Chen Y. G., Thevenet L., Racine C., Borie S., Lamarre I., Josso N., Massagué J. & di Clemente N., Engagement of bone morphogenetic protein type IB receptor and Smad1 signaling by anti-Müllerian hormone and its type II receptor. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 27973-27978.
- Imbeaud S., Faure E., Lamarre I., Mattéi M. G., di Clemente N., Tizard R., Carré-Eusebe D., Belville C., Tragethon L., Tonkin C., Nelson J., McAuliffe M., Bidart J. M., Lababidi A., Josso N., Cate R. L. & Picard J. Y., Insensitivity to anti-Müllerian hormone due to a spontaneous mutation in the human anti-Müllerian hormone receptor. *Nat. Genet.*, 1995, 11, 382-388.
- Imbeaud S., Belville C., Messika-Zeitoun L., Rey R., di Clemente N., Josso N. & Picard J. Y., A 27 base-pair deletion of the anti-Müllerian type II receptor gene is the most common cause of the persistent Müllerian duct syndrome. *Hum. Mol. Genet.*, 1996, 5, 1269-1279.
- Jost A., Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophysal hormones. *Rec. Progr. Horm. Res.*, 1953, 8, 379-418.
- Loeff D. S., Imbeaud S., Reyes H. M., Meller J. L. & Rosenthal I. M., Surgical and genetic aspects of persistent Müllerian ducts syndrome. *J. Pediatr. Surg.*, 1994, 29, 61-65.
- Massagué J. & Chen Y. G., Controlling TGF-beta signaling. *Gene Develop.*, 2000, 14, 627-644.
- Rey R., Lhommé C., Marcillac I., Lahlou N., Duvillard P., Josso N. & Bidart JM. Anti-Müllerian hormone as a serum marker of granulosa-cell tumors of the ovary: comparative study with serum alpha-inhibin and estradiol. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1996, 174, 958-965.
- Rey R. A., Belville C., Nihoul-Fékété C., Michel-Calemard L., Forest M. G., Lahlou N., Jaubert F., Mowszowicz I., David M., Saka N., Bouvattier C., Bertrand A. M., Lecointre C., Soskin S., Cabrol S., Crosnier H., Léger J., Lortat-Jacob S., Nicolino M., Rabl W., Toledo S. P. A., Bas F., Gompel A., Czernichow P., Chatelain P., Morel Y., Rappaport R. & Josso N., Evaluation of gonadal function in 107 intersex patients by means of serum anti-Müllerian hormone measurement. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1999, 84, 627-631.
- Visser J. A., Olaso R., VerhoefPost M., Kramer P., Themmen A. P. N., Ingraham H. A., The serine-threonine transmembrane receptor ALK2 mediates Müllerian inhibiting substance signaling. *Mol. Endocrinol.*, 2001, 15, 936-945.
- Wilson C. A., di Clemente N., Ehrenfels C., Pepinsky R. B., Josso N., Vigier B. & Cate R. L., Müllerian inhibiting substance requires its N-terminal domain for maintenance of biological activity, a novel finding within the TGF β superfamily. *Mol. Endocrinol.*, 1993, 7, 247-257.