

2m11.2917-9

Université de Montréal

**L'empreinte génomique: Paradigmes
du Syndrome de Beckwith-Wiedemann et du Syndrome de Turner**

par

Catherine Hamelin

Programme de sciences biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences biomédicales

Août, 2001

© Catherine Hamelin, 2001



W
4
U58
2001
N. 127

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**L’empreinte génomique: Paradigmes
du Syndrome de Beckwith-Wiedemann et du Syndrome de Turner**

présenté par:

Catherine Hamelin

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Guy Van Vliet

Président du jury

Dr Cheri Deal

Directrice de recherche

Dr Michèle Brochu

Membre du jury

RÉSUMÉ

Nous avons étudié l’empreinte génomique, phénomène de régulation épigénétique, en relation avec le Syndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS) (macrosomie pré- et postnatale) et le Syndrome de Turner (TS) (monosomie complète ou partielle du chromosome X).

Plusieurs défauts génétiques en 11p15.5 ont été décrits dans le BWS. Nous émettons l’hypothèse que des altérations épigénétiques au centre de contrôle de l’empreinte BWSIC1 peuvent expliquer la discordance phénotypique du BWS chez une paire de jumelles monozygotiques (MZ). Le génotypage de sites polymorphiques a confirmé la monozygotité prédite par l’examen histologique du placenta. Aucun réarrangement chromosomique ou isodisomie paternelle en 11p15.5 n’a été trouvé. Une méthylation biallélique au BWSIC1, évaluée par séquençage au bisulfite, a été uniquement observé chez la jumelle BWS. Nos résultats constituent la première démonstration d’une divergence des profils de méthylation en BWSIC1 chez des jumelles MZ discordantes pour le BWS et suggèrent une étiologie à cette discordance.

Un rôle de l’empreinte dans le TS est suggéré par la prévalence plus élevée du caryotype 45, X^{mat}. Notre étude vise à déterminer si l’origine parentale du chromosome X intact influence le poids et la taille (à la naissance et adultes), la réponse au traitement à l’hormone de croissance et la présence de troubles auditifs neurosensoriels (N=108 patientes). Le génotypage de 11 microsatellites hautement polymorphiques, nous a permis de confirmer l’origine parentale de l’X en respectant un pouvoir de discrimination <0,001 (patientes X^{mat}) *versus* <0,01 (patientes X^{pat}). Nos résultats préliminaires démontrent la prédominance de 1.4 fois du X^{mat} sur le X^{pat} (n=22). Une fois l’analyse des échantillons complétée (étude pan-canadienne en cours), nous vérifierons statistiquement l’existence d’une relation entre certains traits phénotypiques et l’origine parentale du chromosome X.¹

¹ Mots clés: épigénétique, méthylation, origine parentale, chromosome 11, chromosome X, jumeaux monozygotiques, microsatellites, GH, IGF2, H19.

ABSTRACT

Our research entailed the study of genomic imprinting in relation to the Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) (pre and postnatal macrosomia) and Turner syndrome (TS) (complete or partial chromosome X monosomy).

BWS maps to 11p15.5, where multiple abnormalities have been described. We hypothesized that epigenetic phenomena at the imprinting center BWSIC1 or BWSIC2 could explain the phenotypic discordance for BWS seen in our monozygotic girl twin pair. Monozygosity, based on placental histopathology, was confirmed by analysis of multiple polymorphic sites. No evidence was found for chromosomal rearrangements or paternal uniparental disomy. Biallelic methylation at BWSIC1, evaluated by bisulfite sequencing, was observed only in the affected twin. This is the first demonstration of divergent methylation profiles at BWSIC1 in MZ twins discordant for BWS, and suggests that epigenetic modifications may be responsible for the observed discordance.

The higher prevalence of the 45,X^{mat} karyotype in TS suggests a possible role of genomic imprinting. In order to evaluate the influence of parental origin of the X chromosome on birth weight and length, final height and weight, effect of growth hormone therapy on accrued height, and frequency of sensorineural hearing defects (N=108), 11 highly polymorphic microsatellites were studied for use in genotyping patients with TS and their mothers. Parental origin of intact X chromosomes was confirmed using a power of discrimination <0,001 (X^{mat} patients) *versus* <0,01 (X^{pat} patients). To date, X^{mat} has been found 1.4 times more frequently than X^{pat} (n=22). The statistical importance of the parental origin of chromosome X with respect to the above described phenotypic traits will be evaluated once genotyping of all samples is complete (pan-Canadian study in progress).¹

¹ Key words: genomic imprinting, Beckwith-Wiedemann syndrome, Turner syndrome, epigenetic, methylation, chromosome X, monozygotic twins, GH, IGF2, H19.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|------------------------------|-------|
| Identification du jury | ii |
| Résumé | iii |
| Abstract | iv |
| Table des matières | v |
| Liste des tableaux | x |
| Liste des figures | xi |
| Liste des sigles | xiii |
| Liste des abréviations | xiv |
| Remerciements | xviii |

CHAPITRE 1: CONCEPT D'EMPREINTE GÉNOMIQUE

| | |
|---|-----------|
| 1.1. DÉFINITION | 3 |
| 1.2. ONTOGENÈSE ET PROGRAMMATION ÉPIGÉNÉTIQUE | 8 |
| 1.3. MÉCANISMES MOLÉCULAIRES | 10 |
| <i>1.3.1. Méthylation différentielle de l'ADN</i> | <i>11</i> |
| 1.3.1.1. Généralités | 11 |
| 1.3.1.2. Méthyltransférases | 12 |
| <i>1.3.2. Autres facteurs épigénétiques de régulation</i> | <i>14</i> |
| 1.3.2.1. Protéines de liaison aux CpG méthylés | 14 |
| 1.3.2.2. Déacétylation des histones | 15 |
| 1.3.2.3. Hétérochromatine | 16 |
| 1.3.2.4. ARN non codants et antisens | 17 |
| 1.3.2.5. Éléments de frontière | 19 |
| 1.4. ANALYSE ÉVOLUTIVE | 20 |
| 1.5. INTÉRÊTS ÉVOLUTIFS | 21 |
| 1.5.1. Théorie du conflit parental | 22 |
| 1.5.2. Maintien de la reproduction sexuée | 23 |
| 1.5.3. Défense de l'organisme | 23 |
| 1.5.4. Hypothèses diverses | 24 |

| | | |
|--|---|----|
| 1.6. | CONSÉQUENCES CLINIQUES | 25 |
| | | |
| CHAPITRE 2: EMPREINTE GÉNOMIQUE DANS LE CONTEXTE DE JUMELLES MONOZYGOTIQUES DISCORDANTES POUR LE SYNDROME DE BECKWITH-WIEDEMANN | | |
| | | |
| 2.1. | REVUE DE LITTÉRATURE | 28 |
| 2.1.1. | <i>Caractérisation clinique du BWS</i> | 28 |
| 2.1.2. | <i>Génétique du BWS</i> | 30 |
| 2.1.2.1. | <i>Mode de transmission</i> | 30 |
| 2.1.2.2. | <i>Organisation moléculaire du chromosome 11p15.5</i> | 32 |
| 2.1.2.2.1. | <u>Gènes candidats</u> | 34 |
| 2.1.2.2.1.1. | IGF2 | 34 |
| 2.1.2.2.1.2. | H19 | 35 |
| 2.1.2.2.1.3. | p57 ^{KIP2} | 36 |
| 2.1.2.2.1.4. | KVLQT1 et LIT1 | 37 |
| 2.1.2.2.2. | <u>Régions de réarrangements chromosomiques (BWSCR)</u> | 39 |
| 2.1.2.2.3. | <u>Centres de contrôle de l’empreinte</u> | 39 |
| 2.1.2.2.3.1. | BWSIC1 | 40 |
| 2.1.2.2.3.2. | BWSIC2 | 41 |
| 2.1.2.3. | <i>Pathogenèse moléculaire du BWS: Interactions des divers éléments régulateurs</i> | 42 |
| 2.1.3. | <i>Corrélations génotypes-phénotypes/épigénotypes-phénotypes</i> | 45 |
| 2.1.4. | <i>Discordance entre jumeaux monozygotiques</i> | 47 |
| 2.2. | MATÉRIEL ET MÉTHODES | 51 |
| 2.2.1. | <i>Patientes à l’étude</i> | 51 |

| | | |
|----------|--|----|
| 2.2.2. | <i>Confirmation de l'état de zygotité des jumelles</i> | 53 |
| 2.2.2.1. | <i>Génotypage du locus 11p15.5</i> | 54 |
| 2.2.2.2. | <i>Génotypage du chromosome 7</i> | 55 |
| 2.2.2.3. | <i>Génotypage du chromosome X</i> | 56 |
| 2.2.3. | <i>Analyse des différences de méthylation de la région bis 2</i> | 56 |
| 2.2.3.1. | <i>Traitement au bisulfite</i> | 56 |
| 2.2.3.2. | <i>PCR de la région bis2</i> | 57 |
| 2.2.3.3. | <i>Séquençage du produit de PCR</i> | 58 |
| 2.2.3.4. | <i>Clonage et séquençage des produits de PCR bis2</i> | 58 |
| 2.3. | RÉSULTATS | 60 |
| 2.3.1. | <i>Monozygotité et absence d'isodisomie parentale</i> | 60 |
| 2.3.2. | <i>Méthylation différentielle de la région bis2</i> | 64 |
| 2.4. | DISCUSSION | 69 |
| 2.4.1. | <i>Caractère MZ des jumelles discordantes pour le BWS</i> | 69 |
| 2.4.2. | <i>Absence d'UPD</i> | 70 |
| 2.4.3. | <i>Défaut de méthylation du centre de contrôle BWSIC1</i> | 71 |
| 2.4.4. | <i>Pertinence clinique de l'hyperméthylation de H19</i> | 72 |
| 2.4.5. | <i>Étiologie des défauts de méthylation</i> | 73 |
| 2.4.6. | <i>Perspectives expérimentales</i> | 74 |

CHAPITRE 3: EMPREINTE GÉNOMIQUE ET SYNDROME DE TURNER

| | | |
|----------|--|----|
| 3.1. | REVUE DE LITTÉRATURE | 76 |
| 3.1.1. | <i>Caractérisation clinique du TS</i> | 76 |
| 3.1.1.1. | <i>Généralités</i> | 76 |
| 3.1.1.2. | <i>Courte taille: Pertinence du traitement à l'hormone de croissance</i> | 78 |

| | |
|--|-----|
| 3.1.2. Génétique | 79 |
| 3.1.2.1. <i>Variabilité caryotypique et mosaïcisme</i> | 79 |
| 3.1.2.2. <i>Implication du chromosome X</i> | 82 |
| 3.1.2.2.1. <u>Inactivation de l'X</u> | 82 |
| 3.1.2.2.2. <u>Gènes candidats: Rôle majeur du gène SHOX</u> | 83 |
| 3.1.2.3. <i>Étiologie du TS: Explication d'une régulation par l'empreinte génomique</i> | 86 |
| 3.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES | 88 |
| 3.2.1. <i>Population à l'étude</i> | 88 |
| 3.2.2. <i>Récolte des échantillons</i> | 88 |
| 3.2.3. <i>Analyses moléculaires: Détermination de l'origine parentale du chromosome X</i> | 89 |
| 3.2.3.1. <i>Génotypage</i> | 89 |
| 3.2.3.2. <i>Détermination de l'origine parentale</i> | 92 |
| 3.2.3.3. <i>Statistiques</i> | 92 |
| 3.3. RÉSULTATS | 93 |
| 3.4. DISCUSSION | 103 |
| 3.4.1. <i>Approche expérimentale utilisée</i> | 103 |
| 3.4.1.1. <i>Génotypage par l'utilisation de microsatellites</i> | 103 |
| 3.4.1.2. <i>Calcul du PD</i> | 106 |
| 3.4.2. <i>Analyse raisonnée des corrélations attendues</i> | 107 |
| 3.4.2.1. <i>Influence de l'origine parentale de l'X intact sur l'expression de divers traits phénotypiques</i> | 107 |
| 3.4.2.2. <i>Influence de l'origine parentale de l'X intact sur la réponse au traitement à la GH</i> | 109 |

| | |
|---|--------|
| CONCLUSION GÉNÉRALE | 111 |
| Bibliographie | 114 |
| Annexe I: Formulaire de consentement pour l'étude GDCT | xx |
| Annexe II: Résumés (BWS et TS) présentés lors de congrès..... | .xxvii |

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 1 Concept d’empreinte génomique

| | | |
|-------------|--|----|
| Tableau I: | Gènes soumis à l’empreinte génomique connus chez l’humain et la souris. | 7 |
| Tableau II: | Gènes soumis à l’empreinte génomique associés à un transcrit antisens non codant. | 18 |

Chapitre 2 Empreinte génomique dans le contexte de jumelles monozygotiques discordantes pour le Syndrome de Beckwith-Wiedemann

| | | |
|--------------|---|----|
| Tableau III: | Distribution et caractéristiques cytogénétiques et moléculaires des patients atteints du BWS. | 31 |
| Tableau IV: | Confirmation de la monozygotité des jumelles discordantes pour le BWS. | 63 |
| Tableau V: | Analyse des différences de méthylation des sites de la région bis2 en 5’ du promoteur <i>H19</i> effectuée sur l’ADNg et sur plusieurs clones chez les jumelles monozygotiques discordantes pour le BWS. | 65 |

Chapitre 3 Empreinte génomique et Syndrome de Turner

| | | |
|---------------|---|-----|
| Tableau VI: | Résumé d’études portant sur la prévalence du chromosome Y cryptique et du mosaïcisme dans le TS. | 80 |
| Tableau VII: | Détermination de l’origine parentale suite à l’obtention du pouvoir de discrimination..... | 97 |
| Tableau VIII: | Origine parentale du chromosome X intact chez des filles atteintes du TS-Résumé des échantillons génotypés..... | 100 |

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1 Concept d’empreinte génomique

| | | |
|-----------|--|---|
| Figure 1: | Différences transcriptionnelles des gènes soumis et non soumis à l’empreinte génomique. | 4 |
| Figure 2: | Retard de croissance observé chez des hétérozygotes lorsque l’allèle est paternellement transmis. | 6 |
| Figure 3: | Ontogenèse de l’empreinte génomique. | 9 |

Chapitre 2 Empreinte génomique dans le contexte de jumelles monozygotiques discordantes pour le Syndrome de Beckwith-Wiedemann

| | | |
|-----------|--|----|
| Figure 4: | Organisation moléculaire du chromosome 11p15.5. | 33 |
| Figure 5: | Jumelles monozygotiques discordantes pour le BWS. | 52 |
| Figure 6: | Génotypage des jumelles et de leurs parents au locus 11p15.5. | 61 |
| Figure 7: | Génotypage des polymorphismes –185 et –202 du gène <i>IGFBP3</i> | 62 |
| Figure 8: | Comparaison de la méthylation des sites 16 à 23 de la région bis2 chez la jumelle I atteinte et la jumelle II non atteinte. | 66 |
| Figure 9: | Hyperméthylation du centre de contrôle BWSIC1 chez la jumelle atteinte du BWS. | 67 |

Chapitre 3 Empreinte génomique et Syndrome de Turner

| | | |
|------------|--|----|
| Figure 10: | Structure et fonction des chromosomes sexuels. | 84 |
| Figure 11: | Microsatellites spécifiques au chromosome X humain utilisés dans le génotypage des patientes atteintes du TS. | 90 |
| Figure 12: | Comparaison des techniques de marquage utilisées. | 94 |

| | | |
|------------|--|-----|
| Figure 13: | L'origine parentale des allèles suite à l'amplification d'un microsatellite chez des patientes 45,X atteintes du TS (e.g., DXS7100). | 95 |
| Figure 14: | Analyse de microsatellites dans la détermination de l'origine parentale du chromosome X intact chez des filles atteintes du TS (45,X). | 96 |
| Figure 15: | Ambiguïtés rencontrées en cours d'étude. | 99 |
| Figure 16: | Prévalence du chromosome X ^{mat} versus celui X ^{pat} chez des filles atteintes du Syndrome de Turner. | 102 |

LISTE DES SIGLES

| | |
|--|-----------------------|
| x: | fois, multiplication |
| <: | inférieur à |
| >: | supérieur à |
| %: | pourcent |
| °C: | degré Celsius |
| cm: | centimètre |
| Kb: | kilobase |
| M: | molaire |
| Mb: | mégabase |
| MgCl ₂ : | chlorure de magnésium |
| mM: | millimolaire |
| μCi: | microcurie |
| μg: | microgramme |
| μl: | microlitre |
| μM: | micromolaire |
| ng: | nanogramme |
| NaOH: | hydroxyde de sodium |
| NH ₄ C ₂ H ₃ O ₂ : | acétate d'ammonium |
| pb: | paire de bases |
| pmol: | picomole |
| T°: | température |
| U: | unité |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|-----------------------------|--|
| ADN: | acide désoxyribonucléique |
| ADNg: | acide désoxyribonucléique génomique |
| ARN: | acide ribonucléique |
| ARNm: | acide ribonucléique messenger |
| AS: | <i>Angelman syndrome</i> (Syndrome d'Angelman) |
| α - ³² P: | phosphate 32 lié en position alpha |
| BPB: | <i>bromophenol blue</i> (bleu de bromophénol) |
| BWS: | <i>Beckwith-Wiedemann syndrome</i> (Syndrome de Beckwith-Wiedemann) |
| BWSCR: | <i>Beckwith-Wiedemann syndrome chromosomal rearrangements region</i> (région de réarrangements chromosomiques associée au Syndrome de Beckwith-Wiedemann) |
| BWSIC1: | <i>Beckwith-Wiedemann syndrome imprinting center 1</i> (centre 1 de contrôle de l'empreinte associé au Syndrome de Beckwith-Wiedemann) |
| BWSIC2: | <i>Beckwith-Wiedemann syndrome imprinting center 2</i> (centre 2 de contrôle de l'empreinte associé au Syndrome de Beckwith-Wiedemann) |
| CDK: | <i>cyclin dependant kinases</i> (cycline dépendante des kinases) |
| CPAP: | <i>control positive alveolar pressure</i> |
| CpG: | cytosine-phosphate-guanine |
| CTCF: | <i>CCCTC-binding factor; vertebrate enhancer-blocking protein</i> |
| dATP: | désoxyadénosine triphosphate |
| dCTP: | désoxycytidine triphosphate |
| ddNTP: | didésoxynucléoside triphosphate |
| dGTP: | désoxyguanosine triphosphate |
| DMR: | <i>differentially methylated regions</i> (régions de méthylation différentielle) |
| DMSO: | <i>dimethyl sulfoxide</i> |
| Dnmt: | <i>DNA methyltransferases</i> (ADN méthyltransférases) |

| | |
|---|---|
| dNTP: | désoxynucléoside triphosphate |
| dTTP: | désoxythymidine triphosphate |
| EDTA: | <i>ethylene diamine tetraacetate</i> |
| FISH: | <i>fluorescence in situ hybridisation</i> (hybridation in situ par fluorescence) |
| γ - ³² P: | phosphate 32 lié en position gamma |
| G ₁ P ₀ A ₀ V ₂ : | gravida: 1; préterme: 0 ; avortement: 0; enfants vivants: 2 |
| <i>Grb10</i> : | <i>growth factor receptor-bound protein 10</i> |
| GH: | <i>growth hormone</i> (hormone de croissance) |
| HDAC: | <i>histone deacetylases</i> (histones déacétylases) |
| HLA: | <i>human leukocyte antigens</i> |
| IC: | imprinting center (centre de contrôle de l’empreinte) |
| <i>IGFBP3</i> : | <i>human insulin-like growth factor-binding protein 3 gene</i> |
| <i>Igf1</i> : | <i>mouse insulin-like growth factor 1 gene</i> |
| <i>Igf1r</i> : | <i>mouse insulin-like growth factor 1 receptor gene</i> |
| <i>IGF2</i> : | <i>human insulin-like growth factor 2 gene</i> |
| <i>IGF2-AS</i> : | <i>human insulin-like growth factor 2-antisens gene</i> |
| <i>IGF2R</i> : | <i>human insulin-like growth factor 2 receptor gene</i> |
| <i>IGF-II</i> : | <i>human insulin-like growth factor 2 peptide</i> |
| IMP: | <i>IGF-II mRNA-binding protein</i> |
| <i>INS</i> : | <i>human insulin gene</i> |
| KvDMR1: | <i>potassium voltage differentially methylated region 1</i> |
| <i>KvLQT1</i> : | <i>potassium voltage long QT syndrome 1 gene</i> |
| LARs: | <i>loop attachment regions</i> (régions d’attachement en boucles) |
| <i>LIT1</i> : | <i>long QT intronic transcript 1 gene</i> |
| LOH: | <i>loss of heterozygosity</i> (perte d’hétérozygoté) |
| LOI: | <i>loss of imprinting</i> (perte d’empreinte) |
| MARs: | <i>matrix attachment regions</i> (régions d’attachement à la matrice) |
| MBD: | <i>methyl-CpG-binding-domain</i> (domaine de liaison aux îlots CpG méthylés) |
| MeCP: | <i>methyl-CpG-binding protein</i> (protéine de liaison aux îlots CpG méthylés) |

| | |
|--------------------|--|
| MZ: | monozygote et/ou monozygosit  |
| OMIM: | online mendelian inheritance in man (base de données de l'Universit  Johns Hopkins) |
| PAR: | pseudoautosomal region (région pseudoautosomale) |
| PCR: | <i>polymerase chain reaction</i> |
| PD: | pouvoir de discrimination |
| PW: | <i>Prader-Willi syndrome</i> (Syndrome de Prader-Willi) |
| QI: | quotient intellectuel |
| RFLP: | <i>restriction fragment length polymorphism</i> |
| SDS: | <i>standard deviation score</i> |
| <i>SHOX</i> : | <i>short stature homeobox containing gene</i> |
| SSCP: | <i>single-strand conformational polymorphism</i> |
| TE: | <i>tris[hydroxymethyl]aminomethane ethylene diamine tetraacetate</i> |
| TRD: | <i>transcriptional-repression domain</i> (domaine de répression transcriptionnelle) |
| TS: | Turner syndrome (Syndrome de Turner) |
| UPD: | uniparental disomy |
| XC: | xylène cyanol |
| Xce: | <i>X-chromosome-controlling element</i> ( l ment de contrôle du chromosome X) |
| Xi: | chromosome X inactif |
| XIC: | <i>X-chromosome-inactivation-center</i> (centre de contrôle de l'inactivation de l'X) |
| <i>XIST</i> : | <i>human X inactive specific transcript gene</i> |
| X ^{mat} : | chromosome X d'origine maternelle |
| X ^{pat} : | chromosome X d'origine paternelle |

*À Maman
et Papa....*

«Qui, une fois encore, m'ont accompagnée vers le chemin de la réussite...»

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail et de ce long cheminement académique, j'aimerais remercier tout spécialement les gens qui ont marché à mes côtés. Lesquels ont su, à leur manière, me faire garder la route... ainsi que me donner le courage de toujours persévérer!

En premier lieu, j'aimerais souligner ma sincère gratitude envers le Dr. Cheri Deal pour cette toute première opportunité qu'elle m'offrit en m'accueillant au sein de son laboratoire alors que je n'étais qu'inexpérimentée.

Cheri, Mon mentor!

Mille fois merci...

Pour ces défis excitants et enrichissants que tu ne cesses de placer sur ma route...

Pour ce généreux transfert de connaissances et d'expérience...

Pour cette confiance professionnelle que tu m'accordes jour après jour...

Pour cette compréhension, cette chaleur «maternelle» qui bien souvent m'apaise...

Je tiens par la suite à remercier chaleureusement Jean, Élisabeth et Dr. Guy Van Vliet. «Précieux» est sans aucun doute le qualificatif qui décrit le mieux le dévouement, le soutien ainsi que la patience dont vous avez fait preuve à mon égard. Vous avez contribué ardemment à maintenir la flamme! Un vent d'enthousiasme m'envahit à l'idée de poursuivre avec vous, pour quelques années encore, ma quête de connaissances...

Sans oublier évidemment...

Mon clin d'œil particulier aux autres membres de l'équipe du Service d'endocrinologie...

C'est une joie constante de vous retrouver tous les matins!

Sur le plan plus personnel, j'aimerais remercier...

Marie, À celle que je peux sans contredit surnommer «*Ma Bosom Friend*»...
Merci pour toutes ces années de véritable amitié!
Merci d'avoir été si souvent à l'écoute, d'avoir été ma conseillère!

Matthieu, Je ne peux passer sous silence toutes ces heures de discussions, de patience
et de réconfort... Bien souvent pendant ces nombreux jours de labeur...
Ton esprit, ta force morale, tes encouragements et ton respect ont su
soulager mes angoisses.

Sincèrement, merci d'avoir cru en moi!

Ainsi que, Maman, Papa et Stéphanie,

Je ne sais comment vous témoigner ma profonde reconnaissance envers votre
amour inconditionnel, votre appui sans limite, votre foi... Vous m'avez inculqué depuis
toutes ces années des valeurs si précieuses, presque inébranlables... En les chérissant,
elles sont devenues les lignes directrices qui guident mes pas au fil du temps, qui me
donnent une force (souvent inexplicable), un regard délicieux sur la vie, un goût du
dépassement, du don de soi... et qui, inévitablement m'inspirent et me font espérer un
avenir empreint d'optimisme, d'humanisme, de philosophie et de sagesse...

Vous êtes... Mes phares dans la nuit, Mes soleils immortels!

CHAPITRE 1

CONCEPT D'EMPREINTE GÉNOMIQUE

Les principes de la génétique classique émis par Gregor Mendel stipulent que la transmission des caractères héréditaires chez un individu résulte d'une contribution équivalente des génomes maternel et paternel. Au début des années 1980, au moyen d'expériences de transplantations pronucléaires chez la souris, les groupes de McGrath et Solter (McGrath et Solter, 1984; Paldi et Jami, 1991) ainsi que de Surani (Surani *et al.*, 1984) rapportèrent les premières évidences permettant de faire la lumière sur certaines lacunes de la ligne directrice mendélienne. En comparant leurs modèles androgénique (embryon constitué strictement de paires de chromosomes d'origine paternelle) et gynogénique (embryon constitué strictement de paires de chromosomes d'origine maternelle), ils observèrent des différences structurales majeures lors du développement embryonnaire. En effet, le développement de l'androgénote se limite aux structures extraembryonnaires tandis que celui du gynogénote présente une organisation placentaire restreinte ainsi qu'une croissance fœtale relativement normale. Chez l'humain, il nous est possible d'observer des phénomènes similaires lors de grossesses anormales. La mole hydatidiforme complète (modèle androgénique) est une organisation tissulaire trophoblastique dans laquelle aucun tissu fœtal n'est présent (Lawler, 1984; Crum, 1994; Preece and Moore, 2000). À l'inverse, le kyste dermoïde ovarien et le tératome ovarien (modèles gynogéniques) se présentent en un spectre de tissus somatiques sans révéler d'éléments placentaires (Linder *et al.*, 1975; Hall, 1990; Crum, 1994).

Nous constatons grâce à ces observations que les génomes maternel et paternel des mammifères sont incapables d'assurer à eux seuls un développement embryonnaire normal. L'apport de chacun aux tissus embryonnaires est spécifique. Malgré leur constitution génétique identique, mis à part les chromosomes sexuels, les génomes parentaux possèdent une fonctionnalité non équivalente. En réalité, les parents apportent à leur progéniture une contribution génétique complémentaire.

L'un des défis considérables de la génétique moderne vise à comprendre les mécanismes entourant les gènes qui ne se transmettent pas selon les principes classiques de l'hérédité, i.e., soit par une transmission dominante, récessive ou liée au chromosome X. L'empreinte génomique est un nouveau concept de régulation génique, dont les mécanismes sont encore mal compris, démontrant l'existence de gènes exprimés à partir

d'un seul génome parental. Les gènes soumis à l'empreinte génomique sont associés à plusieurs aspects du développement incluant la croissance fœto-placentaire, la prolifération et la différenciation cellulaire, le développement neural ainsi que le comportement (Falls *et al.*, 1999). Il apparaît clair que les effets d'une altération de l'empreinte génomique sont impliqués dans plusieurs désordres génétiques humains.

1.1. DÉFINITION

Le concept d'empreinte génomique désigne un processus épigénétique conduisant à l'expression préférentielle d'un gène selon son origine parentale. Ainsi, l'expression d'un gène soumis à l'empreinte maternelle sera soutenue par l'allèle paternel (Fig. 1) (Deal, 1995). L'expression monoallélique des gènes soumis à l'empreinte n'est pas absolue: elle peut varier selon le contexte génétique, la nature tissulaire ainsi que la période de développement. Il ne s'agit pas toujours d'une expression monoallélique complète. Il peut y avoir également des différences quantitatives d'expression. De plus, les modifications de l'ADN, régissant la régulation transcriptionnelle de ces gènes, sont réversibles, d'où l'appellation «épigénétique». Ces modifications n'entraînent aucune altération de la séquence nucléotidique (Hall, 1990). En réalité, elles sont responsables des différences d'expression entre les génomes parentaux dans les tissus somatiques et ce, de manière à limiter l'expression génique à l'allèle d'un seul parent.

Les premiers gènes soumis à l'empreinte génomique à avoir été identifiés sont les gènes murins de l'*insulin-like growth factor 2 (Igf2)* et de son récepteur (*Igf2r*). Ils ont respectivement été cartographiés sur les chromosomes 7 et 17. La confirmation du statut d'empreinte d'*Igf2*, lequel code pour un facteur de croissance fœtale, provient d'expérimentations chez des souris porteuses d'une copie non fonctionnelle de ce gène (DeChiara *et al.*, 1991). Ces souris démontrent une restriction de croissance lorsqu'elles héritent de la copie paternelle mutée. Lorsque l'allèle déficient est d'origine maternelle, les souris ne sont pas affectées par ce retard. Ceci indique que le gène *Igf2* est soumis à une empreinte maternelle ou encore que l'allèle paternel exprime ce gène. Par contre *Igf2r*, lequel contribue à la régulation négative d'*Igf2* en le dégradant, est un gène

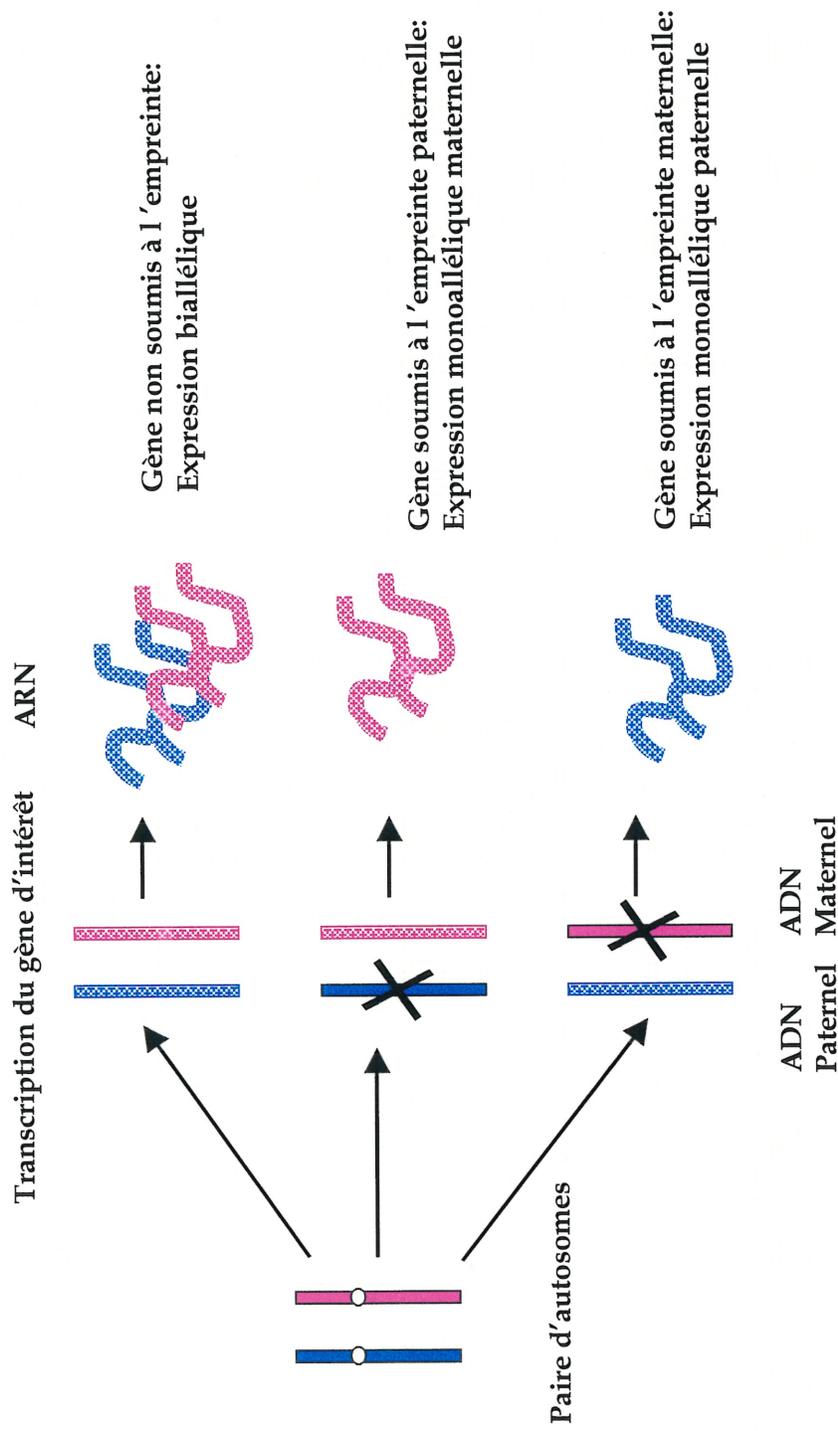


Figure 1: Différences transcriptionnelles des gènes soumis et non soumis à l'empreinte génomique. La contribution des gènes n'étant pas soumis à l'empreinte génomique provient des deux génomes parentaux. La contribution des gènes étant soumis à l'empreinte génomique est dépendante de l'origine parentale. D'après Deal C, 1995.

soumis à une empreinte paternelle, i.e., dont l'expression est dirigée par l'allèle maternel (Barlow *et al.*, 1991).¹ Le rôle essentiel de ce récepteur en tant que modérateur du développement a aussi été mis en évidence lors d'études mutationnelles. Dans ce contexte, la croissance fœtale est augmentée d'environ 30% lorsque les hétérozygotes et les homozygotes sont porteurs de la mutation par l'allèle maternel (Wang *et al.*, 1994; Falls *et al.*, 1999). Cette réciprocité d'empreinte indique que *Igf2* et *Igf2r* possèdent un rôle important dans le développement embryonnaire et la croissance fœtale. De plus, il faut considérer que la manifestation d'un phénotype, lorsqu'il y a transmission d'un gène soumis à l'empreinte, dépend du profil d'empreinte du gène impliqué (Fig. 2) (DeChiara *et al.*, 1991).

Il a été démontré subséquemment par notre équipe et d'autres groupes que les homologues humains d'*Igf2* et d'*Igf2r*, *IGF2* et *IGF2R* respectivement, sont aussi sujets à l'empreinte (Ohlsson *et al.*, 1993; Giannoukakis *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1997). Par ailleurs, ils sont respectivement assignés aux chromosomes humains 11 et 6.

Jusqu'à maintenant, une quarantaine de gènes soumis à l'empreinte génomique ont été mis en évidence chez l'humain et la souris (Tableau I) (Morison et Reeve, 1998a; Falls *et al.*, 1999; Preece et Moore, 2000; Jirtle, 2000; Moore *et al.*, 2001). Dans cette catégorie, le nombre de gènes existants est estimé à plus ou moins 200 gènes. Il semble cependant que ce nombre soit fort probablement inférieur à 1 000 (Barlow, 1995; Falls *et al.*, 1999; Maher et Reik, 2000). Considérant qu'il existe près de 30 000 gènes humains, nous pouvons penser que les gènes soumis à l'empreinte représentent moins de 1% du génome.

¹ Dorénavant, afin de simplifier la terminologie, le statut d'un gène soumis à l'empreinte génomique sera décrit en fonction de l'allèle qui exprime le gène.

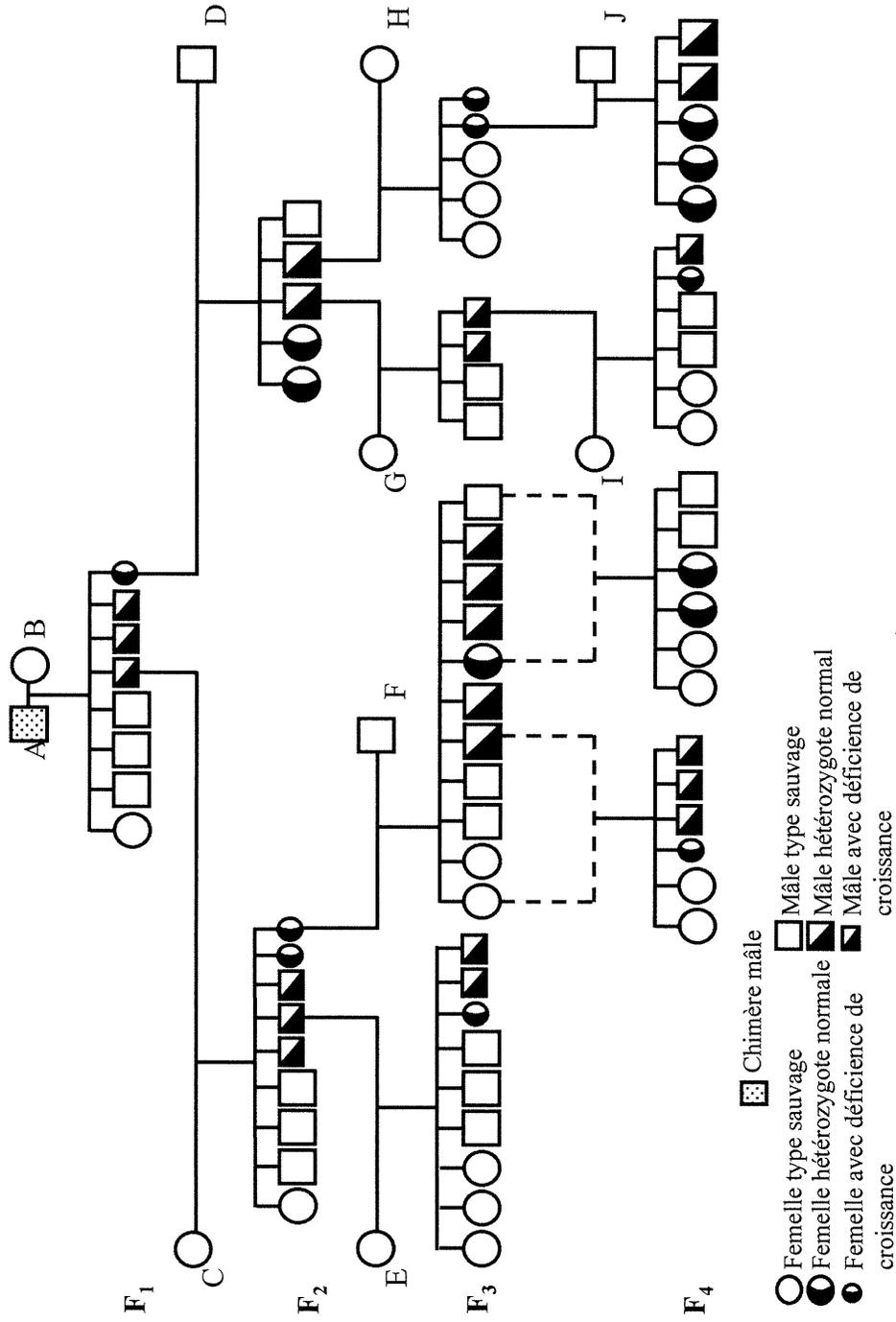


Figure 2: Retard de croissance observé chez des hétérozygotes lorsque l'allèle est paternellement transmis. Pedigree partiel de souris mutantes pour IGF-II. D'après De Chiara *et al.*, 1991.

| Humain | | | | Souris | | |
|------------|---|--|---|---|---|---|
| Chromosome | Position | Gène | Expression | Gène | Position | Expression |
| 1 | p31 p36 | <i>NOEY2/ARHI</i> <i>p73</i> | Paternelle Maternelle | | | |
| 5 | q22-q31 | <i>U2AFBPL</i> | Biallélique | <i>U2afbp-rs</i> | 11 proximal | Paternelle |
| 6 | q24 | <i>ZAC/PLAGL1/</i> <i>LOT1</i> | ND | | | |
| | q25.3-q26 | <i>MAS1</i> | Biallélique/monoallélique tissus mammaire | <i>Mas</i> | 17 proximal | Paternelle |
| | q26-q27 | <i>M6p/IGF2r</i> | Biallélique/maternelle* | <i>M6p/Igf2r</i> <i>Igf2r-AS</i> | 17 proximal 17 proximal | Maternelle Paternelle |
| 7 | p11.2-12 q32 q32 | <i>GRB10</i> <i>PEG1/MEST</i> <i>GAMMA2-COP</i> | ND Paternelle Paternelle | <i>Meg1/Grb10</i> <i>Peg1/Mest</i> | 11 proximal 6 proximal | Maternelle Paternelle |
| 11 | p13 | <i>WT1</i> | Biallélique/maternelle* | <i>Wt1</i> | 2 | ND |
| | p15.5 | <i>ASCL2/HASH2</i> | Maternelle | <i>Mash2</i> | 7 distal | Maternelle |
| | p15.5 | <i>H19</i> | Maternelle | <i>H19</i> | 7 distal | Maternelle |
| | p15.5 | <i>IGF2</i> | Paternelle | <i>Igf2</i> | 7 distal | Paternelle |
| | p15.5 | <i>IMPT1/BWRIA/</i> <i>ORCTL2/TSSC5</i> | Maternelle | <i>Igf2-AS</i> <i>Imp1</i> | 7 distal 7 distal | Paternelle Maternelle |
| | p15.5 | <i>INS</i> | Biallélique/paternelle sac vitellin | <i>Ins2</i> | 7 distal | Paternelle |
| | p15.5 | <i>IPL/TSSC3/</i> <i>BWR1C</i> | Maternelle | <i>Ipl</i> | 7 distal | Maternelle |
| | p15.5 | <i>ITM</i> | ND | <i>Itm</i> | 7 distal | Maternelle |
| | p15.5 | <i>KVLQT1</i> | Maternelle | <i>Kvlqt1</i> | 7 distal | Maternelle |
| | p15.5 | <i>p57^{ip2}/CDKN1C</i> | Maternelle | <i>p57^{ip2}</i> | 7 distal | Maternelle |
| | p15.5 | <i>TAPA1</i> | Biallélique† | <i>Tapa1</i> | 7 distal | Maternelle |
| | p15.5 | <i>ZNF215</i> | Maternelle | | | |
| 13 | q14 | <i>HTR2A</i> | Biallélique/maternelle* | <i>Htr2</i> | 14, bande D3 | Maternelle |
| 14 | q q32 | <i>MEG3/GTL2</i> <i>DLK1/PREF-1</i> | Maternelle Paternelle | <i>Meg3/Gtl2</i> <i>Dlk1/Pref-1</i> | 12 distal 12E-F1 | Maternelle Paternelle |
| 15 | q11-q13 q11-q13 q11-q13 q11-q13 q11-q13 q11-q13 q11-q13 q11-q13 q11-q13 q11-q13 q11-q13 q11-q13 q11-q13 | <i>FNZ127</i> <i>GABRA5</i> <i>GABRB3</i> <i>GABRG3</i> <i>IPW</i> <i>NDN</i> <i>PAR1</i> <i>PAR5</i> <i>PAR-SN</i> <i>SNRPN</i> <i>UBE3A</i> <i>ZNF127</i> | Paternelle Paternelle† Paternelle† Paternelle† Paternelle Paternelle Paternelle Paternelle Paternelle Paternelle Maternelle Paternelle | <i>Gabra5</i> <i>Gabrb3</i> <i>Gabrg3</i> <i>Ipw</i> <i>Ndn</i> | 7 central 7 central 7 central 7 central 7 central | Biallélique Biallélique Biallélique Paternelle Paternelle Paternelle Paternelle Paternelle Paternelle Paternelle Maternelle Paternelle |
| 19 | q13.4 | <i>PEG3</i> | Paternelle | <i>Peg3/Apoc2</i> | 7 proximal | Paternelle |
| 20 | q11.2-q12 q13 | <i>Neuronatine</i> <i>GNAS1</i> | ND Paternelle | <i>Peg5/Nnat</i> <i>Gnas1</i> | 2 distal 2 distal | Paternelle Maternelle/ Paternelle |
| X | q13.2 p11.23-qter | <i>XIST</i> ? | Paternelle/Maternelle* Paternelle | <i>Xist</i> | Xic | Paternelle |
| | | | | <i>Grf1/Cdc25tm</i> <i>Impact</i> <i>Ins1</i> | 9 distal 18 proximal 19 distal | Paternelle Paternelle Paternelle |

Tableau I: Gènes soumis à l’empreinte génomique connus chez l’humain et la souris. ND: Non déterminé; *Empreinte polymorphique; †Déterminé *in vitro*; •Inactivation aléatoire. Les encadrés sont en lien avec les chapitres 2 et 3 de ce mémoire. (Moore *et al.*, 2001; Preece *et al.*, 2000; Falls *et al.*, 1999; Morison *et al.*, 1998)

1.2. ONTOGENÈSE ET PROGRAMMATION ÉPIGÉNÉTIQUE

Nous ne connaissons pas encore précisément tous les éléments moléculaires impliqués dans l’empreinte génomique. En revanche, nous savons que l’empreinte génomique est un processus du développement basé sur quatre étapes majeures (Pfeifer, 2000). Premièrement, les chromosomes doivent être munis d’une ou plusieurs marques épigénétiques permettant la distinction de leur origine parentale: la méthylation est désignée comme étant la marque principale. Deuxièmement, cette marque ou empreinte doit être stable de manière à être maintenue au cours de la division et de la différenciation des cellules somatiques de l’organisme en développement. Il est crucial que l’empreinte demeure identique ou soit reproduite d’une division cellulaire à l’autre. Troisièmement, la marque parentale doit être reconnue par la machinerie transcriptionnelle pour permettre l’expression monoallélique. Finalement, de manière spécifique aux cellules germinales, la marque de l’empreinte doit être effacée et reprogrammée lors du passage des gènes à une nouvelle génération.

Déjà, dans l’embryon, les cellules germinales de la prochaine génération se développent. La figure 3 illustre l’ontogenèse de l’empreinte génomique (Surani, 1998; Falls *et al.*, 1999; Reik et Walter, 2001). De multiples résultats expérimentaux démontrent que l’établissement de l’empreinte se produit au moment où les chromosomes parentaux sont physiquement séparés pendant la gamétogenèse. Cependant, la programmation adéquate de la nouvelle empreinte nécessite initialement l’annulation de l’empreinte précédente. Cette étape est d’autant plus importante lorsque les gènes sont transmis à un individu de sexe opposé. L’effacement de l’empreinte a lieu au tout début de la gamétogenèse dans les cellules germinales primitives alors qu’une vague de déméthylation survient dans tout le génome (Tada *et al.*, 1997). Cette procédure consiste à établir entre les chromosomes homologues un profil d’empreinte identique avant le passage approprié dans la lignée germinale maternelle ou paternelle (Tada *et al.*, 1997). Les études de Szabó et de ses collègues sur l’expression allélique de *Igf2*, *Igf2r*, *Snrpn* (gène d’expression paternelle) et *H19* (gène d’expression maternelle) ont démontré que l’expression de ces gènes était biallélique dans les lignées germinales mâle et femelle lors de la migration des cellules germinales primitives vers la crête

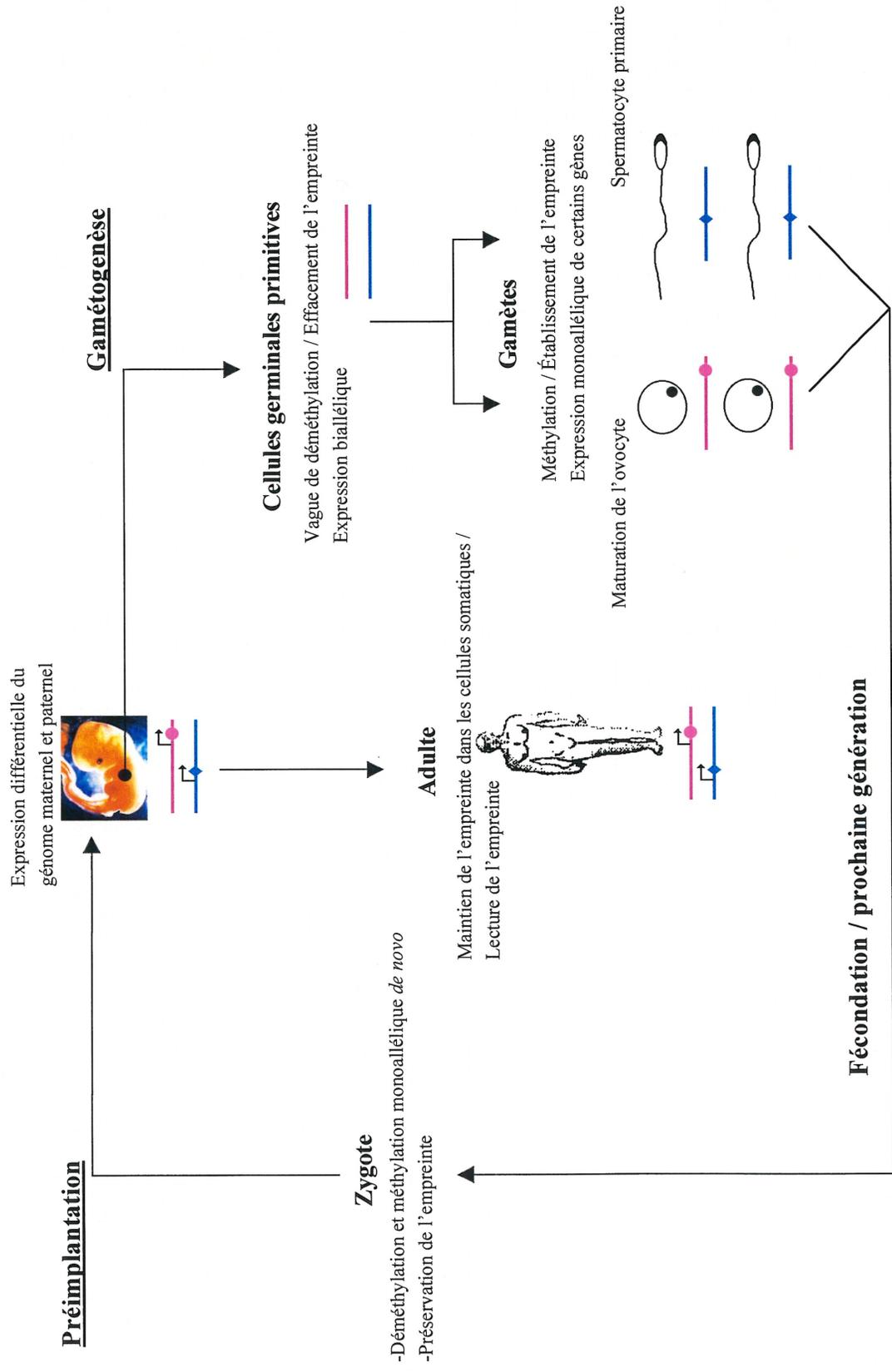


Figure 3: Ontogenèse de l’empreinte génomique. ● Gène maternellement exprimé; ◆ Gène paternellement exprimé.

génitale ainsi que tardivement dans la gamétogenèse (Szabo et Mann, 1995; Surani, 1998).

De plus, la mise au point d'embryons parthénogénètes à partir d'ovocytes immatures et d'ovocytes matures a permis de constater que l'apparition de l'empreinte maternelle a lieu lors du processus de maturation de l'ovocyte (Kono *et al.*, 1996; Obata *et al.*, 1998; Brannan et Bartolomei, 1999). C'est à ce moment que le patron maternel de méthylation s'organise permettant ainsi l'expression génique maternelle retrouvée dans le zygote. Du côté de la lignée germinale mâle, il a été démontré que l'empreinte est établie ou sur le point d'être établie juste avant la première division méiotique, i.e., lors d'un événement postmitotique dans le spermatocyte primaire (Ogura *et al.*, 1998; Brannan et Bartolomei, 1999; Ueda *et al.*, 2000). Une fois l'ovogenèse et la spermatogenèse complétées, l'empreinte est réorganisée. Ainsi, il peut y avoir fécondation en vue d'une prochaine génération.

Les règles entourant le maintien et l'évolution du profil de l'empreinte dans les cellules somatiques lors du développement embryonnaire ainsi qu'au cours de l'âge adulte ne sont pas encore élucidées. Plusieurs interrogations persistent concernant les changements de méthylation qui surviennent après la fécondation et la préimplantation de l'embryon (déméthylation), son implantation (méthylation *de novo*) ainsi que lors de des nombreuses divisions cellulaires. L'activité enzymatique des ADN méthyltransférases et des déméthylases a été proposée comme facteur régulateur de ces changements (Newell-Price *et al.*, 2000). Néanmoins, peu de chose est connu en ce qui a trait à la nature des régions différenciellement méthylées qui, lors de ces multiples variations de méthylation, sont ciblées ou préservées. Reste à savoir également lesquelles de ces régions détiennent une fonction véritable dans l'empreinte (Reik et Walter, 1998).

1.3. MÉCANISMES MOLÉCULAIRES

Une caractéristique fascinante des gènes mammaliens soumis à l'empreinte génomique est leur tendance à se rassembler dans le génome (*clustering*). Mentionnons

à titre d'exemple les régions 11p15.5 et 15q11-q13 du génome humain, respectivement associées au Syndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS) ainsi qu'au Syndrome de Prader-Willi (PW) et au Syndrome d'Angelman (AS). Cette façon de regrouper en un même domaine chromosomique des gènes dont le profil d'empreinte est identique ou réciproque laisse envisager une interdépendance entre ces gènes (Barlow, 1997; Brannan et Bartolomei, 1999). En d'autres mots, cette organisation reflète une régulation coordonnée de l'expression des gènes soumis à l'empreinte basée sur la présence d'éléments de régulation, nommés centres de contrôle de l'empreinte (IC) (Li, M. *et al.*, 1998). Les notions acquises au sujet du centre de contrôle de l'inactivation du chromosome X (Jamieson *et al.*, 1996; Goto et Monk, 1998; Avner et Heard, 2001) ont permis de mieux comprendre les IC spécifiques aux autosomes. Ces derniers sont en quelque sorte les «chefs d'orchestre» de l'empreinte génomique. Une seule erreur à cet endroit peut provoquer le dysfonctionnement de plusieurs gènes à la fois. Les IC assurent la programmation de l'empreinte dans les cellules germinales, laquelle nécessite l'interaction de phénomènes épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN, la structure de la chromatine ainsi que la déacétylation des histones (Li, M. *et al.*, 1998). La mise en place de plusieurs mécanismes impliquant des éléments régulateurs agissant en *cis* et en *trans* permet ainsi la modulation de l'expression allélique différentielle spécifique à l'empreinte.

1.3.1. Méthylation différentielle de l'ADN

1.3.1.1. Généralités

Les domaines chromosomiques regroupant des gènes soumis à l'empreinte sont souvent constitués de régions de plus de 500 pb riches en dinucléotides CG, nommées îlots CpG, situées en amont de plusieurs gènes (Reik et Walter, 2001). Ces îlots CpG constituent la cible principale de la méthylation: marque indéniable de l'empreinte génomique chez les mammifères. Près de 88% des gènes soumis à l'empreinte chez la souris en sont composés alors que la proportion habituelle est de 47% (Antequera et

Bird, 1993; Paulsen *et al.*, 2000). Le groupe méthyle transféré en 5' du résidu cytosine favorise la discrimination des allèles parentaux (Razin et Cedar, 1994). D'ailleurs, l'existence de régions différenciellement méthylées (DMR) entre les allèles parentaux est connue pour la majorité des gènes caractérisés (eg. *Igf2r*, *H19*, *IGF2* et *SNRPN*) (Razin et Cedar, 1994; Reik et Walter, 1998). Dans la région promotrice du gène *H19* par exemple, la méthylation est exclusive à l'allèle inactif paternel et elle est absente sur l'allèle maternel qui assure l'expression. Cette région est connue pour être à l'endroit d'un IC. Bien que la méthylation soit presque toujours associée à l'inhibition transcriptionnelle, comme mentionné ci-dessus, elle peut parfois être associée à l'activation de l'allèle, tel qu'observé pour les gènes *Igf2*, *Igf2r* et *Snrpn* (Reik et Walter, 1998). Ainsi, l'empreinte est inhibitrice lorsque la méthylation bloque directement l'expression en interférant avec la liaison d'un complexe stimulateur de la transcription ou indirectement en recrutant des facteurs qui induisent la formation d'une structure répressive de la chromatine. Inversement, l'empreinte est activatrice si la méthylation inhibe le recrutement de répresseurs transcriptionnels (Li *et al.*, 1993; Reik et Walter, 1998; Pfeifer, 2000; Sleutels *et al.*, 2000). Il est bien accepté maintenant, suite à des expériences de transplantation nucléaire, que la méthylation de l'ADN coïncide avec l'acquisition d'une empreinte fonctionnelle au niveau des autosomes et du chromosome X (Obata *et al.*, 1998; Tada *et al.*, 2000).

1.3.1.2. Méthyltransférases

Comme nous l'avons déjà mentionné, l'ADN subit de multiples changements de méthylation au cours des diverses étapes du développement. L'établissement et le maintien des profils de méthylation sont donc la conséquence d'un processus dynamique entre des événements de méthylation et de déméthylation de l'ADN (Hsieh, 2000). Ce dynamisme est conféré en partie par l'activité des ADN méthyltransférases (Dnmt). En 1988, Bestor annonce le clonage du gène *Dnmt1*, lequel code pour la première enzyme révélant une activité de méthylation de l'ADN. L'inactivation de *Dnmt1* chez la souris entraîne la perte de l'empreinte génomique. En effet, il a été observé chez la souris que l'allèle normalement inactif pour les gènes *H19*, *Xist*, *p57^{kip2}* et *Snrpn* est exprimé alors

que l'allèle qui exprime habituellement *Igf2*, *Igf2r* et *Kvlqt1* est inactif (Li *et al.*, 1993; Caspary *et al.*, 1998; Sleutels *et al.*, 2000). Dans ce contexte, il nous est possible de constater l'interdépendance qui existe entre *H19* et *Igf2*: respectivement, l'un devient bialléliquement exprimé et l'autre bialléliquement réprimé (Pfeifer, 2000). De plus, les souris *Dnmt1*^{-/-} ne survivent pas après la mi-gestation, ce qui apporte une évidence supplémentaire quant à la nécessité de cette marque épigénétique lors du développement des mammifères. Considérant la préférence de l'enzyme *Dnmt1* pour l'ADN hémiméthylé et son association à la fourche de réplication de l'ADN, nous pouvons penser que sa fonction principale est de s'assurer du maintien de l'empreinte génomique et de reproduire le profil de méthylation dans les cellules filles chez l'embryon et l'adulte (Bestor, 1988).

Dnmt3a et *Dnmt3b* sont des méthyltransférases cruciales pour la méthylation *de novo* chez l'embryon (Okano *et al.*, 1999; Newell-Price *et al.*, 2000). Dans la littérature, il est décrit que l'activité de méthylation *de novo* de *Dnmt3a* et *Dnmt3b* est préservée lorsque des cellules souches sont invalidées pour l'une ou l'autre de ces enzymes tandis qu'aucune méthylation *de novo* n'est présente lors de la double invalidation. Bien que ces observations révèlent une certaine redondance fonctionnelle, ces enzymes possèdent également une fonction spécifique. Ainsi, les souris *Dnmt3a*^{-/-} et *Dnmt3b*^{-/-} ne présentent pas le même phénotype et leur décès ne se manifeste pas au même moment. Toutefois, il est intéressant de constater que la perte fonctionnelle de *Dnmt3a* et *Dnmt3b* n'a démontré aucun effet sur l'empreinte de *H19* et d'*Igf2* (Okano *et al.*, 1999). Chez l'humain, une mutation du gène *DNMT3B* a été mise en évidence dans le Syndrome ICF (*immunodeficiency, centromeric instability and facial anomalies*), mais aucune létalité embryonnaire n'y est associée. De plus, les régions déméthylées observées sont centromériques, ce qui semble conférer à *DNMT3B* un rôle dans l'organisation et la stabilisation d'un type particulier d'hétérochromatine (Hsieh, 2000).

Bien qu'il existe une homologie entre la séquence d'acides aminés du motif méthyltransférase des enzymes *Dnmt3a* et *Dnmt3b* et la séquence du motif de *Dnmt2* (une autre *Dnmt* candidate), aucune activité méthyltransférase n'a été reconnue pour cette dernière jusqu'à maintenant (Hsieh, 2000).

Par contre, nous ne connaissons pas encore laquelle des méthyltransférases est responsable de la méthylation *de novo* dans les cellules germinales. Pour l'instant, les premières hypothèses sont tournées vers *Dnmt1* et ses isoformes puisque ce gène possède un exon spécifique aux ovocytes et un second spécifique aux spermatocytes (Mertineit *et al.*, 1998; Brannan et Bartolomei, 1999; Howell *et al.*, 2001). Une deuxième éventualité, fondée sur l'impossibilité fonctionnelle de *Dnmt1*, *Dnmt3a* et *Dnmt3b* à pouvoir rétablir l'empreinte perdue suite à leur invalidation, indique que le passage dans les cellules germinales est nécessaire pour l'établissement de l'empreinte puisqu'il semble exister des facteurs spécifiques aux lignées germinales qui reconnaissent les régions différentiellement méthylées (DMR) (Reik et Walter, 2001).

D'un autre côté, peu de chose a été clarifié en ce qui concerne l'existence d'enzymes munies d'une activité déméthylase. Les études qui tentent de démontrer leur présence suscitent de nombreuses controverses (Hsieh, 2000). Bhattacharya *et al.* documentent la caractérisation d'une enzyme capable de transformer les cytosines méthylées en cytosines non méthylées (Bhattacharya *et al.*, 1999). Cette enzyme ressemble énormément à MBD2b, une protéine de liaison spécifique à l'ADN méthylé (se référer à la section 1.3.2.1.). Cependant, la reproductibilité de ces expériences n'a pu être vérifiée (Ng *et al.*, 1999). Cet aspect des mécanismes de régulation de l'empreinte génomique requiert donc une plus grande investigation.

1.3.2. Autres facteurs épigénétiques essentiels à la régulation de l'empreinte

1.3.2.1. Protéines de liaison aux CpG méthylés

Intimement liés à la méthylation, différents facteurs épigénétiques interviennent aussi dans la modulation de l'empreinte. Les protéines de liaison aux CpG méthylés (MeCP) reconnaissent préférentiellement les séquences méthylées de l'ADN et peuvent être associées à la répression transcriptionnelle (Newell-Price *et al.*, 2000; Cheung *et al.*, 2000). MeCP2 est l'une de ces protéines. Elle possède un domaine de liaison aux CpG

méthylés (MBD) localisé dans la région N-terminale ainsi qu'un domaine de répression transcriptionnelle (TRD) qui réside dans la région C-terminale. Des études d'immunoprécipitation suite à la cotransfection de MeCP2 et de son TRD ont permis de mettre en évidence l'interaction de MeCP2 avec le corépresseur Sin3A ainsi qu'avec des histones déacétylases (HDAC) (Jones *et al.*, 1998; Nan *et al.*, 1998). De la même manière, MBD2 (une autre MeCP) a la capacité de former un complexe avec des HDAC et des protéines de liaison aux histones. Ainsi, nous pouvons penser que la méthylation différentielle de l'ADN laisse une marque pour les MBD, que celles-ci se lient à l'ADN méthylé et recrutent le complexe HDAC. L'interaction de ces protéines préserve la méthylation et assure le maintien de la répression transcriptionnelle spécifique à l'empreinte (Newell-Price *et al.*, 2000; Cheung *et al.*, 2000).

1.3.2.2. Déacétylation des histones

Une synergie existe entre la méthylation et la déacétylation (Newell-Price *et al.*, 2000). L'évidence la plus concrète est illustrée lorsque la Trichostatin A, un inhibiteur de la déacétylation des histones, et le 5'-aza-2'déoxycytidine, un inhibiteur de la méthylation des cytosines, favorisent la réactivation de l'allèle paternel de *H19* (Pedone *et al.*, 1999; Cheung *et al.*, 2000). En réalité, la répression de cet allèle coïncide avec le fait que sa séquence soit hyperméthylée et riche en histones hypoacétylées. Récemment, Fulmer-Smentek et Francke ont démontré que l'allèle paternel exprimé du gène *Snrpn* (exon 1) était associé à la présence d'histones acétylées (Fulmer-Smentek et Francke, 2001). En d'autres mots, la perte de la méthylation et de la déacétylation entraîne la réactivation des gènes soumis à l'empreinte qui sont normalement inactivés. De plus, les auteurs ont conclu de cette dernière étude que l'acétylation des histones peut être un événement secondaire dans le processus de réactivation d'un gène par la déméthylation des îlots CpG et ce, puisque le traitement au 5'-aza-2'déoxycytidine altère le profil d'expression de *Snrpn* sans pour autant modifier l'association des histones acétylées.

1.3.2.3. Hétérochromatine

Comme plusieurs régulateurs transcriptionnels expriment leur influence par l'entremise de la déacétylation des histones et que celle-ci est en corrélation avec l'activité inactivatrice de l'hétérochromatine, il semble que le remodelage de la chromatine soit impliqué dans la régulation de l'empreinte génomique. D'ailleurs, l'influence du degré d'organisation de la chromatine sur le niveau d'expression des gènes est un concept largement accepté.

D'une part dans les régions où siègent les gènes soumis à l'empreinte, il n'est pas rare de constater entre les génomes maternel et paternel des zones d'hétérochromatisation différentielle. Par l'intermédiaire d'analyses de fractionnement de la chromatine, il a été observé que l'allèle paternel non transcrit de *Igf2r* par exemple était plus compact que l'allèle maternel exprimé (Watanabe *et al.*, 2000). Les gènes environnants non soumis à l'empreinte parentale ne présentent pas cette caractéristique. La possibilité qu'une hétérochromatisation locale entraîne la méthylation d'îlots CpG près de certains DMR a été suggérée (Reik et Walter, 2001).

D'autre part, nous savons que les gènes inactifs ont généralement tendance à se répliquer plus tardivement que les gènes actifs. Étrangement, les allèles parentaux des loci soumis à l'empreinte démontrent fréquemment une réplication asynchrone en phase S du cycle cellulaire (Simon *et al.*, 1999). Les analyses d'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) réalisées par Simon *et al.* ont démontré que cette marque épigénétique est établie dans les gamètes et est maintenue tout au long du développement (Simon *et al.*, 1999). Il se pourrait même qu'elle précède la méthylation. L'hypothèse proposée veut que les divergences propres au temps de réplication de l'ADN résultent en une accessibilité variable de la machinerie nécessaire à la méthylation *de novo* et la maintenance des profils de méthylation. De plus, l'organisation des complexes moléculaires de l'empreinte génomique semble influencer la fréquence de recombinaison méiotique (Preece et Moore, 2000; Reik et Walter, 2001). Par exemple, les domaines IGF2/H19 (BWS) et PWS/AS présentent pour différents loci des taux de recombinaisons maternelles et paternelles plus élevés que les régions non soumises à l'empreinte génomique.

1.3.2.4. ARN non codants et antisens

Plusieurs gènes soumis à l’empreinte codent pour des ARN non traduits. Les premiers à avoir été décrits sont *Xist* (participation à l’inactivation de l’un des chromosomes X chez les femelles)¹ et *H19* (ARN non codant soumis à l’empreinte dont le transcrit n’est pas un antisens). Il a été émis comme hypothèse que ces ARN non traduits interagissent directement (en *cis*) avec des gènes voisins en inhibant leur transcription (Goto et Monk, 1998; Wilkin *et al.*, 2000; Avner et Heard, 2001).

Par la suite, l’existence d’une proportion considérable de gènes soumis à l’empreinte ($\approx 15\%$) et intimement liés à un gène codant pour un ARN «antisens» a été mise en évidence (Tableau II). Dans la majorité des cas, la séquence de ces gènes «sens» et «antisens» se chevauche. Les antisens sont fréquemment retrouvés sous forme d’ARN non codants, lesquels sont généralement soumis à l’empreinte. Le profil d’empreinte de ces ARN antisens peut être identique à celui du gène codant associé (*Znf127-as*) (Jong *et al.*, 1999) ou encore démontrer une réciprocité (*IGF2-AS*, *LIT1*, *Air*, *UBE3A-AS*) (Sleutels *et al.*, 2000).

Les régions promotrices des antisens peuvent aussi contenir des îlots CpG qui sont le plus souvent méthylés sur l’allèle inactif. Cependant, l’importance des antisens au sein des mécanismes de régulation de l’empreinte demeure le sujet d’intenses investigations. Il a été observé que le transcrit de *UBE3A-AS* est détecté dans le cerveau, c’est-à-dire au seul endroit où *UBE3A* est exprimé de manière monoallélique, alors que dans les tissus d’expression biallélique *UBE3A-AS* est absent (Rougeulle *et al.*, 1998). Horike et ses collègues ont démontré que la délétion de la région DMR de *LIT1* entraînait une perte d’empreinte (LOI) du gène *KvLQT1* (Horike *et al.*, 2000; Reik et Walter, 2001). En plus d’occasionner la répression de *KvLQT1*, l’altération de ce DMR modifie l’empreinte de *p57^{KIP2}* (gène localisé près de *KvLQT1*, mais ne chevauchant pas l’antisens *LIT1*)² (Horike *et al.*, 2000). Ainsi, il semble possible que les ARN antisens non codants influencent l’expression des gènes codants soumis à l’empreinte.

¹ Les notions quant au rôle du gène *Xist* seront traitées à la section 3.1.2.1. du chapitre 3.

² La relation étroite existante entre les gènes *KvLQT1*, *LIT1* et *p57^{KIP2}* sera discutée aux sections 2.1.2.2.3.2. et 2.1.2.3. du chapitre 2.

| Transcrit sens | Transcrit antisens (AS) ARN non codant | Références |
|----------------|---|--|
| <i>Igf2</i> | <i>Igf2-AS</i> | Moore <i>et al.</i> , 1997 |
| <i>Igf2r</i> | <i>Air</i> | Reik et Walter, 2001; Wutz <i>et al.</i> , 1997 |
| <i>Xist</i> | <i>Tsix</i> | Lee <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>UBE3A</i> | <i>UBE3A-AS</i> | Sleutels <i>et al.</i> , 2000; Rougeulle <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>ZN127</i> | <i>ZN127-AS</i> | Jong <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>KvLQT1</i> | <i>LIT1</i> | Smilnich <i>et al.</i> , 1999; Mitsuya <i>et al.</i> , 1999 |

Tableau II: Gènes soumis à l’empreinte génomique associés à un transcrit antisens non codant.

L'une des explications suggérées jusqu'ici soutient que l'antisens agit en *cis*, en tant qu'élément régulateur de l'expression monoallélique, de manière à réprimer l'un des allèles (Preece et Moore, 2000; Sleutels *et al.*, 2000). L'antisens pourrait altérer la structure de la chromatine et les profils de méthylation de l'ADN, empêcher l'accessibilité normale au promoteur ou interférer directement avec l'ADN conduisant en quelque sorte à une compétition d'expression entre le gène codant et le gène de l'antisens (Reik et Walter, 2001). Dans le but de mieux comprendre la fonction de *H19*, notre équipe a démontré à l'aide de transfections stables qu'un antisens *H19* exogène augmentait le niveau d'ARNm d'*IGF2* et du peptide IGF-II. De plus, des constructions incluant la partie codante du gène *H19*, placée en amont du promoteur d'*IGF2* et d'un gène rapporteur, ont révélé une activité transcriptionnelle amoindrie du gène rapporteur par rapport aux constructions ne possédant pas *H19*. Ces observations nous ont permis d'émettre l'hypothèse que *H19* ait une influence sur *IGF2* au niveau transcriptionnel (Wilkin *et al.*, 2000).¹

Il est aussi possible que des ARN non codants puissent simplement être le reflet de l'activité d'autres éléments comme des éléments de répression (*silencers*) ou des éléments de frontière.

1.3.2.5. *Éléments de frontière*

Certains facteurs qui confèrent à la chromatine un niveau d'organisation supérieur semblent être impliqués dans la régulation de l'empreinte génomique. Au niveau nucléaire, il est connu que la chromatine forme des boucles dont les extrémités s'attachent, suite à la reconnaissance d'un motif particulier, à la matrice nucléaire via un complexe protéique, lequel se lierait sur une région de la chromatine nommée élément de frontière (Burns *et al.*, 2001). Ces structures que nous désignons MARs ou LARs entraînent une organisation en domaines de la chromatine et permettent la régulation de l'expression de plusieurs gènes d'une région.

¹ Il a aussi été noté que l'ARN de *H19* peut être associé à des polysomes (Li, Y.M. *et al.*, 1998) et, plus récemment, qu'il contient des sites d'attachement pour la protéine oncofœtale *IGF-II mRNA-binding protein* (IMP) (Runge *et al.*, 2000): ceci implique que *H19* puisse également assurer une fonction dans des événements post-transcriptionnels.

En plus d'être impliqué dans la méthylation différentielle et l'inhibition d'expression, il a été proposé que les centres de contrôle (IC) assurent la fonction d'éléments de frontière. Les gènes *H19* et *IGF2*, par exemple, ont une empreinte réciproque et compétitionnent pour les mêmes éléments amplificateurs de la transcription (*enhancers*) situé en 3' de *H19*. De plus, nous savons que l'élément de frontière en 5' de *H19* (BWSIC1) possède une sensibilité accrue à la nucléase pour l'allèle maternel seulement, témoignant d'une conformation d'ADN favorisant la transcription. Il a été suggéré que l'attachement de cet élément de frontière à la matrice nucléaire permette, sur l'allèle maternel spécifiquement, l'accessibilité des éléments amplificateur de la transcription au promoteur de *H19*. La présence de méthylation au niveau de l'élément de frontière sur l'allèle paternel empêcherait la formation de MARs et permettrait plutôt l'accès du complexe transcriptionnel au promoteur d'*IGF2*.

En plus d'une séquence bien définie, il semble nécessaire qu'une (ou plusieurs) protéine(s) adaptatrice(s) interagisse(nt) pour former des MARs. Des études récentes ont identifié une protéine, CTCF, sensible à la méthylation et capable de se lier à la région hypersensible à la nucléase présente au IC de *H19* (Bell et Felsenfeld, 2000; Hark *et al.*, 2000): protéine déjà connue pour son interaction au niveau de la frontière du locus de la β -globine (Burns *et al.*, 2001).

L'idée actuelle veut que ces éléments de frontière, via la modification de la configuration de la chromatine, séparent les éléments d'amplification de la transcription, (lorsqu'ils siègent entre ces derniers et des promoteurs) de leurs gènes cibles et bloquent le complexe transcriptionnel.

1.4. ANALYSE ÉVOLUTIVE

La distribution phylogénique de l'empreinte génomique semble se restreindre aux plantes angiospermes, à quelques espèces d'insectes, aux marsupiaux (l'empreinte d'*Igf2* et de *Igf2r* a récemment été confirmée chez l'opossum de l'Amérique du Sud) et principalement aux mammifères euthériens (i.e., placentaires) (De Groot et Hochberg, 1993; John et Surani, 2000). Mentionnons seulement que les effets de l'empreinte n'ont

pas été démontrés chez les amphibiens, les reptiles, les oiseaux, les levures, *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans* et *Zebrafish* (Reik et Walter, 1998; John et Surani, 2000; Jirtle *et al.*, 2000).

Des notions soutiennent que les euthériens et les marsupiaux dérivent des monotrèmes (e.g., les ornithorynques): une lignée de mammifères primitifs. Cependant, aucune trace d'empreinte n'a été observée chez ces derniers (John et Surani, 2000; Killian *et al.*, 2000). En fait, les monotrèmes diffèrent des euthériens et des marsupiaux en ce sens qu'ils possèdent des ovocytes riches en vitellus. Le clivage est de type méroblastique et le développement s'effectue *in ovo*. Les ovocytes des euthériens et des marsupiaux se ressemblent beaucoup. Ils ne contiennent pas ou très peu de vitellus, leur clivage est holoblastique et leurs blastocytes contiennent des cellules épiblastiques ainsi que trophoblastiques. Comme le développement des embryons se fait complètement *in utero*, via une organisation placentaire, l'apport nutritionnel à ceux-ci est régularisé par la mère (John et Surani, 2000). Ainsi, un défaut dans le mécanisme est inévitablement dommageable pour l'embryon, la portée et la mère. Par ailleurs, il est plausible que l'empreinte se soit développée au moment de la placentation ou encore, lorsqu'apparaît un conflit entre les génomes parentaux (Hall, 1990; Jirtle *et al.*, 2000).

1.5. INTÉRÊTS ÉVOLUTIFS

Étant donné la conservation évolutive marquée entre les génomes murin et humain, il existe certes des avantages quant à l'avènement de l'empreinte génomique chez les mammifères. Pourtant, ces avantages ne sont toujours pas bien définis. À ce jour, plus de 14 hypothèses ont été proposées pour tenter de les clarifier (Hurst et McVean, 1998). Les articles de revue écrits par Hall J., Tycko B. et Preece M. *et al.* donnent un bon aperçu de l'ensemble des hypothèses (Hall, 1990; Tycko, 1994; Preece et Moore, 2000). Les hypothèses les plus souvent commentées sont énoncées dans ce travail.

1.5.1. Théorie du conflit parental

Cette théorie émise par Moore et Haig est sans doute la plus admise (Viville, 1999; Falls *et al.*, 1999; Tilghman, 1999; Preece et Moore, 2000). Selon eux, l’empreinte se serait développée chez les mammifères polyandres (ayant divers géniteurs) sur les bases des divergences d’intérêts reproductifs entre la femelle et le mâle. Comme le père se reproduit de manière à assurer la dissémination de son patrimoine génétique, celui-ci s’attend à ce que sa progéniture soit la plus vigoureuse possible et qu’elle reçoive le maximum de ressources provenant de la mère lors de son développement fœtal. De son côté, la mère doit répartir ses ressources entre sa progéniture et elle-même. Elle doit distribuer ses ressources de manière à favoriser une croissance fœtale adéquate sans toutefois mettre sa propre vie en péril en vue de grossesses ultérieures. Le modèle laisse entendre que les gènes exprimés paternellement promeuvent la croissance alors que les gènes exprimés maternellement freinent la croissance (Hurst et McVean, 1998; Tilghman, 1999).

Le gène d’expression paternelle *Igf2* ainsi que les gènes d’expression maternelle *H19* (code pour un ARN non traduit), *Igf2r* et *Grb10* (code pour une protéine cytoplasmique) appuient cette théorie (Falls *et al.*, 1999). Rappelons que l’inactivation d’*Igf2* conduit à un développement fœtal restreint. Inversement, l’inactivation de *H19*, gène connu comme suppresseur tumoral, entraîne l’expression biallélique d’*Igf2*, laquelle causera une surcroissance fœtale (Leighton *et al.*, 1995; Morison et Reeve, 1998b). Les gènes *Igf2r* et *Grb10* codent pour des protéines interagissant dans le signal prolifératif d’*Igf2*. Nous avons déjà mentionné que *Igf2r* contrôle les niveaux d’*Igf2* en le dégradant. Quant à *Grb10*, il code pour une protéine capable d’inhiber la transmission du signal d’*Igf2* passant par le récepteur d’*Igf1* (*Igf1r*). Soulignons simplement que les effets d’*Igf2* se manifestent principalement via *Igf1r* (Viville, 1999). Ainsi, ces exemples illustrent que l’expression paternelle d’un seul gène peut être contrôlée à plusieurs niveaux par l’action spécifique de gènes maternellement exprimés.

Par ailleurs, en admettant l’idée du conflit parental, la manifestation du phénomène d’empreinte génomique devrait être le reflet des comportements sexuels d’une espèce (Jirtle *et al.*, 2000). Une prédiction a été avancée affirmant que ce type de

régulation génique ne devrait pas être présent chez les espèces monogames étant donné les intérêts partagés des parents pour leur progéniture. Cet aspect a été étudié chez deux espèces de rongeurs: *Peromyscus polionotus* (espèce monogame) et *Peromyscus maniculatus* (espèce polygame). Bien que les profils d’empreinte de ces deux espèces soient conformes à ceux mentionnés précédemment pour *Igf2*, *Igf2r* et *H19*, les hybrides, quant à eux, semblent être incapables de mettre en place des mécanismes d’empreinte fonctionnels (e.g., les gènes *H19* et *Igf2r* ne présentent pas leur profil d’empreinte normal). L’hypothèse de départ n’est donc pas substantielle. Ces observations suggèrent plutôt l’absence d’une reconnaissance réciproque des signaux de l’empreinte d’une espèce à l’autre. Elles soutiennent un rôle de l’empreinte dans la phylogénie (Jirtle *et al.*, 2000).

1.5.2. Maintien de la reproduction sexuée

Une seconde hypothèse suggère que l’empreinte soit apparue de manière à prévenir la parthénogenèse (Solter, 1988). Ce mode de reproduction est inexistant chez les mammifères. Les différences fonctionnelles existant entre le matériel génétique maternel et paternel pourraient jouer un rôle majeur afin de préserver les dimorphismes sexuels et maintenir la reproduction sexuée (Hall, 1990). Jusqu’à maintenant, les caractéristiques de l’empreinte n’ont pas été rapportées chez des espèces parthénogénètes (e.g., oiseaux).

1.5.3. Défense de l’organisme

Dans une autre perspective, l’empreinte découlerait d’un mécanisme de défense provenant des procaryotes (Barlow, 1993; Preece et Moore, 2000). L’activité des endonucléases bactériennes permet à l’hôte de se protéger contre des séquences d’ADN étrangères. Afin de ne pas mettre en péril l’ADN propre à l’hôte, des groupes méthyles sont transférés par des ADN méthyltransférases de manière à prévenir les attaques des

endonucléases. Il est probable que chez les mammifères, cette méthylation prévient l'expression de séquences parasites, comme par exemple des éléments transposables et des ADN proviraux. Pour soutenir cette affirmation, Jaenisch *et al.* ont démontré que l'inhibition des ADN méthyltransférases était impliquée dans l'activation de rétrovirus (Jaenisch *et al.*, 1985; Falls *et al.*, 1999).

1.5.4. Hypothèses diverses

Plusieurs autres hypothèses peuvent également être considérées. Énumérées ici par ordre chronologique de publication, nous pouvons considérer l'hypothèse:

- se rapportant au contrôle et à la flexibilité des gènes pendant la croissance et le développement. L'utilisation d'une seule copie du gène permet de garder en réserve une copie pouvant être utilisée dans les cas critiques de croissance rapide (Hall, 1990);
- attribuant à l'empreinte un rôle dans la défense immunologique. Jusqu'ici aucune évidence expérimentale n'appuie cette théorie (Hall, 1990);
- suggérant que l'empreinte soit le reflet d'un processus de modification dominante pouvant avoir été essentiel dans les mécanismes de contrôle pour le développement embryonnaire et la différenciation tissulaire (Hall, 1990);
- désignant l'empreinte comme phénomène contribuant au maintien de la diploïdie lors de la division cellulaire (Tycko, 1994);
- soutenant que l'empreinte soit un mécanisme de protection des femelles mammifères contre les maladies malignes trophoblastiques (Preece et Moore, 2000).

Jusqu'ici, la théorie du conflit parental demeure sans doute la plus plausible. Bien que ces dernières affirmations sont plus spéculatives, elles méritent d'être gardées en mémoire.

1.6. CONSÉQUENCES CLINIQUES

Les mécanismes de l’empreinte génomique contrôlent l’expression des gènes suivant une spécificité tissulaire et selon diverses périodes de développement. L’interruption de l’un des mécanismes régissant cette forme de régulation transcriptionnelle entraîne inévitablement des désordres humains (Deal, 1995; Yu *et al.*, 1999; Falls *et al.*, 1999; Bishop *et al.*, 2000).

L’altération de l’empreinte peut conduire à l’oncogenèse lorsque la seule copie d’un gène inhibiteur de la croissance (gènes souvent exprimés maternellement) n’est pas transcrite. En effet, dans diverses tumeurs embryonnaires (e.g., tumeurs de Wilms, rhabdomyosarcomes) la perte d’hétérozygotie (LOH) maternelle pour 11p15.5 est observée, ce qui signifie que l’allèle maternel est perdu résultant en une contribution paternelle unique. De plus, dans le cas de gènes promoteurs de croissance (souvent exprimés paternellement), la perte de l’empreinte ou relaxation de l’empreinte (LOI) (i.e., expression biallélique d’un gène soumis à l’empreinte) peut conduire au double dosage du produit du gène et à une surcroissance. L’isodisomie paternelle (UPD) observée dans le Syndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS) est un exemple bien connu. Mis à part les phénomènes de LOH et d’UPD, une empreinte défectueuse causée, par exemple, par des épimutations, lesquelles entraînent une LOI, peut suffire à causer des désordres pédiatriques tels que le Syndrome de Prader Willi (PWS) et le Syndrome d’Angelman (AS). Il a également été démontré que des loci imprimés défectueux peuvent être impliqués dans l’oncogenèse adulte (tumeurs mammaires, tumeurs ovariennes, tumeurs colorectales, médulloblastome) ainsi que dans des désordres neurologiques et comportementaux (Yu *et al.*, 1999; Bishop *et al.*, 2000).

L’intérêt principal de mes travaux de maîtrise consiste à mieux comprendre le rôle que peut tenir l’empreinte génomique dans deux pathologies humaines: le Syndrome de Beckwith-Wiedemann et le Syndrome de Turner.

Le second chapitre porte sur l’étude d’une paire de jumelles monozygotiques discordantes pour le BWS. Mes travaux s’attardent au locus 11p15.5, région chromosomique associée à cette condition et siège de plusieurs gènes bien caractérisés et

soumis à l’empreinte. Le but de l’étude visait à déterminer la présence d’une discordance du profil de méthylation au centre de contrôle de l’empreinte BWSIC1 entre la patiente atteinte et sa jumelle non atteinte.

Le troisième chapitre décrit mon travail expérimental effectué sur une cohorte de patientes atteintes du Syndrome de Turner: une autre pathologie impliquant possiblement l’empreinte parentale au niveau d’un(des) locus(ci) sur le chromosome X. Bien que ce projet soit présentement en cours, ma contribution au fil de cette maîtrise s’est concentrée sur la mise au point technique et ce, afin de pouvoir assigner l’origine parentale du chromosome X intact. Cette étude nous permettra de mieux comprendre la relation entre certains traits phénotypiques spécifiques au TS et l’origine parentale du chromosome X.

CHAPITRE 2

EMPREINTE GÉNOMIQUE DANS LE CONTEXTE DE JUMELLES MONOZYGOTIQUES DISCORDANTES POUR LE SYNDROME DE BECKWITH-WIEDEMANN

2.1. REVUE DE LA LITTÉRATURE

À ce jour, l'étiologie du Syndrome de Beckwith-Wiedemann n'est pas complètement élucidée. Des résultats expérimentaux démontrent toutefois que la pénétrance des traits phénotypiques est spécifique à l'origine parentale de l'allèle hérité, désignant ainsi l'empreinte génomique comme mode de transmission héréditaire impliqué dans ce désordre génétique. L'investigation moléculaire du BWS est cruciale pour la compréhension des mécanismes de l'empreinte génomique ainsi que pour l'amélioration du diagnostic et du suivi clinique de ce syndrome.

2.1.1. *Caractérisation clinique du BWS*

Depuis les premières descriptions cliniques d'individus atteints du BWS en 1963-1964 par Beckwith et Wiedemann, de nombreux cas ont été rapportés (Wiedemann, 1964; Beckwith, 1969; Elias *et al.*, 1998). L'incidence du BWS est estimée à 1:13 700 naissances. Celles-ci suivent une distribution équivalente en ce qui concerne le sexe des individus affectés (Cohen, 2000). Ce syndrome consiste en une surcroissance prénatale et postnatale associée à une importante variété d'anomalies congénitales. Les défauts de la paroi abdominale antérieure: hernie ombilicale ou exomphalocèle dans les cas plus sévères (80% des cas), la macroglossie (97% des cas) et la macrosomie (88% des cas) sont les trois particularités fondamentales présentes à la naissance (Elliott *et al.*, 1994; Elias *et al.*, 1998; OMIM #130650). Parmi les troubles fréquemment rencontrés, notons également des anomalies de croissance: une viscéromégalie (foie, rate, rein, pancréas et cœur (occasionnellement)), une hémihypertrophie (surcroissance unilatérale du corps), une cytomégalie surrénalienne et une hyperplasie des cellules β des îlots de Langerhans, causant une hypoglycémie néonatale secondaire à une hyperinsulinémie transitoire ou prolongée (50% des cas) (Elias *et al.*, 1998; Cohen, 2000; Sperling, 2000; Munns et Batch, 2001).

Il existe aussi des traits craniofaciaux classiques chez ces sujets. Il n'est pas rare d'observer un nævus flammeus facial, des rides auriculaires (signe distinctif), un occiput proéminent, une hypoplasie des maxillaires ainsi qu'une ensellure nasale large et aplatie.

D'autres malformations peuvent également être retrouvées à des fréquences diverses telles des anomalies génito-urinaires, cardiaques et gastrointestinales ainsi que de la polydactylie, une fente palatine et des mamelons supernuméraires (Elias *et al.*, 1998).

Les patients souffrant du BWS sont exposés à 5-10% de risque de développer des tumeurs embryonnaires (Falls *et al.*, 1999). Le risque semble légèrement plus élevé (12.5%) lorsque l'enfant présente une hémihypertrophie (Wiedemann, 1983; Weksberg et Squire, 1996). L'âge constitue un autre paramètre faisant varier le risque de développement tumoral. La majorité des cancers se révéleront avant l'âge de 5 ans et apparemment tous, avant l'âge de 10 ans (Elias *et al.*, 1998). Le type de cancer le plus fréquent se manifeste sous forme de tumeurs de Wilms, lesquelles sont des tumeurs rénales (néphroblastomes) (50-60% des cas) (Lalande, 1997). L'incidence de ces derniers est de mille fois plus élevée chez les patients atteints du BWS que chez les sujets sains (Feinberg, 1998; Falls *et al.*, 1999). De plus, diverses tumeurs malignes incluant des hépatoblastomes, des carcinomes surrenaliens (15% des cas), des rhabdomyosarcomes, des neuroblastomes et des glioblastomes (plus rares) sont aussi caractéristiques du BWS (Weksberg et Squire, 1996; Lalande, 1997; Elias *et al.*, 1998).

Il est maintenant possible d'établir un diagnostic prénatal. Ainsi, la détection d'un placenta élargi, d'un polyhydramnios, d'un long cordon ombilical et d'une croissance fœtale excessive sont tous des indices pouvant éveiller des soupçons quant à la présence d'un BWS lors d'une grossesse (Weng *et al.*, 1995; Elias *et al.*, 1998; Weksberg et Shuman, 2000; OMIM #130650).

Normalement, les complications associées à cette condition surviennent à la naissance ou très tôt dans l'enfance. Il semble qu'elles s'atténuent à l'adolescence et à l'âge adulte. Par exemple, la vélocité de croissance se situe au-dessus du quatre-vingt dixième centile avant l'âge de 4 à 6 ans alors que par la suite, elle diminue considérablement et redevient normale (Elias *et al.*, 1998). Bien qu'habituellement le développement de ces enfants s'effectue convenablement, ils peuvent parfois être atteints de retards psychomoteurs et mentaux. Ces retards peuvent être secondaires à un traitement insuffisant de l'hypoglycémie néonatale ou encore à leurs lourds antécédents médicaux (macroglossie: difficultés respiratoires et alimentaires; omphalocèle: chirurgies répétitives) (Elliott et Maher, 1994). Martinez *et al.* rapportent 6 cas de retard

mental sur 39 cas de BWS, dont un causé par une hypoglycémie néonatale (OMIM #130650; Martinez *et al.*, 1992). En ce qui concerne le taux de mortalité associé au BWS, il se situe approximativement entre 10-20% (Elliott et Maher, 1994; Weksberg et Shuman, 2000). Ces nombreux décès sont aussi la conséquence de multiples complications présentes dès la naissance telles l'omphalocèle et la macroglossie, laquelle empêche souvent une alimentation adéquate. L'hypoglycémie néonatale et la tumorigenèse sont aussi des facteurs contribuant à la mortalité et la morbidité qui sont importants à considérer (Weksberg et Shuman, 2000).

2.1.2. *Génétique du BWS*

2.1.2.1. *Mode de transmission*

La variabilité phénotypique qui existe dans la population du BWS est en accord avec l'hétérogénéité génétique observée. Les profils de transmission du syndrome sont complexes. Les patients peuvent être répartis en 3 sous-groupes principaux à travers lesquels de nombreux indices rendent perceptibles les effets de l'empreinte génomique dans la pathogenèse de ce syndrome (Tableau III) (Maher et Reik, 2000; Weksberg et Shuman, 2000). Dans la majorité des cas (85%), la transmission des caractères se présente de manière sporadique. Parmi ces derniers, il est possible d'observer un phénomène d'UPD pour le chromosome 11p d'origine paternelle (Henry *et al.*, 1991). De plus, le BWS peut être transmis de manière autosomale dominante avec une expressivité variable et une pénétrance incomplète dans 10-15% des cas. Une étude effectuée par Moutou *et al.* a révélé que la pénétrance du phénotype chez ces patients est toujours plus élevée lorsque le chromosome déficient est transmis par la mère (Moutou *et al.*, 1992). Deux raisons ont été proposées. D'abord, il semble que la fécondité des hommes atteints soit réduite comparée à celle des femmes atteintes et ce, suivant un ratio de 1:4.6. Les chercheurs soutiennent également que le risque d'être affecté est de 1:3 lorsque le sujet hérite du défaut par son père (Moutou *et al.*, 1992) alors qu'il est supérieur à 50% lorsque l'anomalie est transmise maternellement (Weksberg et Shuman,

2000); ceci apportant une évidence concrète appuyant le rôle de l’empreinte génomique dans l’étiologie du BWS. Finalement, il est rare, dans la population BWS, d’observer des patients porteurs d’anomalies caryotypiques. En fait, nous les retrouvons dans < 2% des cas, incluant les patients possédant un profil sporadique et familial. Dans cette situation, il est possible que les analyses cytogénétiques révèlent la présence d’une duplication (différente de l’UPD) d’origine paternelle ou encore la présence de réarrangements balancés d’origine maternelle tels une translocation ou une inversion de la région 11p15.5 (Mannens *et al.*, 1994).

2.1.2.2. Organisation moléculaire du chromosome 11p15.5

En 1989, par l’intermédiaire d’analyses de liaison effectuées chez des patients BWS présentant un pedigree autosomal dominant ainsi que par la détection d’anomalies chromosomiques en 11p15.5 chez des patients sporadiques, le BWS a pu être génétiquement cartographié sur le chromosome 11 et plus spécifiquement dans la région p15.5 (Ping *et al.*, 1989; Koufos *et al.*, 1989). Cette association chromosomique est soutenue l’année suivante par Weksberg *et al.* lorsqu’une duplication en 11p15.5 comprenant le gène *IGF2* est mise en évidence dans une sous-population de patients BWS (Weksberg *et al.*, 1990). La région 11p15.5 est bien connue pour contenir des gènes soumis à l’empreinte parentale puisque des LOH impliquant l’allèle d’origine maternelle ont souvent été décrites dans des tumeurs de Wilms, dans plusieurs autres tumeurs embryonnaires ainsi que dans des cancers trouvés chez l’adulte (Mannens *et al.*, 1994). Ce locus couvre une région approximative de 1 Mb dont l’organisation moléculaire est caractérisée par la présence d’éléments régulateurs particuliers (Engemann *et al.*, 2000). Jusqu’à maintenant, presque tous les gènes identifiés sont soumis à l’empreinte génomique comptant parmi eux un nombre plus important de gènes d’expression maternelle que paternelle (Fig. 4) (Maher et Reik, 2000; Reik et Walter, 2001). Toutefois, quelques gènes d’expression biparentale semblent diviser le locus en deux sous-domaines où l’expression génique est sous le contrôle des mécanismes de l’empreinte (Lee *et al.*, 1999). À la lumière des observations cliniques et moléculaires, le BWS est désigné comme étant un syndrome multigénique causé par des

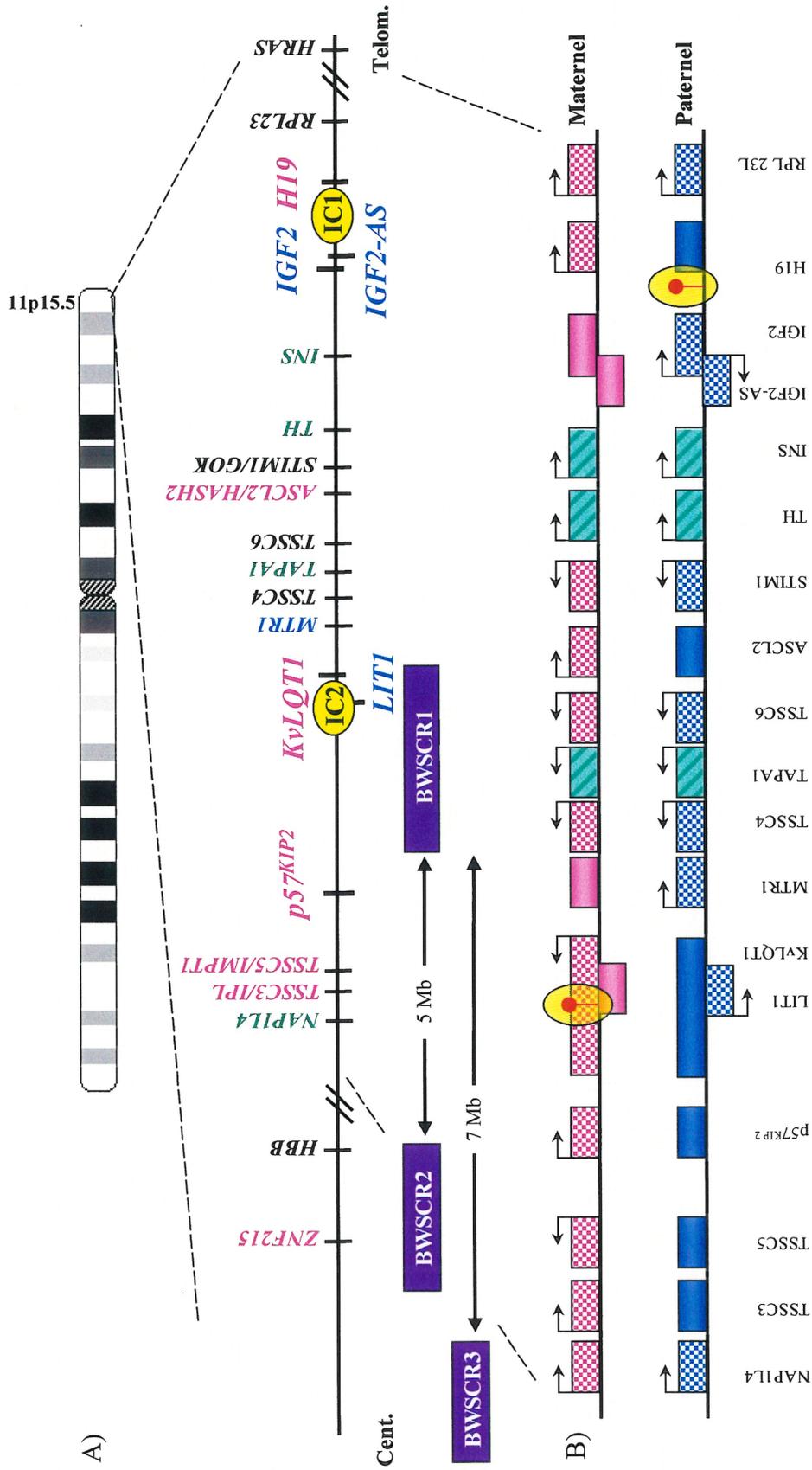


Figure 4: Organisation moléculaire du chromosome 11p15.5. A) Rose, Bleu, Noir: Gènes d'expression maternelle, paternelle et biallélique respectivement. Vert: Gènes dont le statut d'expression n'est pas défini. ICI/2: Centres de contrôle de l'empreinte (régions riches en îlots CpG). BWSCR1/2/3: Régions associées aux réarrangements chromosomiques transmis maternellement. B) Profils transcriptionnels. \blacktriangle : Orientation de la transcription. hatched box / pink box / blue box : Transcription; Absence de transcription; Statut d'expression non-défini. \bullet : Région différentiellement méthylée. (Reik et Walter, 2001; Prawitt *et al.*, 2000; Manji *et al.*, 2000)

altérations de gènes régulateurs de croissance situés dans cette région. À l'heure actuelle, *IGF2*, *H19*, *p57^{KIP2}*, *KvLQTI* et *LIT1* sont les gènes les mieux étudiés. Ils sont reconnus pour assurer une fonction de stimulateur ou encore d'inhibiteur de croissance.

2.1.2.2.1. Gènes candidats

2.1.2.2.1.1. *IGF2*

Le gène *IGF2* code pour un facteur de croissance et de différenciation cellulaire ayant un rôle important dans le développement fœtal et postnatal normal ainsi que dans la tumorigenèse (Stewart et Rotwein, 1996). La structure du gène est complexe et son expression est régulée à plusieurs niveaux (transcription, traduction, maturation de l'ARNm) en plus d'être sous l'influence de facteurs épigénétiques. L'unité transcriptionnelle d'*IGF2* comprend 10 exons, 2 sites de polyadénylation ainsi que 4 promoteurs distincts (P1, P2, P3 et P4), lesquels donnent naissance à 6 transcrits de taille variable issus d'épissages alternatifs (Rotwein, 1999). L'activité transcriptionnelle respective des promoteurs dépend de l'origine tissulaire et du stade développemental (Holthuizen *et al.*, 1999). P1 contrôle l'expression biallélique d'*IGF2* tandis que P2, P3 et P4 contrôlent son expression monoallélique paternelle (Vu et Hoffman, 1994). Au cours de la vie fœtale, *IGF2* est exprimé aux dépens de l'allèle paternel dans l'ensemble des tissus embryonnaires à l'exception du plexus choroïde et des leptoméniges. Après la naissance les profils d'expression changent. Bien que l'empreinte persiste dans le cœur, le cerveau (excluant le plexus choroïde et les leptoméniges), les reins, les muscles, la peau et les organes reproducteurs, l'*IGF2* circulant provient majoritairement du foie adulte où l'expression est biallélique.

L'impact d'une expression biallélique d'*IGF2* (relaxation de l'empreinte) a été intensivement étudié dans de multiples tumeurs embryonnaires par exemple, les rhabdomyosarcomes et les hépatoblastomes. Il se trouve également que la production d'ARNm est augmentée dans les tumeurs de Wilms, type tumoral souvent rencontré dans le BWS, comparativement au tissu rénal adjacent (Reeve *et al.*, 1985). Il a également été démontré que l'ARNm d'*IGF2* et le peptide (IGF-II) n'étaient augmentés

que dans la demi-langue hypertrophiée d'un patient BWS et, que les tissus exprimant les taux les plus élevés d'*IGF2* pendant la vie intra-utérine correspondent aux sites d'organomégalie retrouvés dans ce syndrome (Hedborg *et al.*, 1994). Ces observations sont en faveur d'une fonction pour *IGF2* en tant que facteur de croissance embryonnaire (Ogawa *et al.*, 1993). Les indications d'un rôle d'*IGF2* dans le BWS ont été présentées par Sun *et al.* (Sun *et al.*, 1997). Ils ont démontré, au moyen de cellules embryonnaires souches, que l'introduction d'un transgène *Igf2* chez la souris entraînait une surexpression d'*Igf2*, résultant en l'apparition de plusieurs symptômes associés au BWS tels une croissance prénatale excessive, un polyhydramnios, une macroglossie, une incidence de létalité fœtale et néonatale ainsi que des anomalies squelettiques. Cependant, aucun omphalocèle ni prédisposition tumorale n'ont été mis en évidence.

2.1.2.2.1.2. *H19*

Le gène *H19* est localisé 110 à 200 kb télomérique d'*IGF2* et code pour un ARNm biologiquement fonctionnel, mais non traduit (Brannan *et al.*, 1990; Zemel *et al.*, 1992; Hurst et Smith, 1999). L'empreinte parentale de *H19* (i.e., expression maternelle) est réciproque à celle d'*IGF2*. À la base de plusieurs résultats expérimentaux, il a été démontré qu'il existe une régulation coordonnée entre ces derniers. En effet, *H19* possède des patrons d'expression similaires à *IGF2*. Nous retrouvons son transcrite dans divers tissus embryonnaires et fœtaux à l'exception particulière du plexus choroïde et des leptoméninges: tissus dans lesquels *IGF2* est bialléliquement exprimé (Ohlsson *et al.*, 1994). Une croissance somatique excessive analogue à celle retrouvée dans le BWS a été décrite chez des souris invalidées pour *H19*. Cette croissance anormale résulte en réalité d'une surexpression d'*Igf2* (Leighton *et al.*, 1995). La méthylation allélique différentielle du gène *H19* est reconnue pour être nécessaire à la régulation de son expression. L'invalidation du gène de la DNA méthyltransférase chez la souris a permis de démontrer que l'altération de la méthylation au niveau de *H19* coïncide avec son expression biallélique ainsi qu'en l'absence du peptide IGF-II (Li *et al.*, 1992). Par ailleurs, un rôle de suppresseur tumoral a été assigné à l'ARNm de *H19* suite à des études *in vitro* (Hao *et al.*, 1993; Wilkin *et al.*, 2000). Dans des tumeurs de Wilms, une

méthylation anormale de la copie maternelle entraîne la relaxation de l’empreinte de *H19*, soit la répression de ce dernier (Moulton *et al.*, 1994).

2.1.2.2.1.3. $p57^{KIP2}$

$p57^{KIP2}$ code pour un puissant inhibiteur de plusieurs complexes cyclines dépendantes des kinases (CDK), lesquelles sont les régulateurs principaux du cycle cellulaire (Matsuoka *et al.*, 1995). Cette protéine intervient en phase G1 du cycle cellulaire et favorise l’arrêt de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Par cette capacité à contrôler négativement la prolifération cellulaire en plus de sa localisation chromosomique en 11p15.5, $p57^{KIP2}$ est considéré comme un gène candidat de suppression tumorale (Harper et Elledge, 1996). Chez l’humain, $p57^{KIP2}$ est également sujet à l’empreinte génomique (Matsuoka *et al.*, 1996). L’expression est préférentiellement, mais pas exclusivement, assurée par l’allèle maternel. L’allèle paternel est exprimé à de faibles niveaux dans de multiples tissus ainsi qu’à des niveaux comparables à l’allèle maternel dans le cerveau fœtal et dans quelques tumeurs embryonnaires (Matsuoka *et al.*, 1996). Étonnamment, le traitement des fibroblastes à l’IGF-II induit une diminution de l’expression de $p57^{KIP2}$ de manière dépendante de la dose, ce qui suggère que l’expression réduite de $p57^{KIP2}$ pourrait être l’une des causes induisant le phénotype associé au BWS (Grandjean *et al.*, 2000).

Les résultats d’investigations entreprises chez des patients BWS sporadiques (5-10%) et familiaux (30-50%) ont permis d’identifier des mutations germinales dans $p57^{KIP2}$ (Hatada *et al.*, 1996; Hatada *et al.*, 1997; O’Keefe *et al.*, 1997; Lam *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2001). D’ailleurs, $p57^{KIP2}$ est le seul gène jusqu’à maintenant à être retrouvé comme cible de mutations fonctionnelles dans ce syndrome. Étant donné l’existence d’une grande homologie entre le locus 11p15.5 humain et le chromosome 7 murin, les études d’inactivation de $p57^{Kip2}$ chez la souris renforcent l’association de ce dernier dans la pathogenèse du BWS. La prolifération et la différenciation cellulaire sont altérées chez ces souris. Ceci entraîne le développement de défauts du muscle abdominal (omphalocèle), d’une fente palatine, d’une dysplasie médullaire rénale, d’une cytomégalie ainsi que d’une hyperplasie du cortex surrénalien (Zhang *et al.*, 1997).

Récemment, le rôle de $p57^{kip2}$ dans le développement a été approfondi lors d'analyses immunohistochimiques de son expression spatiale et temporelle au cours de l'embryogenèse chez la souris (Nagahama *et al.*, 2001). $p57^{kip2}$ s'avère être essentiel au niveau du cerveau, des yeux, des ganglions, des poumons, du cœur, du foie, de la peau, des reins, des intestins, du pancréas, du palais, du cartilage et des muscles squelettiques. Plusieurs de ces tissus sont atteints dans le BWS. Ainsi, il est d'une importance capitale de comprendre l'étroite relation qui existe entre la régulation du cycle cellulaire et le contrôle du développement et ce, afin de savoir de quelle manière la perturbation de ces mécanismes laisse place à la carcinogenèse retrouvée à une fréquence élevée dans la population BWS.

2.1.2.2.1.4. KvLQT1 et LIT1

Le gène *KvLQT1* est bien caractérisé pour son implication dans des troubles d'arythmie cardiaque tels que rencontrés dans le syndrome de l'intervalle QT prolongé (*Long QT Syndrome*), maladie non soumise à l'empreinte (OMIM # 192500). Toutefois, *KvLQT1* est également impliqué dans le BWS. Lee *et al.* ont démontré que la séquence du gène est interrompue à plusieurs des sites de remaniements chromosomiques germinaux décrits chez des patients BWS ainsi qu'à l'endroit d'une translocation balancée dans des tumeurs rhabdoïdes embryonnaires (Lee *et al.*, 1997b). Ce gène de 19 exons couvre une région de plus de 400 kb centromérique d'*IGF2* (Neyroud *et al.*, 1999). Il code pour un canal potassique dépendant du voltage, lequel se présente, à l'exemple d'*IGF2*, sous plusieurs isoformes dont l'expression spécifique témoigne d'une spécificité tissulaire. Parmi les 4 isoformes de *KvLQT1*, deux ne sont pas traduits. Bien que l'isoforme 2 soit exprimée exclusivement dans le tissu cardiaque fœtal en plus de posséder une expression biallélique, *KvLQT1* est généralement soumis à l'empreinte génomique dans l'embryon alors que l'allèle maternel est préférentiellement exprimé (Lee *et al.*, 1997b). Cependant, les mécanismes par lesquels les aberrations d'expression d'un canal potassique peuvent entraîner des anomalies de la croissance aussi sévères que celles caractérisant le BWS demeurent indéterminés.

Par ailleurs, l'utilisation d'un chromosome 11 paternel ou maternel dans un système d'hybrides monochromosomiques mis au point par Mitsuya *et al.* a permis d'identifier, à l'intérieur du domaine de *KvLQTI*, le transcrit antisens *LIT1* (Mitsuya *et al.*, 1999). *LIT1*, mis pour «*long QT intronic transcript-1*», est un nouvel ARN normalement exprimé par l'allèle paternel dans une diversité tissulaire, lequel coïncide avec la copie réprimée de *KvLQTI* (Lee *et al.*, 1999b). Dans une proportion approximative de 50%, Lee *et al.* ont aussi remarqué qu'une LOI de *LIT1* affectait les patients atteints du BWS (Lee *et al.*, 1999b). La modification du profil d'empreinte de *LIT1*, résultant en son expression biallélique, semble grandement contribuer à la pathogenèse du BWS, mais aucunement au développement de tumeurs de Wilms (Mitsuya *et al.*, 1999). Jusqu'à maintenant, aucune fonction spécifique n'est attribuée à cet antisens.

Conjointement, la description fréquente des LOI pour *LIT1* et l'interruption de *KvLQTI* dans la sous-population de patients présentant des réarrangements chromosomiques laissent supposer qu'un élément régulateur de l'empreinte (e.g., une région différentiellement méthylée agissant comme centre de contrôle de l'empreinte) soit présent dans cette région (Smilnich *et al.*, 1999).¹

De plus, la découverte et la caractérisation fonctionnelle de nouveaux gènes en 11p15.5 ne cessent de s'accroître et d'augmenter la complexité moléculaire de ce locus: mentionnons entre autre les gènes *TSSC3*, *TSSC5*, *MTR1*, *TSSC4*, *TSSC6*, *ASCL2*, *STIM1*, *BM88* (Keith et Machin, 1997; Alders *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999; Muller *et al.*, 2000; Prawitt *et al.*, 2000; Gaitanou *et al.*, 2001). Ces derniers, soumis à l'empreinte génomique ou non, doivent être considérés comme des candidats potentiels pouvant interagir dans le développement des caractères phénotypiques propres au BWS. Plusieurs d'entre eux pourraient également intervenir fonctionnellement lors d'événements de suppression tumorale.

¹ Cette notion est plus explicitement discutée à la section 2.1.2.2.3.2. de ce chapitre.

2.1.2.2.2. Régions de réarrangements chromosomiques (BWSCR)

Le locus 11p15.5 renferme trois régions de cassures associées aux remaniements chromosomiques transmis maternellement et décrits dans les cas BWS où se manifestent des anomalies cytogénétiques (< 1% des cas) (Figure 4, Tableau III). BWSCR1 se situe à environ 200 à 300 Kb centromérique du gène *IGF2* et interrompt régulièrement la séquence du gène *KvLQT1* (Hoovers *et al.*, 1995; Alders *et al.*, 2000). Les défauts de BWSCR1 s'expriment dans 80% des cas. Pour ce qui est des régions BWSCR2 et BWSCR3, elles se situent respectivement à 5 et 7 Mb de BWSCR1. Les réarrangements qui leur sont propres représentent une incidence de 20%. Bien que peu soit connu sur ces dernières régions, il a été suggéré par Alders *et al.*, considérant la proximité des points de cassures et l'hétérogénéité phénotypique des patientes, que BWSCR2 et BWSCR3 pouvaient influencer certaines composantes du système BWSCR1/*IGF2* (Alders *et al.*, 2000). D'ailleurs, le même groupe a révélé récemment l'existence d'un nouveau gène, *ZNF215*, exprimé maternellement de manière tissu-spécifique. *ZNF215* possède 5 transcrits distincts dont 2 sont interrompus lors des réarrangements au site BWSCR2. Néanmoins, plusieurs investigations demeurent nécessaires afin de pouvoir lui attribuer une fonction dans le BWS.

2.1.2.2.3. Centres de contrôle de l'empreinte

La notion de «centre de contrôle de l'empreinte» (IC) a préalablement été introduite à la section 1.3. du chapitre précédent. Dans un premier temps, nous désignons une région comme IC lorsque une marque épigénétique, le plus souvent la méthylation, est établie dans la lignée germinale. Sa définition fonctionnelle est, dans un second temps, fondée sur la manifestation d'une LOI de certains gènes voisins lorsque cette région est interrompue. (John *et al.*, 2001) En 11p15.5, deux IC ont été caractérisés jusqu'à maintenant: BWSIC1 et BWSIC2 (Figure 4). Aucun doute ne persiste quant à leur importance dans le BWS.

2.1.2.2.3.1. BWSIC1

BWSIC1 est le domaine de contrôle qui assure la régulation du profil d'empreinte réciproque des gènes *H19* et *IGF2*: empreintes souvent perturbées dans le BWS. La régulation de leur expression dépend, en partie, d'une séquence contenant un élément de répétition localisé en amont du gène *H19* (Frevel *et al.*, 1999a). BWSIC1 arbore une méthylation différentielle spécifique à l'allèle inactif paternel, laquelle est maintenue au cours du développement. BWSIC1 est riche en îlots CpG et se situe précisément dans un intervalle de -2 kb à -5.3 kb par rapport au site du début de la transcription de *H19* (Jinno *et al.*, 1996; Frevel *et al.*, 1999a). Préalablement, la caractérisation de cette région découle d'études effectuées chez la souris. En effet, Thorvaldsen *et al.* ont démontré que la délétion d'une séquence en 5' de *H19*, similaire à celle définie chez l'humain, entraîne l'activation de *H19* et l'inactivation d'*Igf2* lorsque la mutation est héritée du père. Inversement, la transmission maternelle de cette même délétion provoque de façon concomitante la répression de *H19* ainsi que l'activation d'*Igf2* (Thorvaldsen *et al.*, 1998). Chez l'humain, la LOI d'*IGF2* dans le BWS et dans les tumeurs de Wilms est associée à la répression transcriptionnelle ainsi qu'à l'hyperméthylation de l'allèle maternel du gène *H19* (Rainier *et al.*, 1993; Reik *et al.*, 1995). Cette constatation permet d'émettre l'hypothèse que, très tôt dans le développement embryonnaire, la méthylation anormale de l'allèle maternel de *H19* au site BWSIC1 entraîne sa répression, ce qui favorise la relaxation de l'empreinte d'*IGF2* et confère aux cellules ciblées un avantage de croissance marqué. Dans les tumeurs de Wilms caractérisées par une LOI d'*IGF2*, Frevel *et al.* ont su démontrer qu'il y avait effectivement présence d'une méthylation biallélique au site BWSIC1 alors qu'un profil de méthylation normal est observé dans les tumeurs ne présentant pas de LOI (Frevel *et al.*, 1999b). Par ailleurs, l'homologie de l'élément de répétition entre les espèces, mise en évidence par le même laboratoire (Frevel *et al.*, 1999a), laisse envisager l'existence d'un site de liaison protéique essentiel au contrôle de l'empreinte des gènes adjacents, comme *H19* et *IGF2* (Hark et Tilghman, 1998). En ce sens, Bell et Felsenfeld ont récemment extrapolé sur la fonction d'une protéine, CTCF, sensible à la méthylation (Bell et Felsenfeld, 2000; Hark *et al.*, 2000). Leur hypothèse suggère que la méthylation

de la région BWSIC1 contrôle l'expression des gènes soumis à l'empreinte en limitant l'accès de certains éléments d'amplification de la transcription (e.g., *enhancers*) au promoteur par l'intermédiaire d'une protéine (Notion de frontière).

2.1.2.2.3.2. BWSIC2

L'une des premières évidences en faveur de l'existence d'un second centre de contrôle de l'empreinte (BWSIC2) vient d'une étude démontrant qu'une LOI d'*IGF2* peut être observée en absence d'anomalie épigénétique pour *HI9* (Brown *et al.*, 1996). Le patient atteint du BWS étudié par ce groupe présentait une inversion (inv(11) (p11.2; p15.5)) maternellement héritée affectant la région BWSCR1. Par la suite, le laboratoire de Higgins (Smilnich *et al.*, 1999) a en effet établi l'existence d'un deuxième domaine de méthylation différentielle (KvDMR1) localisé dans une région intronique de *KvLQT1* qui chevauche la séquence de l'antisens *LIT1*. BWSIC2 se trouve à environ 300 kb de BWSIC1 et est composé d'îlots CpG méthylés maternellement, lesquels sont hautement conservés au cours de l'évolution et dérivés de la lignée germinale (Engemann *et al.*, 2000). Ainsi, lorsque KvDMR1 est méthylé, l'allèle maternel exprime *KvLQT1* et l'antisens *LIT1* est inactivé alors que l'absence de méthylation sur l'allèle paternel entraîne l'activation de *LIT1* et la répression de *KvLQT1*. Ce type d'association moléculaire (CpG-sens/antisens) n'est pas inhabituellement rencontré dans des pathologies soumises à l'empreinte génomique. Un centre de contrôle similaire a déjà été décrit au site chromosomique 15q11-q13 impliqué dans les syndromes PW et AS (Nicholls *et al.*, 1998). Nous avons mentionné qu'une nette majorité de patients atteints du BWS présentent une LOI du gène *LIT1*, dans laquelle l'expression de *LIT1* antagonise l'expression de *KvLQT1*. Il s'avère que ceux-ci démontrent également une perte de méthylation (LOM) de l'allèle maternel au niveau des îlots CpG de BWSIC2 (Lee *et al.*, 1999b). Ces dernières observations suggèrent qu'il existe une fonction pour BWSIC2 dans la régulation de l'empreinte génomique ainsi que dans la pathogenèse du BWS. Toutefois, il est également probable que des éléments régulateurs-*cis* interagissant ou non avec BWSIC2 dans la régulation de l'empreinte des gènes

environnants (e.g., $p57^{KIP2}$) existent et soient impliqués dans l'étiologie du BWS (Feinberg, 2000; John *et al.*, 2001).

2.1.2.3. Pathogenèse moléculaire du BWS: Interactions des divers éléments régulateurs

La complexité phénotypique et génotypique du BWS ne simplifient pas la compréhension des mécanismes moléculaires. Les notions connues quant aux diverses altérations moléculaires pouvant définir l'étiologie du BWS sont résumées au Tableau III. Les observations en ce qui a trait aux réarrangements chromosomiques maternels, aux duplications d'origine paternelle ainsi qu'à l'incidence d'UPD paternelle de la région 11p15.5 chez les patients atteints du BWS sont en accord avec la présence de gènes inhibiteurs de croissance d'origine maternelle (e.g., $p57^{KIP2}$, *H19*) et de gènes promoteurs de croissance d'origine paternelle (e.g., *IGF2*). Ainsi, les caractéristiques cliniques et la prédisposition tumorale sont les conséquences d'un déséquilibre entre une expression accrue de ces gènes paternels et une réduction ou une absence d'expression des gènes maternels. À l'heure actuelle, *IGF2* et $p57^{KIP2}$ ainsi que les deux régions de contrôle de l'empreinte (BWSIC1 et BWSIC2) semblent être les facteurs contribuant fortement à la pathogenèse du syndrome.

Le gène *IGF2* a longtemps été considéré comme le candidat principal dans le BWS. En effet, la LOI d'*IGF2*, ce qui signifie que ce facteur de croissance embryonnaire est exprimé anormalement par les deux allèles parentaux, est l'événement moléculaire le plus souvent rencontré dans le BWS et dans les tumeurs de Wilms. L'expression biallélique d'*IGF2* découle d'une UPD paternelle dans 10 à 20% des cas sporadiques (Li, M. *et al.*, 1998). Toutes les situations d'UPD se manifestent sous forme de mosaïcisme. De plus, l'isodisomie n'implique que la région 11p15.5. Cet événement découle de recombinaisons somatiques post-zygotiques laissant place à une double contribution du matériel génétique paternel ainsi qu'à l'absence d'une contribution maternelle. Du point de vue phénotypique, l'hémihypertrophie et l'hémimacroglossie décrites pour plusieurs patients BWS sont des signes évidents de la présence d'événements liés au mosaïcisme. Puisque dans des circonstances d'UPD les profils

épigénétiques des gènes soumis à l’empreinte sont aussi d’origine paternelle, nous pouvons par déduction nous attendre à trouver une hyperméthylation du gène *H19* et une hypométhylation de KvDMR1 entraînant une LOI du gène *LIT1*.

De plus, la LOI d’*IGF2* affecte plus de 50% des patients ne présentant aucune anomalie cytogénétique (Reik et Maher, 1997; Maher et Reik, 2000). Un premier mécanisme dépendant des changements épigénétiques de *H19* est à l’origine de l’expression biallélique d’*IGF2* dans un faible pourcentage de patients sporadiques (5-10%) (Reik *et al.*, 1995; Catchpoole *et al.*, 1997). Plusieurs modèles expérimentaux soutenant l’existence d’une corégulation de l’empreinte de *H19* et d’*IGF2* ont été énoncés aux sections 2.1.2.2.1 et 2.1.2.2.3 de ce chapitre. Ainsi, pour cette catégorie spécifique de patients, nous constatons l’absence de cette réciprocity. La LOI d’*IGF2* est associée à une perte fonctionnelle du centre de contrôle BWSIC1, soit à une méthylation de l’allèle maternel actif de *H19*. En d’autres mots, un défaut au niveau de BWSIC1 se définit par l’hyperméthylation de la région 5’ de *H19* (épigénotype biallélique d’origine paternelle), laquelle entraîne la répression de *H19* contribuant ainsi à la double expression d’*IGF2*. Il est intéressant de constater que la proportion de patients affectés par des modifications épigénétiques en BWSIC1 coïncide étrangement avec le pourcentage de risque associé au développement de tumeurs embryonnaires (5 à 10%).

Cependant, dans 40 à 50% des cas sporadiques, la LOI d’*IGF2* n’est pas en relation avec l’hyperméthylation de *H19* (Joyce *et al.*, 1997). Catchpoole *et al.* ont effectué une analyse mutationnelle du gène *H19* afin d’expliquer la manifestation d’une LOI d’*IGF2* lorsque *H19* est normalement méthylé (Catchpoole *et al.*, 2000). Ils n’ont identifié aucune mutation du gène, ce qui suggère qu’un mécanisme moléculaire non associé au centre BWSIC1 soit fréquemment responsable de la LOI d’*IGF2* dans le BWS. Une LOI d’*IGF2* reflétant cet autre mécanisme a été retrouvée dans un cas d’inversion d’origine maternelle impliquant la séquence du gène KvLQT1, région spécifique au centre de contrôle BWSIC2 (Brown *et al.*, 1996). La majorité des patients sporadiques, soit environ 40 à 50%, sont affectés par des altérations épigénétiques à cet endroit (Lee *et al.*, 1999b). Nous constatons que les défauts du centre BWSIC2 se définissent par la présence d’une LOM de KvDMR1, ce qui signifie que les allèles parentaux sont

caractérisés par un profil de méthylation maternelle. Ces changements perturbent l'expression du gène *KvLQT1* et la répression de l'antisens *LIT1* laissant place alors à une LOI de *LIT1*. Smilnich *et al.* ont démontré qu'une LOI de *LIT1* et une LOI d'*IGF2* peuvent être conjointement retrouvées dans certains cas BWS (Smilnich *et al.*, 1999). Toutefois, les défauts de BWSIC2 n'entraînent pas invariablement une LOI d'*IGF2* (Lee *et al.*, 1999b). Il semble que la régulation d'*IGF2* par l'intermédiaire du BWSIC2 puisse être polymorphique ou alors sensible à la nature du défaut en BWSIC2 (Maher et Reik, 2000). Smilnich *et al.* ont également observé que les patients qui ne présentent pas une hyperméthylation de *H19* possèdent fréquemment une LOM de KvDMR1 tandis que les patients qui possèdent une hyperméthylation de *H19* sont dépourvus de défauts de méthylation dans KvDMR1 (Smilnich *et al.*, 1999; Gaston *et al.*, 2001).

Par ailleurs, en considérant qu'un nombre important de patients atteints du BWS possèdent des mutations dans $p57^{KIP2}$ (sporadiques: 5-10% des cas; familiaux: 30-50% des cas), ceci confère à ce dernier une fonction non équivoque dans la pathogenèse du BWS (Hatada *et al.*, 1996; Hatada *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1997a; O'Keefe *et al.*, 1997; Lam *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2001). Cependant, la régulation de l'expression de $p57^{KIP2}$ reste relativement imprécise. Aucune région de méthylation différentielle n'a été rapportée dans les séquences adjacentes, mise à part la méthylation de KvDMR1 (John *et al.*, 1999). En générant des chromosomes humains modifiés possédant des mutations dirigées du gène *LIT1*, Horike *et al.* ont pu constater l'activation simultanée des copies paternelles, normalement réprimées, des gènes $p57^{KIP2}$ et *KVLQT1* (Horike *et al.*, 2000). Donc, il est possible du moins en partie, que l'empreinte de $p57^{KIP2}$ soit sous le contrôle de BWSIC2. En ce sens, nous savons depuis peu que des éléments régulateurs-*cis* se trouvent entre les deux gènes, mais leur rôle sur l'expression de $p57^{KIP2}$ dans certains tissus n'a pas été associé à l'expression parentale spécifique (John *et al.*, 2001). Nous savons qu'il n'y a pas de relation entre les mutations germinales de $p57^{KIP2}$ et les anomalies épigénétiques de *IGF2/H19*. Toutefois, de récents travaux laissent entrevoir la possibilité que *IGF2* et $p57^{KIP2}$ possèdent des fonctions indépendantes et interactives dans le développement et la croissance (Grandjean *et al.*, 2000). Les auteurs ont démontré que l'augmentation de IGF-II affecte à la baisse l'expression de $p57^{KIP2}$.

En résumé, le phénotype observé dans le BWS peut résulter d'un déséquilibre de la contribution allélique parentale, de modifications épigénétiques aux différents sites des IC ainsi qu'à la perte fonctionnelle causée par des mutations ou des réarrangements chromosomiques. Les particularités moléculaires observées dans la population BWS concordent relativement bien avec le modèle en «deux-domaines» proposé par Feinberg, c'est-à-dire qu'il existe au locus 11p15.5 le centre de contrôle télomérique BWSIC1 qui assure la régulation de l'empreinte des gènes *H19* et *IGF2* et celui centromérique BWSIC2 qui voit à la régulation de l'empreinte de *KvLQT1*, *LIT1* et *p57^{KIP2}* (Brown *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1999; Feinberg, 2000). Les évidences décrites dans la littérature supportent également une interdépendance entre ces deux domaines.

La méthylation différentielle des allèles parentaux est un phénomène moléculaire grandement impliqué dans la régulation de l'empreinte génomique. Nous pouvons expliquer globalement pour une majorité de patients les événements moléculaires entraînant le BWS. Il n'en demeure pas moins que certaines caractéristiques phénotypiques ne peuvent être expliquées. Ainsi, il semble évident que plusieurs éléments présents au locus 11p15.5 doivent être étudiés. D'autres facteurs épigénétiques impliqués dans la régulation de l'empreinte génomique tels la déacétylation des histones, le degré de condensation de l'ADN et son organisation spatiale dans le noyau ainsi que la fonction réelle des antisens pourraient avoir un rôle à jouer dans le BWS.

2.1.3. *Corrélations génotypes-phénotypes / épigénotypes-phénotypes*

L'établissement de corrélations génotypes-phénotypes et, dans ce contexte, épigénotypes-phénotypes est d'une pertinence majeure pour l'investigation, le suivi cliniques et, pour la compréhension des mécanismes moléculaires spécifiques au BWS et aux formes tumorales associées.

Une étude portant sur les translocations chromosomiques rencontrées dans le BWS et les tumeurs spécifiques (Alders *et al.*, 1996) a permis de constater que les patients présentant des réarrangements de la région BWSCR2 possèdent des traits phénotypiques mineurs; l'hémihypertrophie était le signe principalement observé.

Toutefois, une description plus classique (macroglossie, omphalocèle) du syndrome est posée pour les patients ayant des remaniements aux domaines BWSCR1 et BWSCR3. Aucune hémihypertrophie n'a été décrite pour ces groupes.

Par ailleurs, la manifestation de l'hémihypertrophie est significativement plus fréquente dans les cas d'UPD paternelle que chez les patients non UPD (Schneid *et al.*, 1993; Catchpoole *et al.*, 1997). Le risque de développer des tumeurs de Wilms est également plus élevé dans cette sous-population (Henry *et al.*, 1993). Le phénotype de l'hémihypertrophie s'explique moléculairement par la proportion de cellules isodisomiques retrouvée de part et d'autre du corps. Itoh *et al.* ont récemment mis en évidence une corrélation entre le pourcentage de mosaïcisme et le degré d'hyperplasie des organes caractérisant ce trait clinique et les tumeurs retrouvées dans le BWS (Itoh *et al.*, 2000).

De plus, le développement de l'omphalocèle est rencontré peu fréquemment chez les patients non UPD atteints de défauts dans la région BWSIC1, i.e., lorsqu'une hyperméthylation de *H19* est détectée (Catchpoole *et al.*, 1997; Engel *et al.*, 2000). Cependant, Lam *et al.* constatent que la présence de mutations germinales du gène *p57^{KIP2}*, bien que retrouvées dans une minorité de patients, est en corrélation nettement significative (environ 80% de risque) avec l'existence d'omphalocèle et ce, toujours en comparaison avec les patients affectés par les altérations en BWSIC1 ($p < 0.005$) ou par une UPD ($p < 0.005$) (Lam *et al.*, 1999). Une analyse exhaustive effectuée par Engel *et al.* sur une série de patients sporadiques a démontré que la LOM de KvDMR1 (défaut de BWSIC2 associé à une LOI de *LIT1*) est souvent associée à une LOI d'*IGF2*, mais pas de manière invariable (Engel *et al.*, 2000). Néanmoins, les patients affectés par une LOM de KvDMR1 sont toujours dépourvus d'anomalie de méthylation de *H19*, ceci soutenant l'existence d'un mécanisme indépendant de *H19* causant une LOI d'*IGF2*. Cependant, l'incidence d'omphalocèle chez les patients non UPD présentant un défaut au site BWSIC2 n'est pas véritablement différente de l'incidence rapportée pour des mutations germinales du gène *p57^{KIP2}*, mais demeure plus élevée que dans les cas de défauts de BWSIC1 ($p = 0.007$) et d'UPD ($p < 0.00001$) (Engel *et al.*, 2000; Gaston *et al.*, 2001).

Aucune association évidente n'a pu être relevée entre les mutations germinales de $p57^{KIP2}$ et le risque de développement de tumeurs embryonnaires (Lam *et al.*, 1999). En réalité, il est fort probable que les patients atteints de tumeurs embryonnaires aient une altération en BWSIC1 ou encore une UPD et qu'ils ne soient pas touchés par une LOM unique de KvDMR1 (LOI de *LIT1*) (Mitsuya *et al.*, 1999; Engel *et al.*, 2000). Une étude récente soutient effectivement cette observation. Bliiek *et al.* ont rapporté l'absence de tumeurs dans un groupe de patients présentant exclusivement une déméthylation de *KvLQT1* (Bliiek *et al.*, 2001). Au contraire, 33% des patients étudiés, affectés par une hyperméthylation de *H19* (UPD et défaut de BWSIC1), avaient des tumeurs. Finalement, 20% des patients analysés, n'ayant ni UPD ni altérations en BWSIC1 et BWSIC2, présentaient également des tumeurs.

Récemment, Gaston *et al.* ont fait une étude pour tenter de déterminer la valeur du pronostic de certains facteurs cliniques et moléculaires. Malgré la prépondérance marquée de l'hémihypertrophie chez les patients présentant des tumeurs, aucune valeur significative du pronostic n'a été trouvée. La sévérité du phénotype est le seul signe clinique pour lequel une telle valeur a été définie ($p=0.05$). Néanmoins, une valeur suggestive du pronostic (due à la petitesse de la cohorte), en faveur du développement tumoral, a été mise en évidence pour la détection d'une UPD ainsi que d'une méthylation anormale de *H19* des cellules leucocytaires (Gaston *et al.*, 2001).

Il est donc évident que le BWS est génétiquement hétérogène. Il semble que les différences phénotypiques décrites entre les divers sous-groupes moléculaires de patients reflètent les altérations différentielles des gènes candidats associés. Jusqu'à maintenant, plusieurs indices pointent vers une implication prédominante d'*IGF2* (croissance excessive et tumorigénicité) et de $p57^{KIP2}$ (omphalocèle) dans la pathogenèse du BWS. À la base de leurs altérations moléculaires, ces gènes semblent se compléter phénotypiquement.

2.1.4. Discordance entre jumeaux monozygotiques

Parmi les observations intrigantes associées au BWS, nous retrouvons dans la littérature la description de 18 paires de jumeaux monozygotiques (MZ) discordants. La

discordance signifie qu'un seul des jumeaux est atteint de ce désordre (Weksberg et Squire, 1996). Seulement 1% des patients atteints du BWS constitue cette catégorie (Weksberg et Shuman, 2000). Étrangement, il existe une prépondérance de cas de jumelles MZ (15 paires) (Berry *et al.*, 1980; Bose *et al.*, 1985; Olney *et al.*, 1988; Litz *et al.*, 1988; Clayton-Smith *et al.*, 1992; Franceschini *et al.*, 1993; Orstavik *et al.*, 1995). Néanmoins, 3 cas de jumeaux MZ discordants (Chien *et al.*, 1990; Leonard *et al.*, 1996) ainsi que 2 cas de concordance dont une paire de jumelles ainsi qu'une paire de jumeaux (Clayton-Smith *et al.*, 1992) ont aussi été décrits.

L'une des préoccupations, dans l'étude de la discordance chez les jumeaux est de s'assurer du statut réel de zygotité. Bien que l'analyse histologique du placenta révèle des indices valables, l'analyse de plusieurs variantes polymorphiques telles les groupes sanguins, les antigènes de type HLA, les polymorphismes enzymatiques et, plus récemment employés, les polymorphismes de l'ADN demeure nettement plus rigoureuse (Keith et Machin, 1997). De plus, par l'intermédiaire de ces mêmes investigations moléculaires, les divergences caryotypiques peuvent être examinées.

Par ailleurs, les mécanismes d'action expliquant l'origine d'une telle discordance pour le BWS chez des jumeaux MZ n'ont pas été élucidés. Il est probable que cette discordance découle de recombinaisons somatiques postzygotiques. Toutefois, aucun mosaïcisme associé à une UPD paternelle n'a été rapporté jusqu'ici (Li, M. *et al.*, 1998). Seule une étude, exposant le cas de jumeaux dizygotiques discordants (fille atteinte/garçon non atteint), documente ce type de phénomène (Itoh *et al.*, 2000). Puisque les analyses se font majoritairement à partir du sang périphérique, l'accessibilité à des tissus plus informatifs étant restreinte, la détection du mosaïcisme demeure un facteur limitant considérant que 70% des jumeaux MZ présente une vascularisation placentaire commune (Hall, 1996). Ceci est d'une pertinence majeure puisqu'une étude récente a permis de démontrer, par l'analyse du sang périphérique de deux paires de jumelles MZ discordantes pour le BWS, que les mêmes anomalies épigénétiques spécifiques à KvDMR1 (déméthylation) peuvent conjointement être rencontrées chez la jumelle atteinte et celle non atteinte (Gaston *et al.*, 2001).

De plus, considérant qu'un phénomène similaire a été décrit pour des pathologies liées au chromosome X (Richards *et al.*, 1990), l'hypothèse d'une différence au niveau

de l'inactivation de l'X a été proposée pour tenter de comprendre l'origine d'une incidence plus élevée de cas de jumelles MZ discordantes pour le BWS (Lubinsky et Hall, 1991; Clayton-Smith *et al.*, 1992). Il semble que la gémellité MZ et l'inactivation de l'X sont des événements se produisant presque simultanément dans le développement foetal (Orstavik *et al.*, 1995). Dans leur étude, Orstavik *et al.* ont démontré une inactivation non aléatoire complète en faveur de l'X d'origine maternelle chez la jumelle atteinte du BWS (Orstavik *et al.*, 1995). Cependant, dans une autre étude, une inactivation non aléatoire unidirectionnelle a été remarquée pour chacune des jumelles discordantes d'une paire MZ tandis que les jumelles d'une seconde paire possédaient une faible inactivation non aléatoire (Weksberg et Squire, 1996). Ces différences de patrons d'inactivation de l'X entre des paires de jumelles discordantes pour le BWS ne semblent pas être une explication plausible quant à la manifestation de ce type d'événement. Toutefois, afin de tenter d'attribuer un rôle à l'inactivation de l'X dans l'étiologie des patients sporadiques, Bird *et al.* ont analysé les profils d'inactivation d'une population de patients BWS. Leurs observations quant à la présence d'une inactivation non aléatoire de l'X chez certains d'entre eux laissent envisager que le chromosome X peut quelques fois être impliqué dans l'expression phénotypique du BWS (Li, M. *et al.*, 1998). Récemment, Sapienza C. et Weksberg R. ont confirmé néanmoins qu'une inactivation non aléatoire de l'X n'était pas le lien causal de la discordance des jumelles MZ (Communication personnelle à Deal C.) (Gaston *et al.*, 2001).

Quels sont les éléments à envisager pour comprendre une telle discordance? Il n'est peut être pas tout à fait exact de penser que les jumeaux MZ sont identiques. Machin a suggéré que les discordances retrouvées chez des jumelles MZ peuvent s'expliquer tant par une discordance génétique que par des facteurs environnementaux (Hall, 1996; Machin, 1996). En effet, les jumeaux MZ ne présentent pas une identité génétique pour tous les tissus due en partie à l'incidence de mosaïcisme (Hall, 1996). De plus, il s'avère que les jumeaux MZ ne sont pas exposés à l'influence du même environnement intra-utérin. Il est probable que des facteurs comme la distribution inégale du nombre de cellules lors de la séparation zygotique ainsi que la présence d'un apport vasculaire différent au placenta aient une implication dans la discordance de

jumeaux MZ (Hall, 1996; Machin, 1996). Au cours du développement, des événements somatiques sont aussi susceptibles de se produire chez l'un ou l'autre des jumeaux. Néanmoins, les mécanismes moléculaires entourant la gémellité monozygotique et le BWS demeurent une énigme.

Comme nous l'avons mentionné, il est maintenant admis que des altérations épigénétiques au locus 11p15.5 participent à la manifestation du BWS. Dans cette étude, spécifiquement pour une paire de jumelles MZ discordantes pour le BWS, nous décrivons les analyses de méthylation différentielle effectuées au centre de contrôle de l'empreinte génomique BWSIC1. Préalablement, afin de confirmer leur statut de zygosité, nous décrivons le génotypage effectué pour divers sites polymorphiques. Nos résultats constituent la première évidence d'une divergence des profils de méthylation au locus BWSIC1 chez des jumelles MZ discordantes pour le BWS. Cette démonstration suggère que des modifications épigénétiques peuvent être responsables de la discordance observée chez ces enfants génétiquement identiques.

2.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.2.1. Patientes à l'étude

Des jumelles (Fig. 5) sont nées de la première grossesse d'une femme de 26 ans, G₁P₀A₀V₂. La mère ne présente aucun antécédent médical. Aucune consanguinité n'a été rapporté. Cette grossesse gémellaire a été compliquée par une hypertension de grossesse (prééclampsie) et des hémorragies *antepartum* récurrentes. Du méthyldopa a été administré à la mère pour traiter son hypertension. L'accouchement a eu lieu d'urgence à 30 semaines et 2 jours, par césarienne, suite au développement d'une insuffisance rénale secondaire à une prééclampsie sévère. L'analyse histologique du placenta rapporte la présence de membranes monochorionique et diamniotique.

Jumelle I: Un examen prénatal par ultrason à 16 semaines a révélé chez la jumelle I la présence d'un exomphalocèle et d'un polyhydramnios. À 24 semaines d'âge gestationnel, un deuxième ultrason a permis de détecter des organes hypertrophiés (foie, rein, rate). Le poids à la naissance était de 1 380 g (25^e-50^e centile) et le périmètre crânien de 26.2 cm (10^e centile). L'APGAR était 4 à 1 minute et 9 à 5 minutes. Un omphalocèle, une macroglossie et des rides auriculaires verticales ont été notés et le diagnostic clinique de BWS a été posé (Fig. 5A-B). L'exomphalocèle a été corrigé à 3 heures de vie. Peu de temps après la naissance, la jumelle I a développé une hypoglycémie hyperinsulinémique. Un traitement au diazoxide lui a été administré à partir de la 36^e heure de vie. Suite à l'administration de plusieurs doses d'hydrocortisone, la somatostatine a été ajoutée entre le 7^e et le 30^e jour de vie afin de contrôler ses épisodes hypoglycémiques. D'autres complications ont été constatées: 1) au jour 4, une thrombocytopenie transitoire; 2) à 3 semaines, une pneumonie d'aspiration nécessitant de l'oxygénothérapie; 3) à partir de 2 semaines, une déficience respiratoire secondaire à la macroglossie, traitée avec CPAP nasal jusqu'à la 11^e semaine. À 4 mois de vie, elle a souffert d'un arrêt respiratoire avec infiltrats pulmonaires bilatéraux nécessitant une admission aux soins intensifs et de l'oxygénothérapie à bas débit. La présence d'une maladie pulmonaire néonatale chronique a été le diagnostic de départ. Peu de temps après, des convulsions ont

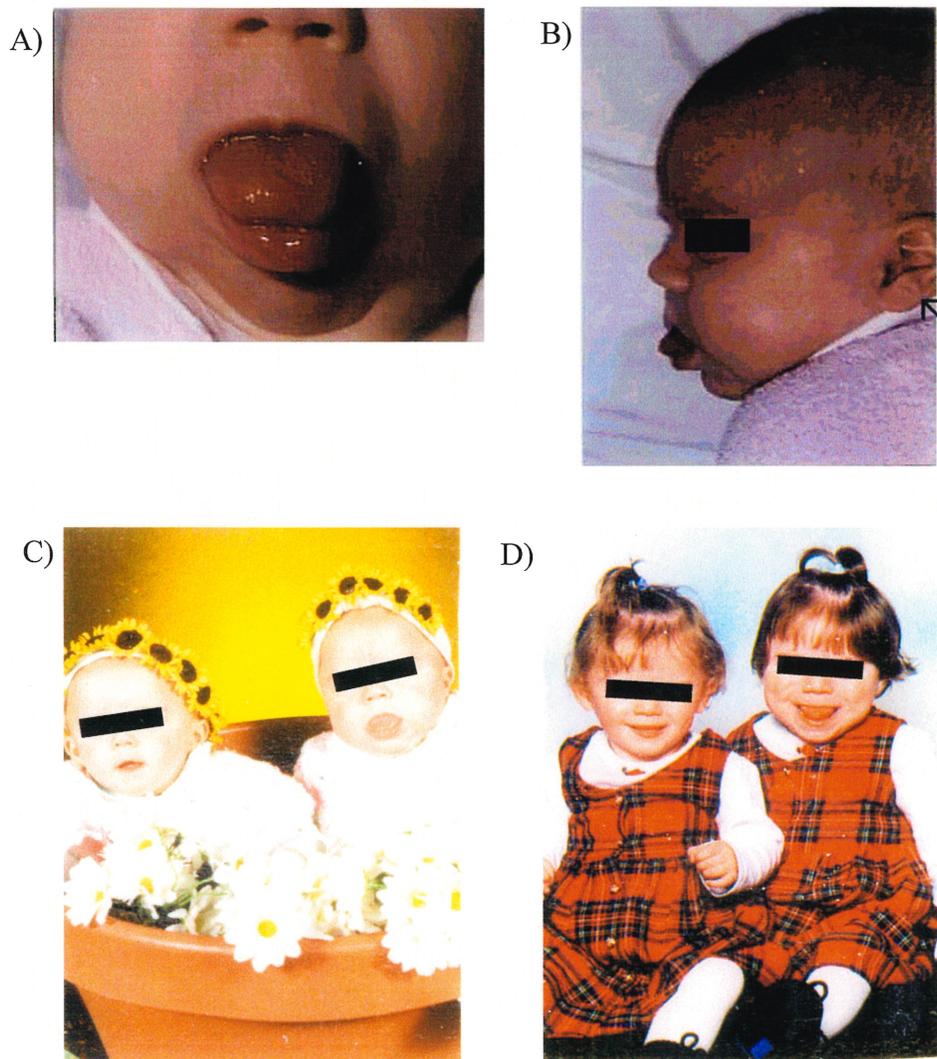


Figure 5: Jumelles monozygotiques discordantes pour le BWS. A) À 1 mois, macroglossie de la jumelle I atteinte. B) À 1 mois, apparence de rides auriculaires (flèche) et de la macroglossie chez la Jumelle I atteinte C) Jumelles I et II âgées de 9 mois. D) Jumelles I et II âgées de 18 mois. Sur les photos C et D, la jumelle I se trouve à droite alors que la jumelle II se trouve à gauche. L'hypercroissance et la macroglossie de la jumelle I atteinte sont perceptibles.

commencé à se manifester. Les crises convulsives ont été contrôlées avec du phénytoïne. Le traitement au diazoxide a été interrompu 2 mois avant son 4e anniversaire. Jusqu'à maintenant, le suivi clinique indique un retard modéré du développement. Son caryotype est de 46,XX et confirme l'absence d'anomalie chromosomique.

Jumelle II: La jumelle II avait un poids à la naissance de 1 080 g (10^e centile) et un périmètre crânien de 27.3 cm (50^e centile). Aucun trait dysmorphique n'a été détecté. Sa glycémie s'est normalisée et n'a jamais requis plus de 10mg/kg/min de glucose. Elle a reçu son congé à l'âge de 6½ semaines (âge gestationnel de 37 semaines). Son caryotype était de 46,XX.

2.2.2. Confirmation de l'état de zygosity des jumelles

Suite au consentement éclairé des parents, le sang périphérique des jumelles, âgées de 6 mois, et des parents a été prélevé (courtoisie du Dr Patricia Crock, John Hunter Hospital, Australie). L'ADN génomique (ADNg) a été extrait par une méthode classique d'extraction phénol:chloroforme.

Afin de s'assurer de la monozygosity des jumelles, une série d'analyses génotypiques a été effectuée au locus 11p15.5 ainsi que sur les chromosomes 7 et X. Plusieurs marqueurs polymorphiques de type RFLP (*IGF2*/ApaI, *H19*/RsaI, *INS*/PstI, *p57^{kip2}*/PvuII, *IGFBP3*/Alw21I, *IGFBP3*/SmaI), SSCP (*Hras*) et microsatellites (DXS7100, DXS1053, DXS538, DXS981, DXS102) ont été étudiés chez les jumelles discordantes et leurs parents. Toutes les réactions PCR ont été faites à l'aide d'un appareil Perkin Elmer Cetus Gene Amp. PCR System 9600, dans un volume final de 50 µl en utilisant 100 à 500 ng d'ADNg (jumelles et parents). Elles contenaient également 1X de tampon PCR, 0.1 mM de dCTP, dGTP et dTTP (Life Technologies Inc.), 0.05 à 0.1 mM de dATP (Life Technologie Inc.), 2 U de *Taq* ADN polymérase (Life Technologies Inc.) ainsi que 1 à 5 µCi de [α -³²P]-dATP (Amersham Pharmacia Biotech). Pour les RFLP, toutes les digestions ont été faites dans un volume de 20 µl contenant 5 µl du produit de PCR, 10 à 20 U de l'enzyme de restriction appropriée et 1X du tampon spécifique à l'enzyme.

2.2.2.1. Génotypage au locus 11p15.5

Dans l'étude du polymorphisme *ApaI*, *IGF2* a été amplifié en présence de 1.5 à 1.7 μM d'amorces sens et antisens (Exon 9 sens: 5' CTT GGA CTT TGA GTC AAA TTG G 3'; antisens: 5' CCT CCT TTG GTC TTA CTG GG 3') (Alpha DNA). Le PCR a été réalisé en présence de 1.5 mM de MgCl_2 dans les conditions suivantes: 30 cycles de 25 secondes à 94°C, de 25 secondes à 58°C et de 25 secondes à 72°C ainsi qu'une période d'élongation de 5 minutes à 72°C (Paquette *et al.*, 1998). La digestion *ApaI* (Life Technologies Inc.) a été effectuée à 30°C pendant 2 heures. Le fragment amplifié a une taille de 236 pb. Suite à la digestion, la présence du polymorphisme *ApaI* a généré des fragments de 173 pb et de 63 pb.

Pour *H19/RsaI*, le PCR a été fait avec un départ à chaud en utilisant 1.6 à 1.7 μM d'amorces sens et antisens (Exon 4, sens H1: 5' TAC AAC CAC TGC ACT ACC TG 3'; Exon 5, antisens H3: 5' TGG AAT GCT TGA AGG CTG CT 3') Le PCR a été réalisé en présence de 1.5 mM de MgCl_2 dans les conditions suivantes: une dénaturation de 5 minutes à 94°C, une période de 5 minutes à 72°C (ajout de la *Taq* DNA polymérase), 35 cycles de 30 secondes à 94°C, de 30 secondes à 70°C et de 1 minute à 72°C ainsi qu'une période d'élongation finale de 10 minutes à 72°C. La digestion *RsaI* (New England Biolabs) a été effectuée à 37°C pendant 2 heures (Rainier *et al.*, 1993). Le fragment amplifié a une taille de 654 pb. La présence du polymorphisme *RsaI* a généré des fragments de 487 pb et de 167 pb.

Pour le polymorphisme *PstI*, l'amplification de *INS* a été réalisée en présence de 1.6 μM d'amorces sens et antisens (sens: 5' CTC TAC CAG CTG GAG AAC TA 3'; antisens: 5' GGC TGG TTC AAG GGC TTT AT 3') (Julier *et al.*, 1991). Le PCR a été effectué en présence de 1.5 mM de MgCl_2 dans les conditions suivantes: 30 cycles de 25 secondes à 94°C, de 25 secondes à 60°C et de 25 secondes à 72°C ainsi qu'une période d'élongation de 5 minutes à 72°C. La digestion *PstI* (New England Biolabs) a été réalisée en incubant à 37°C pendant un minimum 2 heures. Le fragment amplifié a une taille de 104 pb. La coupure au site *PstI* a généré des fragments de 62 pb et de 42 pb.

Pour *p57^{kip2}/PvuII*, l'amplification a été faite en présence de 0.4 μM d'amorces sens et antisens (sens: 5' TTC GCG CCC TGC TCG GCG CTC TCT TGA GGC 3';

antisens: 5' TGC CCG CGT TCT ACC GCG AGA CGG TGC AGG 3') (Matsuoka *et al.*, 1996). Le PCR a été réalisé en présence de 0.5 mM de MgCl₂ et de 10% de DMSO dans les conditions suivantes: une période de dénaturation de 5 minutes à 94°C, 30 cycles de 1 minute à 94°C, de 1 minute à 65°C et de 1 minute à 72°C ainsi qu'une période d'élongation de 5 minutes à 72°C. La digestion PvuII (New England Biolabs) a été effectuée pendant 2 heures à 37°C. Le fragment amplifié a une taille de 427 pb. La coupure au site PvuII a généré des fragments de 281 pb et de 146 pb.

Pour le SSCP *Hras*, l'ADNg a été amplifié en présence de 0.8 µM d'amorces sens et antisens (Exon 1 sens 0622: 5' ATG ACG GAA TAT AAG CTG GT 3'; antisens 0954: 5' GGG TCG TAT TCG TCC ACA AA 3') (Sekiya *et al.*, 1984). Le PCR radioactif s'est déroulé en présence de 1.5 mM de MgCl₂ dans les conditions suivantes: 30 cycles de 20 secondes à 94°C, de 25 secondes à 63°C et de 1.5 minute à 72°C ainsi qu'une période d'élongation de 10 minutes à 72°C. La taille du fragment amplifié est de 101 bp. CAT et CAC sont les deux formes polymorphiques existantes (Deal *et al.*, 1993).

Le génotype des analyses RFLP a été visualisé par électrophorèse en mettant 3 µl du produit de digestion sur gel non dénaturant 5% de polyacrylamide 29:1.

Le génotype de l'analyse par SSCP a été visualisé par électrophorèse en mettant 3 µl du produit de PCR sur gel 7% de polyacrylamide 29:1, contenant 5% de glycérol. Les échantillons ont été préalablement mélangés à un tampon de formamide (formamide 95%; 20 mM EDTA; 0.05% BPB; 0.05% XC) et dénaturés pendant 3 minutes à 85°C.

2.2.2.2. Génotypage du chromosome 7

La réaction PCR pour l'étude des polymorphismes -185 (*IGFBP3/SmaI*) et -202 (*IGFBP3/Alw21I*) a été effectuée en présence de 1.6 µM des amorces sens et antisens (sens BP3PROM4F1: 5' AA CTG CAG CCA CGA GGT ACA CAC GAA TG 3'; antisens BP3PROM4R: 5' AGC CGC AGT GCT CGC ATC TGG 3'). Les PCR ont été réalisés en présence de 1.0 mM de MgCl₂ et de 2% de DMSO dans les conditions suivantes: une période de dénaturation de 10 minutes à 94°C, 35 cycles de 30 secondes à 96°C, de 30 secondes à 64°C et de 1 minute à 72°C ainsi qu'une période de 5 minutes à

72°C. La digestion SmaI (Life Technologies Inc.) a été effectuée à 30°C pendant 2 heures. La présence du site SmaI (allèle C) a généré des fragments de 224 pb et de 173 pb, son absence (allèle T) a généré des fragments de 224 pb et de 206 pb. La digestion Alw21I (MBI Fermentas) a été effectuée à 37°C pendant 2 heures dans un volume de 30 µl. La présence du site ALW21I (allèle A) a généré des fragments de 242 pb et de 162 pb, son absence (allèle C) a généré des fragments de 290 pb et 162 pb. L'analyse des produits a été faite sur gel d'agarose 2%.

2.2.2.3. Génotypage du chromosome X

La méthodologie concernant l'analyse génotypique des microsatellites DXS7100, DXS1053, DXS538, DXS981 et DXS102 est décrite à la section 3.2.3. du chapitre 3. L'optimisation de la technique a été effectuée spécifiquement en vue de l'étude sur l'origine parentale du chromosome X intact dans le Syndrome de Turner

2.2.3. Analyse des différences de méthylation de la région bis2

La technique de séquençage au bisulfite est une approche utilisée dans l'étude des différences de méthylation pouvant exister entre deux allèles au niveau d'îlots CpG. D'une part, le traitement au sodium bisulfite de l'ADN permet, en supprimant un groupe sulfonate, de convertir les résidus cytosine non méthylés en résidus uracile. Cette conversion est impossible en présence de résidus 5' méthylcytosine. D'autre part, suite à la synthèse de nouveaux fragments par amplification PCR, il est possible de faire la discrimination des îlots CpG méthylés par rapport aux îlots CpG non méthylés puisque sur gel de séquence les cytosines méthylées sont préservées en cytosines et les cytosines non méthylées sont substituées en thymines.

2.2.3.1. Traitement au bisulfite

Avant d'effectuer le traitement au bisulfite, 5 µg d'ADNg (jumelle I et II) ont été digérés avec 60 U de PstI et 5 µg avec une combinaison de 60 U de PstI et 60 U de

HpaII (New England Biolabs) toute une nuit à 37°C. Les réactions se sont déroulées dans un volume de 300 µl en présence de 1X du tampon spécifique à l'enzyme. Une fois la digestion complétée, l'ADN a été extrait par phénol:chloroforme:isoamylOH (25:24:1) ainsi que précipité dans du NH₄C₂H₃O₂ 5M et de l'éthanol 100%. L'ADN a été mis en suspension dans 100 µl de TE (Tris 10 mM, EDTA 0.1 mM à pH 8). L'ADN a été dénaturé par l'ajout de 0.3 M de NaOH frais en incubant 30 minutes à 42°C. Des solutions de 10 mM d'hydroquinone (Sigma) et 2.9 M de bisulfite de sodium à pH 5 (Sigma) fraîchement préparées ont été utilisées dans un volume final de 1.2 ml en présence de 110 µl d'ADN dénaturé, de 2.5 M de bisulfite de sodium et de 0.5 mM d'hydroquinone. Suite à l'ajout d'une goutte d'huile minérale, les tubes ont été incubés à 55°C pendant 4 heures, enveloppés dans du papier d'aluminium. Par la suite le bisulfite libre a été enlevé par purification suivant le protocole de la trousse commerciale QIAEX II (Qiagen). Le volume final a été ajusté à 100 µl avec de l'eau. Pour compléter la réaction (désulphonation de l'uracil), 0.3 M de NaOH a été ajouté, suivi d'une incubation de 30 minutes à 37°C. La réaction a été neutralisée par l'ajout de 3M NH₄C₂H₃O₂ à pH 7 et l'ADN a été précipité à l'éthanol 100%, centrifugé à vitesse maximale pour 15 minutes, lavé à l'éthanol 70%, séché et mis en suspension dans 100 µl d'eau (Clark *et al.*, 1994; Frevel *et al.*, 1999b). L'ADN a été préservé dans des tubes enveloppés de papier d'aluminium.

2.2.3.2. PCR de la région bis2

L'amplification de bis2 a été réalisée par PCR imbriqué dans l'appareil Perkin Elmer DNA Thermal Cycler. La première ronde a été effectuée à partir de 5 µl d'ADN traité au bisulfite dans un volume de 25 µl. La deuxième ronde a utilisé 5 µl du produit de PCR de la ronde #1 dans un volume de 50 µl. Toutes les réactions ont été faites en présence de 0.6 µM d'amorces sens et antisens (amorces externes sens 1093: 5' GAG ATG AGA GGA GAT ATT TGG GGG ATAGTG AAG 3'; antisens 1099: 5' CCA AAC ATT ATA AAA AAA ACT AAC ACA AAA TCC 3'; amorces internes sens 1096: 5' GTA GGG TTT TTG GTA GGT ATA GAG 3'; antisens 1091: 5' CAC TAA AAA AAC AAT TAT CAA TTC 3'). Elles contenaient aussi 1X de tampon

PCR II (Perkin Elmer), 0.2 mM de chacun des dNTP, 2 mM de $MgCl_2$ ainsi que 1.25 U AmpliTaq Gold DNA polymerase (Perkin Elmer). Les conditions d'amplification par PCR utilisées pour la ronde #1 et #2 sont telles que décrites par Frevel *et al.* (Frevel *et al.*, 1999b).

2.2.3.3. Séquençage du produit de PCR

Les produits de PCR ont été purifiés suivant le protocole de la trousse commerciale QIAquick (Qiagen). Une fois purifiés, les fragments ont été préparés pour le séquençage suivant les étapes décrites au protocole «Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit» (USB). 2.5 pmol d'amorce antisens 1091 et 0.25 pmol d'ADN modifié au bisulfite dérivé des digestions PstI et PstI/HpaII ont été utilisés. Les nucléotides de terminaison (ddNTP) employés ont été marqués au 33 phosphore (Amersham Pharmacia Biotech). La migration de la séquence a été effectuée sur gel dénaturant 6% de polyacrylamide 19:1, lequel contenait 8 M d'urée.

2.2.3.4. Clonage et séquençage des produits de PCR bis2

L'autre portion des produits de PCR bis2 (digestions PstI et PstI/HpaII) a été utilisée pour le clonage. Préalablement à l'étape de phosphorylation, l'ADN a dû être réparé afin d'obtenir des fragments à bouts francs. Dans un volume de 100 μ l, l'ADN restant a été mis en présence de 0.1 mM de dCTP, dGTP, dATP et dTTP, 1 mM d'ATP, 1X de tampon T4 ADN polymérase, 10 U de T4 polynucléotide kinase (Life Technologies Inc.) ainsi que 5 U de T4 ADN polymérase (Life Technologies Inc.). La réaction a été incubée pendant 1 heure à 37°C. L'ADN a ensuite été purifié suivant les étapes décrites au protocole QIAEX II et quantifié sur gel d'agarose 1% à l'aide d'une échelle de poids moléculaire (Life Technologies Inc.). Pour le clonage, le vecteur bluescript (Stratagene) a dû être linéarisé par SmaI et déphosphorylé par l'enzyme CiP (*Calf intestinal phosphatase*) (Life Technologies Inc.). Pendant 4 heures, la réaction de ligation a été faite à température ambiante en présence d'environ 0.05 pmol de vecteur et d'environ 0.15 pmol de l'ADN du produit de PCR. En ce qui concerne la transformation,

le plasmide a été incorporé dans les bactéries compétentes *E. coli* DH5 α tel que décrit commercialement par Life Technologies Inc. Une fois transformées, les bactéries ont été étalées sur boîte de Petri et les colonies ont été repiquées dans du milieu LB pour les préparations plasmidiques (trousse commerciale Sigma). L'ADN plasmidique a été analysé par digestion BamHI+EcoRI, ceci permettant de libérer l'insert et de trouver des clones positifs. Sur gel d'agarose 1%, les clones positifs se présentent en 2 fragments: l'un de 2.9 Kb pour le vecteur et l'un de 504 pb pour le produit de PCR. Les clones positifs ont été séquencés en utilisant 1 μ l d'ADN plasmidique selon les paramètres décrits au protocole «Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit» (USB). Les conditions de PCR utilisées sont les suivantes: 35 cycles de 30 secondes à 95°C, 30 secondes à 50°C et 1 minute à 72°C. Les différences de méthylation ont été visualisées sur gel de polyacrylamide tel que décrit ci-haut.

Seuls les clones contenant de l'ADN provenant de la digestion PstI ont été séquencés lors de cette analyse.

2.3. RÉSULTATS

2.3.1. *Monozygosité et absence d'isodisomie paternelle*

Le génotypage des différents polymorphismes à l'étude sur les chromosomes 11, 7 et X permet de confirmer la monozygosité des jumelles I et II discordantes pour le BWS. Les figures 6 et 7 présentent des exemples de gels ayant permis l'analyse des polymorphismes au locus 11p15.5 et du gène *IGFBP3*.

Dans la région 11p15.5, les analyses de type RFLP et SSCP nous présentent des génotypes identiques pour les jumelles. En effet, pour tous les polymorphismes étudiés à ce locus, les allèles amplifiés chez la jumelle I atteinte sont les mêmes que les allèles amplifiés chez la jumelles II non atteinte. De plus, en tenant compte des analyses cytogénétiques (caryotype 46,XX), nos résultats nous permettent d'exclure toute LOH. Nous pouvons également exclure la présence d'UPD paternelle dans la région 11p15.5 (Tableau IV-A).

Bien que le génotypage d'*IGF2*, de *H19* et celui de *p57^{kip2}* ne soient pas informatifs, les analyses des gènes *INS* et *Hras* suffisent pour démontrer qu'il n'existe aucune perte de matériel chromosomique ou encore aucune duplication de matériel chromosomique paternel au niveau de la région 11p15.5. Nous observons clairement sur les gels de la figure 6Ac-B l'hétérozygosité des jumelles et la double provenance (maternelle et paternelle) de leurs allèles.

Aucune ambiguïté n'est notée en ce qui concerne le caractère identique du génome des jumelles lorsque nous considérons les génotypes obtenus pour les polymorphismes -185, -202 du gène *IGFBP3* (Fig. 7; Tableau IV-B) ainsi que pour ceux spécifiques au chromosome X (Tableau IV-C). Au locus d'*IGFBP3*, les jumelles possèdent des génotypes hétérozygotes tandis que leurs parents sont homozygotes pour différents polymorphismes. Pour le chromosome X, l'hétérozygosité des jumelles et les divergences alléliques des génomes parentaux apportent aussi une évidence quant au statut monozygotique des jumelles.

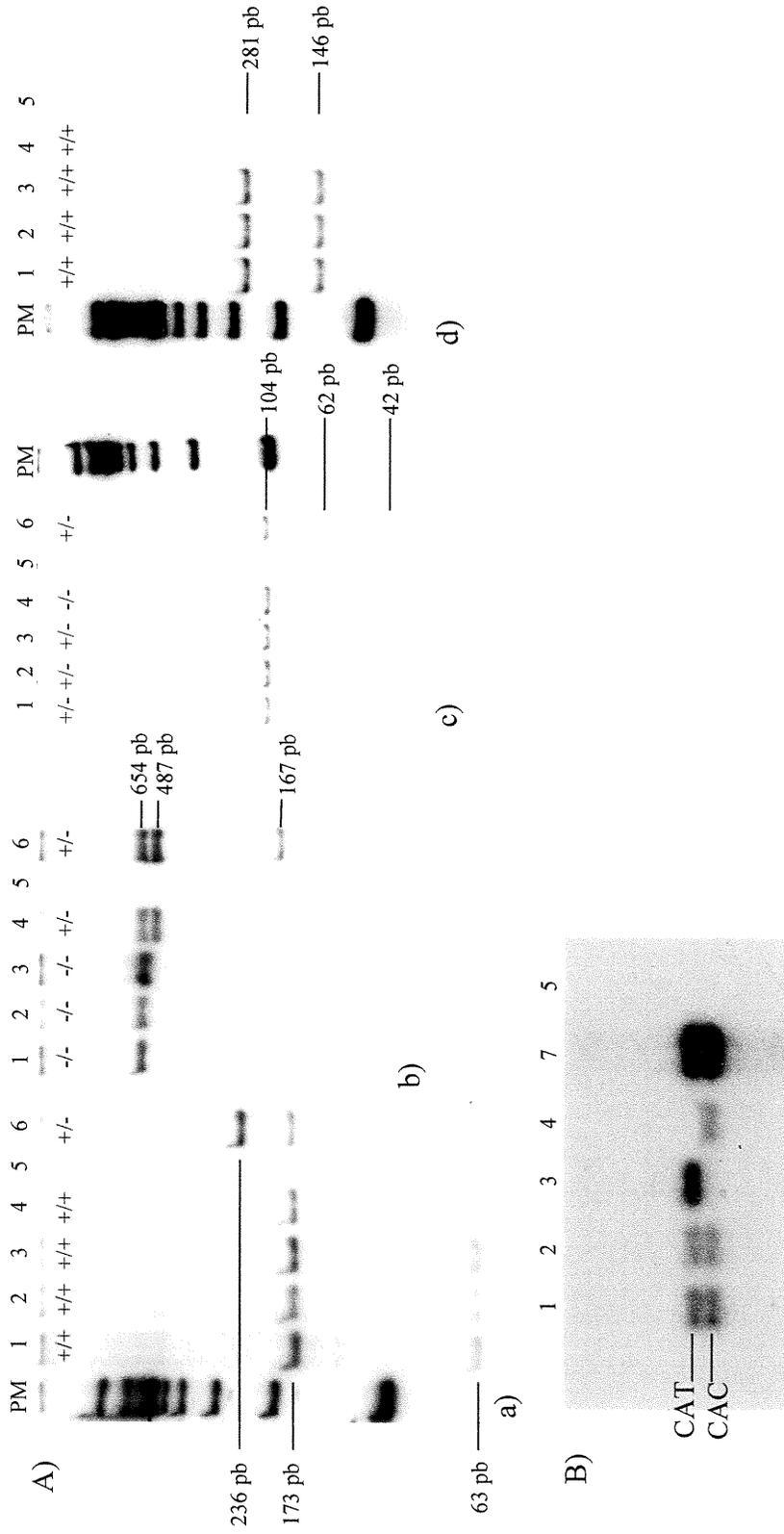


Figure 6: Génotypage des jumelles et de leurs parents au locus 11p15.5. A) Analyses de RFLP. a) *IGF2/ApaI*. b) *H19/RsaI*. c) *INS/PstI*. d) *p57^{kip2}/PvuII*. Les symboles + et - signifient qu'il y a respectivement coupure et non coupure du site polymorphique par l'enzyme de restriction. B) Analyse par SSCP du polymorphisme *Hras*. PM: échelle de poids moléculaires (100 pb); 1: Jumelle I atteinte du BWS; 2: Jumelle II non atteinte; 3: Mère; 4: Père; 5: Contrôle négatif; 6: Contrôle +/-; 7: Contrôle CAT/CAC.

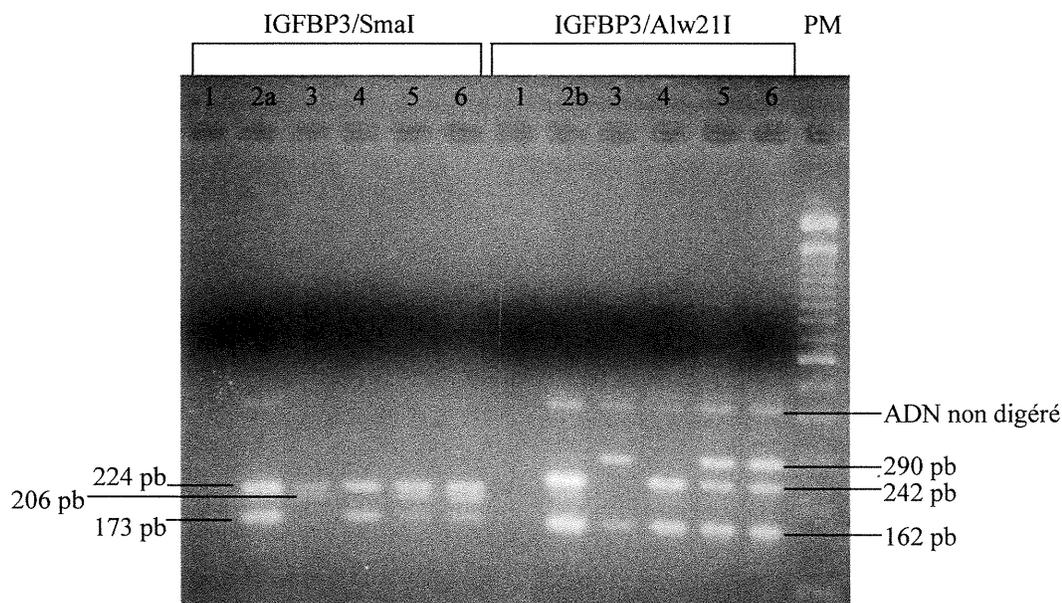


Figure 7: Génotypage des polymorphismes -185 et -202 du gène *IGFBP3*.
IGFBP3/SmaI: Étude du polymorphisme -185. Les fragments 173 et 224 pb indiquent un génotype C/C; les fragments 206 et 224 pb un génotype T/T; les fragments 173, 206 et 224 pb un génotype C/T. *IGFBP3/Alw21I*: Étude du polymorphisme -202. Les fragments de 162 et 290 pb indiquent un génotype C/C; les fragments 162 et 242 pb un génotype A/A, les fragments 162, 242 et 290 pb un génotype A/C. PM: échelle de poids moléculaires (100 pb); 1: Contrôle négatif; 2a: Contrôle C/C; 2b: Contrôle A/A; 3: père; 4: Mère; 5: Jumelle I atteinte du BWS; 6: Jumelle II non atteinte.

A)

| <i>(11p15.5)</i> | <i>Jumelle 1 - BWS</i> | <i>Jumelle 2 - non BWS</i> | <i>Mère</i> | <i>Père</i> |
|---------------------------|----------------------------|--------------------------------|-------------|-------------|
| <i>IGF2/ApaI (NI)</i> | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ |
| <i>H19/RsaI (NI)</i> | -/- | -/- | -/- | +/- |
| <i>INS/PstI</i> | +/- | +/- | +/- | -/- |
| <i>p57kip2/PvuII (NI)</i> | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ |
| <i>Hras</i> | CAT / CAC | CAT / CAC | CAT | CAC |

B)

| <i>Chromosome 7 IGFBP3</i> | <i>Jumelle 1 - BWS</i> | <i>Jumelle 2 - non BWS</i> | <i>Mère</i> | <i>Père</i> |
|--|----------------------------|--------------------------------|-------------|-------------|
| Polymorphisme -185 (SmaI) | C / T | C / T | C / C | T / T |
| Polymorphisme -202 (ALW21I) | A / C | A / C | A / A | C / C |

C)

| <i>Microsat. de l'X</i> | <i>Jumelle 1 - BWS</i> | <i>Jumelle 2 - non BWS</i> | <i>Mère</i> | <i>Père</i> |
|-------------------------|----------------------------|--------------------------------|-------------|-------------|
| DXS7100 | 1 / 2 | 1 / 2 | 1 / 3 | 2 |
| DXS1053 | 1 / 3 | 1 / 3 | 2 / 3 | 1 |
| DXS538 | 1 / 2 | 1 / 2 | 2 / 2 | 1 |
| DXS981 | 1 / 2 | 1 / 2 | 1 / 2 | 1 |
| DXS102 | 1 / 3 | 1 / 3 | 1 / 2 | 3 |

Tableau IV: Confirmation de la monozygoté des jumelles discordantes pour le BWS. Les jumelles sont identiques pour tous les sites polymorphiques analysés. A) Génotypage par RFLP (*IGF2*, *H19*, *INS*, *p57^{kip2}*) et par SSCP (*Hras*) au locus 11p15.5. NI: Non informatif. B) Génotypage par RFLP des sites polymorphiques -185 et -202 du gène *IGFBP3* sur le chromosome 7. C) Génotypage de microsatellites hautement polymorphiques spécifiques au chromosome X. Les chiffres (1-3) représentent par ordre croissant la taille allélique des fragments amplifiés.

2.3.2. Méthylation différentielle de la région bis2

L'investigation du statut de méthylation de la région bis2 située en 5' du promoteur de *H19* par la technique de séquençage au bisulfite a permis d'observer des différences de méthylation significatives entre les jumelles monozygotiques discordantes pour le BWS. En comparant la jumelle I atteinte à sa jumelle II non atteinte, nous constatons qu'elle présente, pour cette région bis2, des sites CpG anormalement méthylés. Le séquençage de leur ADNg effectué en début d'analyse suite à l'amplification par PCR permet d'étudier simultanément le profil de méthylation des deux allèles. Les résultats obtenus pour l'analyse de l'ADNg se trouvent à la première ligne des tableaux respectifs (Tableau V). Ces données laissent présumer qu'il existe des variations dans la méthylation des îlots CpG entre la jumelle I et II. En effet, la jumelle atteinte possède un plus grand nombre de sites bialléliquement méthylés (+) comparativement à sa jumelle non atteinte, laquelle présente plusieurs sites méthylés de manière monoallélique (+/-).

Le séquençage de multiples clones a permis de confirmer cette observation. Pour 14 des 15 clones séquencés pour la jumelle I atteinte, en moyenne 24 sites sur 27 sont méthylés. Pour la jumelle II, 12 clones ont été jusqu'à maintenant séquencés. De ces derniers, 5 présentent de la méthylation pour environ 26 sites alors que 7 clones ne sont méthylés qu'à 2 ou 3 sites seulement. La figure 8 illustre un exemple des différences de méthylation observées pour les sites 16 à 22 chez la jumelles I (clones 53-54-55) et la jumelle II (clones 65-70). La détection d'une cytosine à la position des îlots CpG indique la présence de méthylation tandis que la transformation de la cytosine en thymine indique qu'il y a absence de méthylation. Des 27 sites étudiés, deux (#8 et 26) sont des sites polymorphiques C/T. Certains sites, par exemple #23 et 24, sont généralement méthylés pour la majorité des clones et ce, indépendamment de la patiente (Tableau V; Fig. 9).

En considérant le pourcentage de clones méthylés obtenu pour chacun des sites à l'étude, nous voyons que le degré de méthylation de la région bis2 propre à la jumelle I-BWS est supérieur à celui de la jumelle II (Fig. 9). Pour la jumelle II, le degré de méthylation moyen est d'environ 40% alors que celui de la jumelle I se situe

| CpG | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | | | |
|------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|----|-----|----|----|----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|
| Jumelle I (BWS) ADN g | n.d | + | + | + | + | +/- | + | + | + | +/- | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | T | +/- |
| clone 1 | n.d | + | + | + | + | + | + | T | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | n.d | n.d | |
| clone 4 | n.d | + | + | + | + | + | + | T | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | n.d | n.d | |
| clone 6 | n.d | + | + | + | + | + | + | T | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | n.d | n.d | |
| clone 7 | n.d | - | - | - | - | - | - | T | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | n.d | n.d | | |
| clone 11 | n.d | + | + | + | - | + | + | T | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | n.d | n.d | |
| clone 16 | n.d | + | + | + | + | + | + | T | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | n.d | n.d | |
| clone 19 | + | + | + | + | - | + | + | T | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | n.d | n.d | |
| clone 43 | + | + | + | + | + | + | + | T | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | T | + | |
| clone 44 | + | + | + | + | + | + | + | T | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | T | + | |
| clone 43 | + | + | + | + | + | + | + | T | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | T | + | |
| clone 48 | + | + | + | + | + | + | + | T | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | T | + | |
| clone 51 | + | + | + | + | + | + | + | T | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | T | + | |
| clone 53 | + | + | + | + | + | + | + | T | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | T | + | |
| clone 54 | + | + | + | + | + | + | + | T | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | T | + | |
| clone 55 | + | + | + | + | + | + | + | T | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | T | + | |
| Jumelle I: somme + | | 14 | 14 | 14 | 12 | 14 | 14 | T | 14 | 14 | 14 | 14 | 15 | 14 | 14 | 14 | 14 | 6 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | T | 8 | | |
| Jumelle I: somme - | | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 | | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 9 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | 0 | | |

| CpG | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | | |
|-------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|
| Jumelle II ADN g | n.d | +/- | +/- | + | + | +/- | + | +/- | +/- | +/- | +/- | +/- | +/- | + | + | + | + | + | T | +/- | |
| clone 1 | n.d | - | - | - | - | - | - | n.d | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | n.d | n.d | |
| clone 11 | n.d | - | - | - | - | - | - | n.d | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | n.d | n.d | |
| clone 22 | n.d | - | - | - | - | - | - | n.d | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | n.d | n.d |
| clone 25 | + | + | + | + | + | + | + | T | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | T | + |
| clone 27 | + | + | + | + | + | + | + | T | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | T | + |
| clone 29 | + | + | + | + | + | + | + | T | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | T | + |
| clone 32 | + | + | + | + | + | + | + | T | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | T | + |
| clone 41 | n.d | + | + | + | + | + | + | T | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | T | + |
| clone 70 | - | - | - | - | - | - | - | T | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | T | - |
| clone 65 | - | - | - | - | - | - | - | T | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | T | - |
| clone 69 | - | - | - | - | - | - | - | T | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | T | - |
| clone 72 | - | - | - | - | - | - | - | T | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | T | + |
| Jumelle II: somme + | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | T | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 6 | 12 | 11 | 8 | T | 6 | |
| Jumelle II: somme - | 4 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 6 | 0 | 1 | 4 | | 3 | |

Tableau V: Analyse des différences de méthylation des sites de la région bis2 en 5' du promoteur *H19* effectuée sur l'ADNg et sur plusieurs clones chez les jumelles monozygotiques discordantes pour le BWS. La jumelle I atteinte possède un statut d'hyperméthylation comparée à sa jumelle II non atteinte. Les chiffres de 1 à 27 représentent les différents sites CpG de la région bis2. n.d: non déterminé; +: site méthylé; -: site non méthylé; T: site polymorphe.

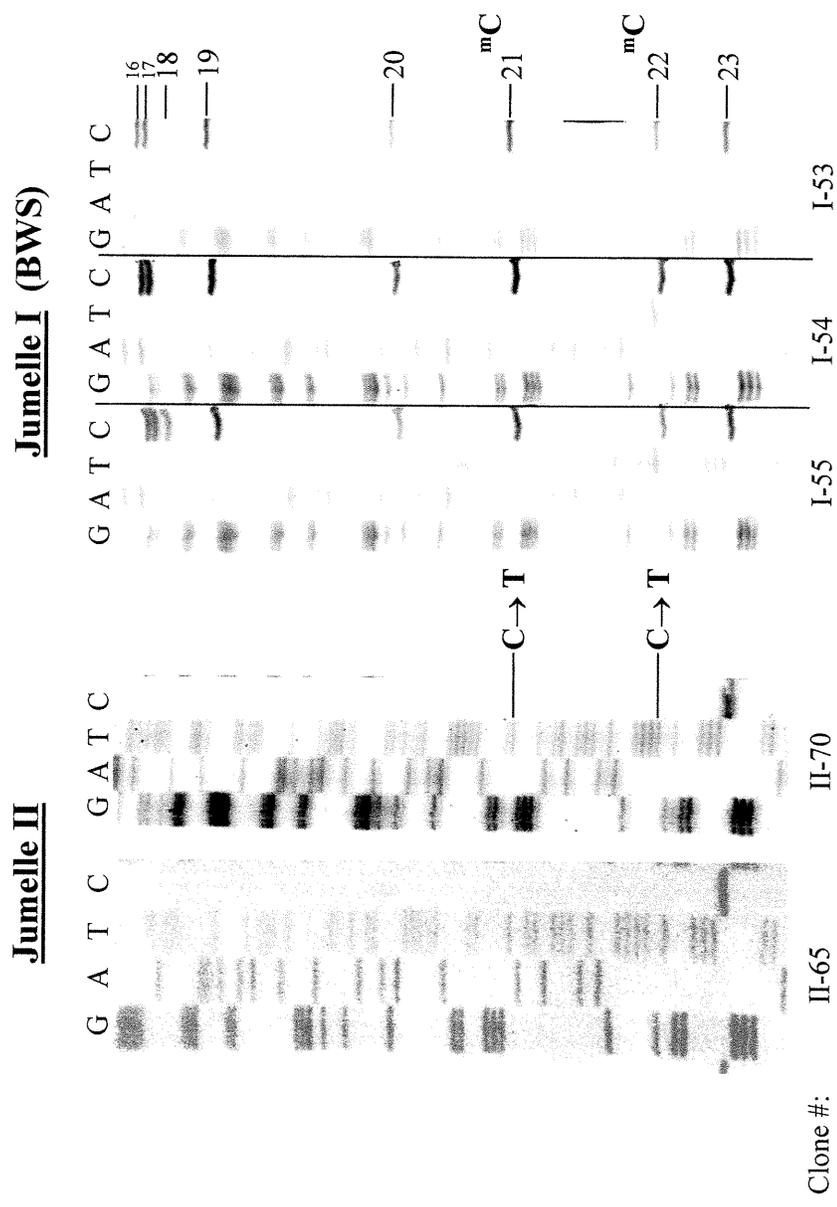


Figure 8: Comparaison de la méthylation des sites 16 à 23 de la région bis2 chez la jumelle I atteinte et la jumelle II non atteinte. Les sites 16 à 22 sont seulement méthylés chez la jumelle I. Le site 23 est méthylé chez les jumelle I et II. C→T: Cytosine non méthylée transformée en thymine; ^mC: Cytosine méthylée.

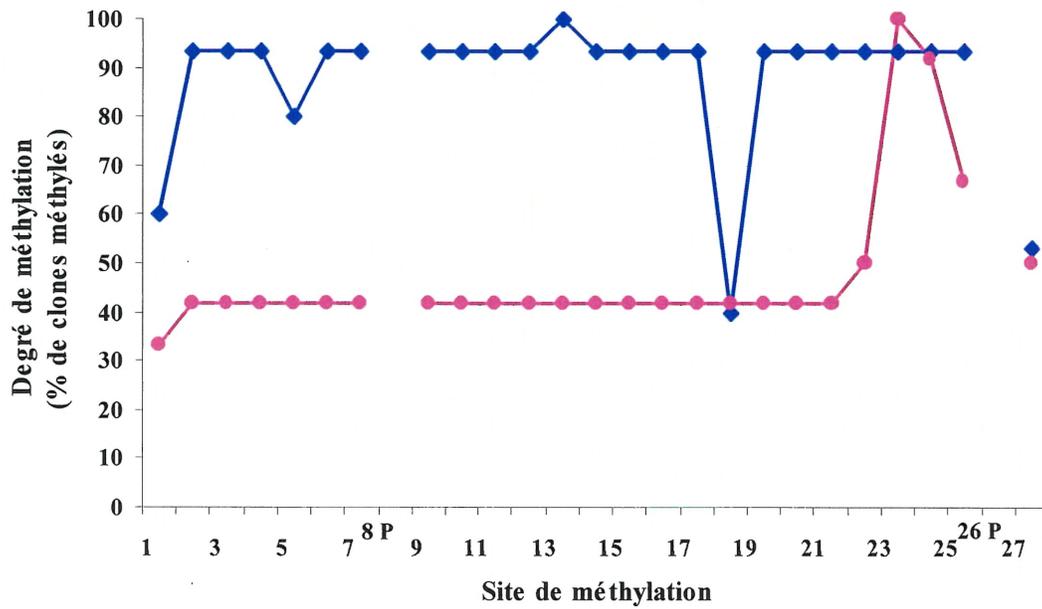


Figure 9: Hyperméthylation du centre de contrôle BWSIC1 chez la jumelle atteinte du BWS. Le degré de méthylation indique le pourcentage de clones méthylés retrouvé dans l'échantillon de clones analysés pour la jumelle I-BWS (n=15) et la jumelle II (n=12) à chacun des 25 îlots CpG pouvant être différemment méthylés. Les sites #8 et 26 présentent un polymorphisme C/T. —◆— : Jumelle I; —●— : Jumelle II; P: Site polymorphique.

approximativement entre 90-95%. Cependant, il semble que certains sites ne suivent pas cette tendance (e.g., #18). L'hyperméthylation du centre de contrôle BWSIC1 chez la jumelle I atteinte du BWS suggère la présence d'une perte potentielle d'empreinte génomique (se référer à la discussion).

2.4. DISCUSSION

Ces travaux ont permis de mettre en évidence l'absence d'UPD paternelle et la présence d'altérations épigénétiques spécifiques au centre de contrôle de l'empreinte BWSIC1 chez des jumelles MZ discordantes pour le BWS. La littérature rapporte fréquemment l'existence de ces phénomènes moléculaires pour expliquer l'étiologie du BWS chez des patients sporadiques, mais aucun de ces phénomènes n'est décrit dans le but d'expliquer les divergences phénotypiques observées dans les cas de jumeaux MZ discordants.

2.4.1. *Caractère MZ des jumelles discordantes pour le BWS*

Les jumelles que nous venons d'étudier constituent la 16^e paire de jumelles MZ discordantes pour le BWS en tenant compte de celles décrites dans la littérature. L'identité des génotypes obtenus suite à l'analyse de plusieurs variantes polymorphiques distribuées dans le génome nous ont permis d'appuyer les observations histopathologiques préalablement effectuées à la naissance sur le placenta. La présence de membranes monochorionique et diamniotique assigne aux jumelles un caractère MZ. (Keith et Machin, 1997). Toutefois, il faut prendre en considération que l'une des limites expérimentales imposées lors de situations de monozygotie nous vient du fait que 70% des jumeaux MZ partagent la même circulation sanguine lors de la grossesse. Ce phénomène pourrait faire en sorte qu'il est difficile de révéler les divergences génotypiques (Hall, 1996). Les mêmes analyses effectuées sur l'ADNg isolé à partir d'autres tissus tels des fibroblastes pourraient nous fournir cette précision, mais il demeure souvent difficile d'obtenir ce type de prélèvements. Nous pensons tout de même que la grande sensibilité de la technique utilisée nous permet de soutenir notre conclusion. En effet, lors du génotypage, du moins pour les microsatellites hautement polymorphiques spécifiques à l'X, un caractère dizygotique des jumelles se serait plutôt manifesté en ce qui concerne leurs patrons alléliques comme un phénomène de

mosaïcisme (i.e., plus de deux allèles visibles). Selon nous, la discordance pour le BWS n'est pas due à la non MZ de ces dernières.

2.4.2. *Absence d'UPD*

Notre investigation génotypique au locus 11p15.5 est en faveur d'une contribution chromosomique biparentale. Le caractère informatif du polymorphisme PstI de l'*INS* et celui spécifique au gène *Hras*, lesquels sont situés de part et d'autre des gènes *IGF2* et *H19*, nous permettent d'exclure l'UPD paternelle et la LOH comme éléments causatifs de l'incidence du syndrome chez la jumelle I atteinte. En considérant que le risque de retrouver des tumeurs de Wilms est fréquemment associé à la manifestation de l'UPD chez les patients BWS (Henry *et al.*, 1993), nos résultats moléculaires pourraient suggérer que cette patiente BWS est potentiellement moins à risque (âge actuelle: 4 ans et 8 mois; jusqu'ici aucune évidence clinique de tumeurs). Nos résultats appuient également les observations cytogénétiques ayant démontré un caryotype 46,XX normal (i.e., absence de trisomie 11) pour les jumelles. De plus, aucune hémihypertrophie n'a été décrite cliniquement pour la jumelle I, ce qui est en accord avec les corrélations préalablement rapportées (Schneid *et al.*, 1993; Catchpole *et al.*, 1997). En effet, les patients BWS présentant ce trait phénotypique sont généralement associés moléculairement à l'UPD paternelle et à la présence de mosaïcisme. Ainsi, l'absence d'UPD pour la jumelle I atteinte nous permet de mettre de côté l'hypothèse d'une perte d'empreinte causée par une contribution allélique parentale non équivalente. Toutefois, il faut souligner que certains organes (e.g., reins, foie) de la jumelle I sont hypertrophiés. La limite expérimentale que nous impose l'utilisation de l'ADNg leucocytaire nous oblige à ne pas négliger la présence potentielle d'une UPD en 11p15.5 dans ces tissus.

2.4.3 Défauts de méthylation au centre de contrôle BWSIC1

L'utilisation de la technique de séquençage au bisulfite nous a permis de procéder aisément à l'étude des différences de méthylation pour de multiples îlots CpG au site BWSIC1. Nous avons mis en évidence chez la jumelle I atteinte, par comparaison à sa jumelle II non atteinte, un nombre plus important de clones méthylés que de clones non méthylés. Pour une expression monoallélique, nous nous attendons à avoir 50% de clones méthylés (allèle qui n'exprime pas *H19*) et 50% de clones non méthylés. Puisque nous avons trouvé que 95% des clones provenant de la jumelle atteinte étaient méthylés, nous sommes en mesure d'affirmer que la région DMR de *H19* chez la jumelle atteinte est hyperméthylée, c'est-à-dire que le profil de méthylation au centre BWSIC1 se retrouve de manière anormale, bialléliquement méthylée (Fig. 9). Inversement, la jumelle II non atteinte présente un ratio de clones méthylés/non méthylés d'environ 1:1, soit une méthylation allélique légèrement inférieure à 50% (environ 43% de clones méthylés) (Fig. 9). Cette constatation est le reflet du profil de méthylation observé en situation normale. En effet, cette région située en amont de *H19*, laquelle constitue l'élément clef de la régulation de l'empreinte génomique de ce gène, est caractérisée par une méthylation monoallélique paternelle (Maher et Reik, 2000). L'altération spécifique au centre BWSIC1 est observée dans environ 5 à 10% des cas BWS non UPD. Par conséquent, nos résultats démontrent clairement la présence, entre les jumelles à l'étude, d'une discordance spécifiquement liée aux profils de méthylation de *H19*.

Nous savons que l'hyperméthylation de la région bis2 localisée au niveau du centre BWSIC1 est associée à l'inhibition de l'expression de *H19* ainsi qu'à l'expression biallélique d'*IGF2* (Catchpoole *et al.*, 1997). Ainsi, pour la jumelle I atteinte, nous déduisons que l'hyperméthylation observée révèle la manifestation d'une LOI d'*IGF2* associée à un double dosage de ce dernier. Cette anomalie moléculaire entraînerait par le fait même la croissance excessive rencontrée majoritairement dans ce syndrome. Les traits phénotypiques tels que la croissance prénatale excessive, le polyhydramnios et la macroglossie décrits chez la jumelle I sont également en accord avec ce qui est observé dans le modèle murin de surexpression d'*Igf2* de Sun *et al.* (Sun *et al.*, 1997). L'absence

de ces stigmates chez la jumelle II soutient l'implication d'anomalies épigénétiques en BWSIC1 dans l'étiologie de la discordance.

De plus, il est intéressant de constater par l'intermédiaire de nos observations que certains îlots CpG dérogent de cette tendance de méthylation différentielle (Fig. 9). Ainsi, nous pouvons penser que ces îlots ne possèdent pas de fonction essentielle dans la régulation de l'empreinte.

Bien que la mise en évidence de l'hyperméthylation de *H19* ainsi que la description phénotypique nous permettent d'affirmer que la manifestation du BWS chez notre jumelle atteinte dépend d'un défaut au centre de contrôle de l'empreinte BWSIC1, nous ne pouvons pas négliger la possibilité de trouver des discordances au niveau des autres éléments régulateurs de l'empreinte présents au locus 11p15.5 (e.g., défaut au centre BWSIC2). En réalité, la présence d'omphalocèle rapportée chez la jumelle I nous laisse perplexe puisque toutes les études documentées jusqu'à maintenant ne rapportent pas de corrélation significative entre cette caractéristique phénotypique et l'hyperméthylation de *H19* (Lam *et al.*, 1999; Engel *et al.*, 2000; Gaston *et al.*, 2001). Cependant, il a été récemment démontré que l'*IGF2* peut diminuer l'expression de *p57^{KIP2}* (Grandjean *et al.*, 2000). Puisque des mutations dans ce dernier peuvent être associées à l'omphalocèle, nous émettons l'hypothèse que notre patiente a été soumise indirectement (via une augmentation d'*IGF2*) à une diminution de *p57^{KIP2}* lors d'un moment prénatal critique impliqué dans la fermeture des parois abdominales.

2.4.4. Pertinence clinique d'une hyperméthylation de *H19*

Les enfants affectés par le BWS ont une susceptibilité accrue au développement de tumeurs embryonnaires, surtout des tumeurs de Wilms. Récemment, l'équipe de Bliiek *et al.* a démontré l'existence de corrélations significatives entre l'incidence plus élevée de tumorigénécité et les profils aberrants de méthylation pour *H19* (Bliiek *et al.*, 2001). L'hyperméthylation de *H19* que nous retrouvons de façon distincte dans les situations de défauts du centre BWSIC1 ainsi que lors de la présence d'UPD (deux

allèles paternels donc méthylation biallélique) semble donc spécifiquement liée au risque de développer des tumeurs dans le BWS. Cette dernière manifestation ne s'avère pas exacte lorsque des défauts épigénétiques sont rencontrés au centre BWSIC2 (LOM de *LIT1*). Ceci indique l'existence d'un gène de suppression tumorale dans la région avoisinant BWSIC1. *H19* pourrait très bien être ce gène candidat. D'ailleurs, la répression de *H19* par la méthylation a déjà été démontrée dans les tumeurs de Wilms (Dao *et al.*, 1999).

Par conséquent, nous soutenons que le suivi clinique de la jumelle I atteinte du BWS (ou de tout autre patient) est d'une importance majeure dans l'investigation du développement tumoral étant donné son appartenance au groupe de patients BWS affectés par des altérations en BWSIC1. L'absence d'UPD n'est pas suffisante pour exclure la manifestation de tumeurs embryonnaires.

2.4.5. Étiologie des défauts de méthylation

Deux paramètres pouvant apporter une explication quant à l'origine des défauts de méthylation retrouvés chez notre patiente méritent d'être discutés: mentionnons un événement environnemental local se limitant à la jumelle affectée ainsi qu'une mutation somatique *de novo* ayant eu lieu après la fécondation et la formation du blastocyste. Il a déjà été proposé par Machin que la division inégale de la masse cellulaire interne (bouton embryonnaire) puisse engendrer des défauts subséquents du développement compte tenu du nombre différent de cellules. Par conséquent, les apports nutritifs, l'exposition aux toxines environnementales et la stimulation hormonale via la circulation placentaire peuvent être plus importants, proportionnellement parlant, dans la situation où le fœtus reçoit moins de cellules au départ. Il est donc théoriquement possible, mais difficilement envisageable que l'environnement fœto-placentaire ait pu différer d'un fœtus à l'autre sans affecter plusieurs loci (e.g., volumes différents des réserves de groupements méthyles). De façon similaire, il nous semble peu probable que des mutations propres aux enzymes responsables de la mise en place de la méthylation allélique spécifique puissent être en cause dans la discordance phénotypique observée

chez nos jumelles. Dans de pareils cas, nous nous attendrions plutôt à un phénotype plus sévère, i.e., ne présentant pas uniquement les traits BWS (e.g., traits phénotypiques du PWS/AS étant donné la participation des mêmes enzymes à la mise en place de la méthylation dans la région 15q11-q13). Cependant, nous ne pouvons pas exclure la présence de mutations somatiques, dans les régions voisines du BWSIC1 par exemple, pouvant participer au maintien de la conformation de la chromatine et donc à l'accès du BWSIC1 aux méthylases. Puisque nous ne pouvons pas savoir où se situent de telles mutations, le séquençage de tout le locus 11p15.5 demeure présentement difficilement réalisable.

2.4.6 Perspectives expérimentales

Nous avons discuté des points qui ont permis d'exclure l'appartenance de la jumelle I atteinte au sous-groupe de patients sporadiques présentant une UPD paternelle. Par le fait même, la démonstration de la présence d'altérations de méthylation au centre BWSIC1 laisse envisager une appartenance aux 70 à 85% de patients dont l'étiologie n'est pas encore définie. De plus, nous ne pouvons pas ignorer le pourcentage élevé de patients BWS qui constituent le groupe caractérisé par des défauts au centre BWSIC2 (Tableau III), d'autant plus que notre jumelle I atteinte présente un omphalocèle. Ainsi, la corrélation existante d'une part entre la présence d'omphalocèle et les mutations connues du gène $p57^{KIP2}$ et d'autre part avec les altérations de méthylation de KvDMR1 au site du centre de contrôle de l'empreinte BWSIC2 nous pousse à poursuivre une investigation mutationnelle et épigénétique (Lam *et al.*, 1999; Engel *et al.*, 2000; Gaston *et al.*, 2001). Il sera essentiel de séquencer le gène $p57^{KIP2}$ et de poursuivre des analyses de méthylation au centre BWSIC2.

Finalement, sachant que l'hyperméthylation du BWSIC1 est associée à une répression de *H19* ainsi qu'à une perte d'empreinte d'*IGF2* et donc à son expression biallélique, nous voulons dans un futur proche analyser l'expression d'*IGF2* afin de déterminer expérimentalement s'il y a bel et bien une LOI d'*IGF2*. La procédure

envisagée est d'évaluer quantitativement les niveaux d'ARN d'*IGF2* au moyen de sources tissulaires telles les fibroblastes et les cellules de l'épithélium buccal et ce, afin de limiter les biais associés aux analyses effectuées à partir du sang périphérique.

En terminant, nous avons présenté les premières évidences moléculaires en lien avec la discordance d'une paire de jumelles MZ pour le BWS. Cette étude suggère que des modifications épigénétiques spécifiques au centre de contrôle BWSIC1 peuvent être responsables de la discordance observée chez ces enfants génétiquement identiques.

CHAPITRE 3

**EMPREINTE GÉNOMIQUE ET
SYNDROME DE TURNER**

3.1. REVUE DE LITTÉRATURE

La compréhension des bases moléculaires associées au Syndrome de Turner constitue le second champ d'intérêt de ce mémoire. Les expériences visant à étudier l'implication de l'empreinte génomique dans l'étiologie du TS ne sont encore qu'à leur tout début. Puisque le Syndrome de Turner représente une prévalence de 1:2 500 filles nées (Gravholt *et al.*, 1996; Ross *et al.*, 1997; Gicquel *et al.*, 1998), qu'il implique des problèmes cliniques majeurs incluant une très petite taille et l'infertilité, l'étude de cette condition est importante pour notre compréhension de la croissance et de la différenciation sexuelle.

3.1.1. *Caractérisation clinique du TS*

3.1.1.1. *Généralités*

Le Syndrome de Turner a été décrit cliniquement pour la première fois en 1938 par le Dr Henry Turner. En 1959, le patron chromosomique typique du TS, soit le caryotype 45,X, était confirmé (Ford *et al.*, 1959). Le TS constitue de loin l'unique forme monosomique viable; plus de 99% de toutes les conceptions 45,X ne parviennent pas à terme (Jacobs *et al.*, 1990; Chu et Connor, 1995). Par ailleurs, plusieurs études ont démontré que ce syndrome était caractérisé tant par sa variabilité phénotypique que génotypique (monosomie complète, réarrangements structuraux de l'X et mosaïcisme).

Une panoplie de caractères physiques peut décrire le phénotype des filles atteintes du TS. La petite stature et la présence d'une dysgénésie gonadique, entraînant un infantilisme sexuel et une infertilité secondaire, sont les traits retrouvés dans respectivement 100% et 95% des cas. Parmi les particularités fréquentes, notons les troubles d'obstruction du système lymphatique (<50% des cas): le lymphœdème des mains et des pieds, la palmure cervicale et l'implantation basse des cheveux (Rovet, 1992; Donaldson, 1998; Truesdell *et al.*, 1998). La croissance du squelette (40-60% des cas) peut également être affectée, causant le développement d'un thorax en tonneau et d'un écartement des mamelons, d'un cubitus valgus et d'anomalies craniofaciales

(micrognathie et palais ogival) (Rovet, 1992; Donaldson, 1998; Truesdell *et al.*, 1998). D'autres anomalies peuvent être observées à des fréquences variables telles les infections chroniques de l'oreille moyenne, la perte auditive conductive et neurosensorielle (53%), la coarctation de l'aorte et d'autres anomalies cardiovasculaires (55%), les anomalies rénales (39%) en plus d'une abondance de nævi pigmentaires (26%) (Rovet, 1992; Donaldson, 1998; Truesdell *et al.*, 1998). De plus, nous retrouvons dans cette population de patientes des risques relativement élevés de morbidité et de mortalité (Gravholt *et al.*, 1998). En effet, les maladies cardiovasculaires congénitales ou acquises (souvent associées à une hypertension) sont de loin la cause principale de morbidité suivie des anomalies affectant le système rénal (Nathwani *et al.*, 2000).

En ce qui a trait aux carences intellectuelles, les filles atteintes possèdent généralement une intelligence normale, même si leur niveau de quotient intellectuel (QI) global se trouve légèrement au-dessous de la norme (Rovet, 1992). Cette divergence découle spécifiquement d'un déficit sélectif dans le traitement de l'information visuo-spatiale (e.g., problèmes d'organisation spatiale, de reproduction visuelle, de mémoire visuelle), mais n'affecte en rien l'incidence de déficience mentale (QI de performance: filles TS: 88.7; groupe témoin: 103.8). Aussi, leurs habiletés verbales sont relativement intactes (QI verbal: filles TS: 100.5; groupe témoin: 104.0). Toutefois, une étude récente révèle que les filles atteintes du TS éprouvent une insuffisance motrice générale significative (Nijhuis-van der Sanden *et al.*, 2000). Il n'existe aucune corrélation significative entre les résultats obtenus aux tests évaluant l'intelligence et ceux des tests mesurant les performances motrices. Il semble qu'il ne peut y avoir d'interdépendance entre les troubles moteurs et les problèmes de cognition.

Néanmoins, retenons que l'incidence et la gravité de tous ces traits phénotypiques peuvent varier considérablement et prendre différentes combinaisons d'une patiente Turner à l'autre et ce, que ce soit pour un même caryotype ou pour des caryotypes différents.

3.1.1.2. Courte taille: Pertinence du traitement à l'hormone de croissance

Le défaut de croissance (non associé à une déficience en hormone de croissance (GH)), lequel conduit à une courte taille adulte, est le trait phénotypique le plus fréquent dans le TS. Il se manifeste très tôt dans l'enfance (taille moyenne en SDS: -0.5 à la naissance, -1.5 après la première année de vie) et est causé par un retard de croissance *in utero* modéré, par un ralentissement de la croissance pendant la petite enfance, par un retard dans l'amorce des composantes de la croissance infantile ainsi que par une croissance ralentie pendant l'enfance (Davenport *et al.*, 1999). Selon la courbe de croissance établie par Lyon *et al.* (Lyon *et al.*, 1985), nous constatons que la taille adulte moyenne d'une femme atteinte (144 cm) se situe environ 20 cm au-dessous de la taille adulte moyenne d'une femme non atteinte (164 cm).

Afin d'augmenter la taille adulte chez les patientes atteintes du TS, un traitement à la GH est disponible depuis les années 1980. Les observations, découlant d'études antérieures, démontrent que le traitement à la GH induit une augmentation de la vélocité de croissance, laquelle résulte en un gain moyen de la taille finale des filles atteintes du TS. Bien que des groupes rapportent des gains plutôt limités (Van den Broeck *et al.*, 1995) et que d'autres études révèlent des gains relativement importants (Rosenfeld *et al.*, 1998; Preece et Moore, 2000), tous s'entendent pour dire que le gain de taille attendu est très variable et peut se situer entre 0 et 13 cm. Notre équipe et d'autres centres ont démontré que 30 à 50% des patientes traitées à la GH atteignaient une taille adulte égale ou inférieure à la taille préalablement prédite (Taback *et al.*, 1996; Dacou-Voutetakis *et al.*, 1998). Une méta-analyse récente évaluant l'effet du traitement à la GH sur la taille adulte des patientes Turner a démontré que la chance d'atteindre une taille adulte de 7.5 cm au-dessus de la taille prédite est de 32% ($p < 0.00001$) lorsque le traitement est initié entre l'âge de 5 et 9.99 ans (Taback, 2001).

Les mécanismes expliquant la variabilité de la réponse au traitement à la GH ne sont toutefois pas connus, mais plusieurs facteurs influencent la croissance et la taille adulte des Turnériennes tels l'origine ethnique et la taille des parents (Rochiccioli *et al.*, 1994; Taback et Van Vliet, 1995). D'autres hypothèses ont été émises pour tenter

d'expliquer la variabilité de la réponse au traitement à la GH en prenant en considération les paramètres tels que le degré de mosaïcisme, le poids à la naissance, les diverses malformations associées, le caryotype particulier (45,X versus 46,X,del(Xp), la fonction gonadique préservée (e.g., les filles possédant un caryotype X,i(Xq) peuvent entrer spontanément en puberté), l'âge au moment du début du traitement, le choix du type d'hormonothérapie dans l'induction de la puberté ainsi que l'origine parentale du chromosome X intact (Taback et Van Vliet, 1995).

Ainsi, face à cette énorme variabilité de facteurs et considérant que le traitement entraîne des coûts exorbitants (selon l'âge, 15 000 à 30 000 \$ par année de traitement), l'individualisation et l'optimisation du traitement sont indispensables.

3.1.2. *Génétique*

3.1.2.1. *Variabilité caryotypique et mosaïcisme*

Tout un répertoire d'anomalies chromosomiques de l'X peut définir le TS. Bien que des études initiales documentent l'incidence du caryotype 45,X dans 40 à 60% des cas, la fréquence de la monosomie semble être surestimée (Binder *et al.*, 1995; Lopez *et al.*, 1998). En effet, plusieurs analyses mettent en évidence la prépondérance d'une variabilité d'anomalies chromosomiques telles les délétions du bras court (46,X,del(Xp)) et du bras long (46,X,del(Xq)), l'isochromosomie (46,X,i(Xq)) ainsi que l'organisation chromosomique en anneau (46,X,r(X)) ou encore le mosaïcisme. Ce dernier se définit par la présence, chez un même individu, de deux ou plusieurs populations de cellules différentes par leur constitution caryotypique (45,X/46,XX; 45,X/46,X,i(Xq); etc.) (Tableau VI). Cette constatation reflète probablement le fait que le diagnostic est maintenant plus souvent recherché chez des filles moins sévèrement atteintes (e.g., fille avec courte taille inexplicée, sans autre manifestation). Le mosaïcisme de type 45,X/46,XX décrit la forme la plus fréquente. Celui où nous retrouvons simultanément une monosomie et une isochromosomie Xq constitue la formule chromosomique observée dans 15% des cas. Mentionnons qu'il est également possible de rencontrer un

| <u>Références</u> | <u>n</u> | <u>Critères d'inclusion</u> | <u>Techniques</u> | <u>Marqueurs</u> | <u>%Y</u> |
|--|---|--|---------------------------|--|--|
| Mendes et al. (1999) | 36 -45,X (15) -46,X,i(Xq) (2) -Mosaïcisme (19) | -Phénotype féminin -Perte partielle, complète ou anomalies structurales de l'X | -PCR | -SRY -ZFY -DYZ ₃ (centromérique) Yp | 2/36 (5,6%) -45,X -45,X/46,X,r(X ou Y) |
| Martinez-Pasarell et al. (1999) | 14 -45,X | - Stigmates typiques du TS | -PCR | -SRY -DYZ ₃ -DYZ ₁ | 1/14 (7%) |
| Osipova et al. (1998) | 13 -45,X (8) -46,X + mar. (2) -Mosaïcisme (3) | -12 filles avec traits du TS -1 garçon avec traits du TS | -Multiplex PCR | -SRY -AMGLY (or AMGL) | 4/13 (30,8%) -45,X (1) -45,X/46,XX (1) -46,X + mar (2) |
| Patsalis et al. (1998) | 50 -45,X (21) -Anomalies Structurales (7) -Mosaïcisme (16) -SMC (6) | -Petite stature, -Dysgénésie gonadique | -PCR imbriqué+Southern | -SRY -TSPY -RBM -STSs (9) -Yc-2 (centromérique) | 12/50 (24%) -45,X (5) -45,X/46,XX,del(X)q (1) -46,XX/46,X + mar (1) -46,X + mar (2) -45,X/46,X + mar (2) -45,X/47,XX + mar (1) |
| López et al. (1998) | 50 (Mexicain) -45,X (36) -Mosaïcisme (14) | -Petite stature -Dysgénésie gonadique | -FISH -PCR+Southern | -Ycen -ZFY -SRY -Yqh (région hétérochromatidique) | 6/50 (12%) -45,X (4) -45,X/46,X + mar (2) |
| Nakagawa et al. (1996) | 11 (Japonais) -45,X (3) -Mosaïcisme (8) | -Petite stature -Stigmates typiques du TS | -PCR+Southern | -SRY -AMGL -DYZ ₃ (centromérique) -DYS1 -DYZ ₁ -DYS139 -DYS132 Yp Yq | 10/11 (91%) -45,X (3) -45,X/46,X,r (X) (2) -45,X/46,X,i(Xq) (2) -45,X/46,X + mar (1) -45,X/47,XXX (2) |
| Coto et al. (1995) | 18 -45,X (15) -45,X/46,X + mar (3) | -Stigmates typiques du TS -Anomalies génitales externes avec masculinisation | -PCR | -SRY -DYZ ₃ -DYZ ₁ -PABY (télomérique) | 11/18 (61%) -45,X (8) -45,X/46,X + mar (3) |
| Binder et al. (1995) | 53 -45,X (30) -Mosaïcisme (20) -Anomalies structurales (3) | -Phénotype féminin -Petite stature -Défaut ou manque de maturation sexuelle -Perte partielle, complète ou anomalies structurales de l'X - Stigmates typiques du TS | -PCR imbriqué+Southern | -SRY -TSPY -DYZ ₃ | 2/53 (3,8%) -45,X -46,Xi(Xq) |
| Kocova et al. (1993) | 18 | - Stigmates typiques du TS | -PCR+Southern | -SRY -DYZ ₃ | 6/18 (33%) |

Tableau VI: Résumé d'études portant sur la prévalence du chromosome Y cryptique et du mosaïcisme dans le TS.

individu dont le mosaïcisme est caractérisé par plus de deux lignées cellulaires différentes (Grumbach et Conte, 1992). Nous ne connaissons pas réellement les causes de la perte de matériel chromosomique. Toutefois, l'apparition d'une monosomie complète peut survenir au moment de la méiose I ou II suite à une non-disjonction lors de la spermatogenèse ou de l'ovogenèse. De telles erreurs de ségrégation au niveau des chromosomes sexuels produiront des gamètes sans aucune copie du chromosome X (ou copie de l'Y) (Brock, 1993). Quant à elle, une non-disjonction mitotique engendrera des caryotypes en mosaïque. Normalement, la non-disjonction mitotique a lieu lors des premières étapes de clivage, quelque temps après la fécondation (Brock, 1993). L'âge maternel avancé a été suggéré comme facteur de risque dans le développement du TS, mais cette théorie a été contredite par les observations d'autres groupes, lesquels démontraient que ce paramètre est en corrélation inverse avec la manifestation de la monosomie de l'X (Gravholt *et al.*, 1996).

Par ailleurs, il a été constaté que le pourcentage de mosaïcisme est moins élevé chez les avortons que chez les nouveau-nés (Hassold *et al.*, 1988). L'hypothèse qui émerge de cette constatation sous-entend que la présence d'un caryotype mosaïque est nécessaire à la survie des patientes atteintes du TS. Rappelons que 99% des conceptions ne parviennent pas au terme de la grossesse. Ainsi, la totalité des naissances nécessitent la présence de lignées cellulaires différentes et ce, même si le mosaïcisme ne peut être révélé par les techniques moléculaires conventionnelles (Jacobs *et al.*, 1990; Hochberg et Zadik, 1999). En ce sens, Saenger *et al.* rapportent (Saenger, 1996) que le raffinement des méthodes d'analyse moléculaire nous permet maintenant de mieux détecter le mosaïcisme. Il soutient que, par l'utilisation de la technique FISH, il est possible d'augmenter de 26% la détection du mosaïcisme comparativement aux analyses cytogénétiques. La technique de RT-PCR augmenterait la détection de 40%. Il a été démontré que les méthodes de PCR-Southern et de PCR imbriqué-Southern sont plus efficaces encore pour ce type d'investigation (Kocova *et al.*, 1993; Patsalis *et al.*, 1998).

Il est crucial d'identifier précisément le caryotype puisqu'il permet cliniquement de prévoir certaines prédispositions. Certes, les Turnériennes sont porteuses de matériel chromosomique X, mais il est possible qu'elles possèdent aussi du matériel chromosomique Y caché (Y cryptique) (35-40% des cas). Il est essentiel de détecter

l'existence d'un Y cryptique chez les sujets TS puisque cette situation les prédispose à un risque de 15 à 25% de développer des gonadoblastomes et une virilisation à la puberté (Tableau VI). Néanmoins, la présence ou non de mosaïcisme dans les cellules lymphocytaires ne reflète pas nécessairement le caryotype des autres lignées cellulaires. Bien que les tissus de différentes origines (e.g., épithélium buccal, tissus gonadique) peuvent aussi cacher du mosaïcisme, en dehors des études cliniques, le diagnostic de routine repose majoritairement sur le caryotype des lymphocytes périphériques. Il est donc normal de rencontrer des difficultés majeures provenant de la prévalence de mosaïcisme et de sa détection lorsque nous tentons d'établir des corrélations phénotypes-génotypes.

3.1.2.2 *Implication du chromosome X*

3.1.2.2.1. Inactivation de l' X

Étant donné la différence quant au nombre de X présent chez les deux sexes, Lyon a émis en 1960 une hypothèse concernant le dosage des gènes liés au chromosome X. L'hypothèse soutient qu'il survient lors des tous premiers stades du développement embryonnaire chez les mammifères femelles une compensation dans le dosage des gènes liés aux chromosomes X. Cette compensation a lieu par l'inactivation de l'un des deux chromosomes X au sein des cellules diploïdes normales. L'inactivation de l'X est sous la régulation des mécanismes de l'empreinte génomique. Le centre d'inactivation de l'X, nommé XIC est le principal régulateur. Les gènes de ce locus (Xq13.2), comme le gène XIST, sont seulement exprimés sur le chromosome X inactif (Xi). *XIST* a un rôle dans l'inactivation. Il est connu que seul le Xi exprime l'ARNm de *XIST*, lequel interagit localement avec l'ADN du Xi. De multiples éléments sont probablement nécessaires à la mise en place de l'inactivation: l'élément de contrôle de l'X (Xce) en est un exemple (Jamieson *et al.*, 1996). L'inactivation a normalement lieu de manière aléatoire, c'est-à-dire qu'environ la moitié des cellules inactivent le chromosome X d'origine maternelle (X^{mat}) tandis que l'autre moitié inactivent le chromosome X d'origine paternelle (X^{pat}). Cependant, il semble qu'il peut y avoir une régulation

tissulaire spécifique puisqu'il a été démontré que les cellules extraembryonnaires (trophoblastiques) inactivent préférentiellement le X^{pat} (Jamieson *et al.*, 1996).

Les erreurs d'inactivation du chromosome X pourraient avoir une importance dans la variabilité phénotypique du TS. En situation de monosomie complète (45,X), l'unique X intact est actif. Généralement, l'inactivation de l'X chez les patientes possédant un caryotype mosaïque s'effectue normalement dans les cellules avec plus d'un chromosome X (Chu et Connor, 1995). Par contre, il semble que dans certains cas (e.g., patientes avec chromosome en anneau (ring chromosome)) le processus d'inactivation peut manquer et entraîner l'activation des 2 chromosomes X (Migeon *et al.*, 1993). Dans de telles circonstances, le centre XIC n'est pas toujours absent, mais son expression peut être altérée par des mutations (Migeon *et al.*, 1993; Migeon *et al.*, 1996).

Par ailleurs, il est pertinent de mentionner que certains gènes spécifiques au chromosome X échappent à cette inactivation, ce qui signifie qu'une double copie de ces gènes est active (e.g., région pseudoautosomale ou «PAR»). Nous ne savons pas si les mécanismes moléculaires entraînant l'inactivation de la majorité des gènes sur l'un des chromosomes X résultent d'une activité locale ou encore s'ils sont le reflet d'une organisation en domaines subchromosomiques, ceci à l'exemple des centres de contrôle de l'empreinte. Une étude se concentrant dans la portion chromosomique Xp11.21-p11.22 supporte cette dernière hypothèse (Miller et Willard, 1998).

3.1.2.2.2. Gènes candidats: Rôle majeur du gène SHOX

Les efforts pour tenter d'identifier un ou plusieurs gènes actifs dans le TS ont permis à deux équipes de mettre en évidence, par clonage de position, le gène *SHOX* aussi connu sous l'abréviation *PHOG* (Ellison *et al.*, 1997; Rao *et al.*, 1997). *SHOX* a tout du gène idéal pour expliquer la petite stature des patientes Turner. Il est localisé dans la région identique, dite pseudoautosomale (PAR1) (Fig. 10), des chromosomes X et Y et code pour 2 isoformes protéiques contenant un homéodomaine. L'une d'elle est exprimée dans les fibroblastes de la moelle osseuse. La région pseudoautosomale se situe en position télomérique sur les bras courts (Xp et Yp) des chromosomes X et Y. Cette région est la seule région qui échappe totalement à l'inactivation de l'X (Fig. 10).

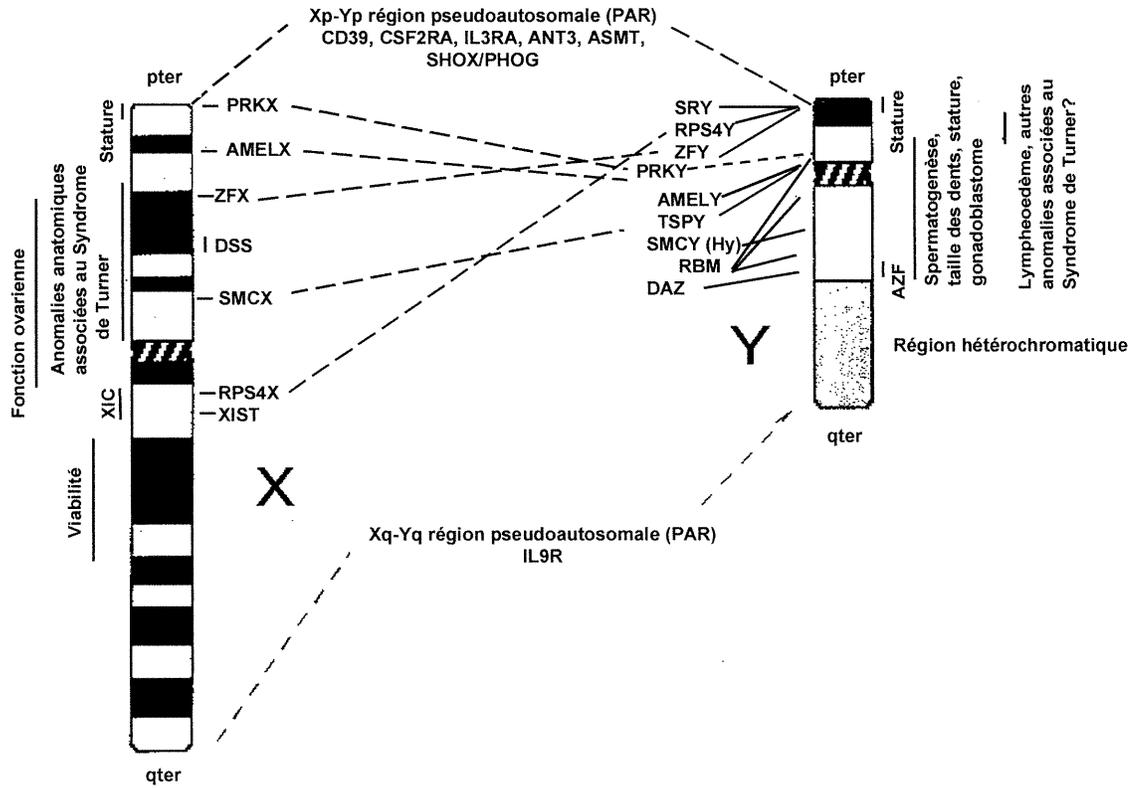


Figure 10: Structure et fonction des chromosomes sexuels. Pointillés: Gènes homologues X et Y; pter, qter: Télomères. (Zinn, 1998)

Puisque *SHOX* réside à cet endroit, cela signifie que les deux allèles actifs sont importants dans la croissance (Zinn et Ross, 1998; Zinn, 1998). L'haploinsuffisance de *SHOX* semble également jouer un rôle dans la présence de défauts squelettiques comme le cubitus valgus et le 4^e métacarpien plus court (comme observés dans le Syndrome de Leri-Weill) (Kosho *et al.*, 1999). Des mutations affectant les deux copies de *SHOX* ont été trouvées dans un syndrome caractérisé par une très petite taille, voire une chondrodysplasie (mésomélique), appelé syndrome de Langer.

Ogata *et al.* ont récemment décrit la fonction de *SHOX*. En effet, *SHOX* semble agir en partie comme régulateur de la fusion des plaques de croissance ainsi que dans la maturation de la partie distale des membres et ce, de manière à neutraliser les effets de l'œstrogène sur la maturation du squelette (Ogata *et al.*, 2001). Certes, *SHOX* ne fonctionne pas seul dans la régulation de la croissance puisqu'il est rapporté que des délétions plus importantes en Xp entraînent un déficit de croissance plus sévère encore. Il pourrait agir en association avec des gènes liés à l'X ou conjointement avec des effets non spécifiques de l'aneuploïdie (Ogata et Matsuo, 1995).

De plus, les études actuelles se concentrent sur des régions qui sont identiques d'un chromosome sexuel à l'autre, qui échappent à l'inactivation de l'X ou encore qui sont des loci reconnus pour contenir des gènes homologues aux deux chromosomes. Les gènes *RPS4X*, *ZFX* et *PRKX* (Fig. 10) par exemple ont des homologues sur le chromosome Y (*RPS4Y*; *ZFY*; *PRKY*) et sont des candidats qui suscitent l'intérêt (Zinn et Ross, 1997; Zinn, 1998; Zinn et Ross, 1998). Par exemple, un modèle murin invalidé pour le gène *Zfx* présente une viabilité réduite, une masse corporelle embryonnaire et adulte amoindries ainsi qu'un nombre restreint de cellules ovariennes, trait phénotypique qui rappelle le TS (Luoh *et al.*, 1997).

Récemment, une étude chez le mouton a permis de mettre en évidence l'existence d'un gène (*Woodlands gene*) soumis à l'empreinte sur le chromosome X (Davis *et al.*, 2001). Il s'avère que l'expression de ce dernier est régie par l'allèle d'origine paternelle et qu'il agit dans le contrôle de l'ovulation.

3.1.2.3. *Étiologie du TS: Explication d'une régulation par l'empreinte génomique.*

L'empreinte génomique a été proposée comme l'un des déterminants de la variabilité du TS. La première observation en ce sens constitue la prévalence de 2 à 4 fois plus élevée du caryotype X^{mat} sur celui X^{pat} , suggérant que l'origine parentale du chromosome X intact est susceptible d'influencer la viabilité *in utero* (Jacobs *et al.*, 1990; Mathur *et al.*, 1991; Saenger, 1996). En se basant sur la perte préférentielle de l' X^{pat} chez les nouveau-nés et les avortons (Jacobs *et al.*, 1990), nous pouvons croire que les erreurs de non-disjonction méiotique proviennent majoritairement de la spermatogénèse. Encore une fois, l'influence de l'âge parental a été proposée pour soutenir cette dernière hypothèse, mais aucune corrélation entre l'origine parentale de l'X et l'âge parental n'a été trouvée (Mathur *et al.*, 1991).

Une étude faite par l'équipe de Chu en 1994 démontre clairement qu'il existe une corrélation significative entre la présence d'un chromosome X d'origine maternelle et la prédisposition à posséder des anomalies cardiovasculaires et une palmure cervicale (Chu *et al.*, 1994). Les auteurs soulèvent également la corrélation entre le percentile de la taille des filles X^{mat} et le percentile de la taille maternelle. D'autres indices reliées au rôle de l'empreinte génomique dans le TS nous viennent plus directement d'analyses spécifiques à la compréhension des fonctions cognitives et comportementales (Isles et Wilkinson, 2000). À l'aide d'une cohorte de 80 patientes Turner, Skuse *et al.* sont parvenus à illustrer clairement certaines différences attribuables à l'effet de l'origine parentale du chromosome X. En effet, ils ont démontré que les Turnériennes X^{pat} s'intègrent mieux socialement que les X^{mat} et ce, grâce à leurs habiletés verbales et fonctionnelles supérieures (Skuse *et al.*, 1997). Plus récemment, d'autres études sur l'implication de l'origine parentale de l'X intact ont été rapportées afin d'expliquer la variabilité liée aux troubles cognitifs. Il a été constaté que les filles ayant retenu le X^{pat} possèdent une mémoire verbale supérieure tandis que les patientes avec X^{mat} possèdent une mémoire visuospatiale supérieure (Bishop *et al.*, 2000).

De plus, un 4^e cas de patiente X^{mat} souffrant d'autisme vient d'être rapporté (Skuse, 2000; Donnelly *et al.*, 2000). Nous savons que l'autisme est un désordre qui se

manifeste quatre fois plus souvent chez les garçons que chez les filles. Ainsi, ces dernières observations renforcent l'hypothèse voulant qu'un gène soumis à l'empreinte spécifiquement localisé sur le chromosome X et dont l'expression semble sous la gouverne de l'allèle d'origine paternelle (allèle d'origine maternelle inexprimé) soit spécifique à la cognition sociale (Skuse *et al.*, 1997).

Bien que ces données révèlent un rôle de l'empreinte génomique dans la variabilité phénotypique des filles Turner, d'autres groupes n'ont pas réussi à mettre en évidence une influence de l'origine parentale du chromosome X intact sur les dysmorphismes ou sur la taille (Mathur *et al.*, 1991; Lorda-Sanchez *et al.*, 1992; Tsezou *et al.*, 1999).

En 1988, une étude pan-canadienne a été instaurée. Jusqu'à maintenant, il s'agit de l'unique étude randomisée, incluant un groupe contrôle non placebo et une induction pubertaire standardisée, sur l'effet de la GH sur la taille adulte chez les filles atteintes du Syndrome de Turner (étude GDCT). Le troisième volet de cette étude s'intéresse spécifiquement à l'empreinte parentale et aux corrélations génotypes-phénotypes dans le TS. Dans ce chapitre, mes efforts expérimentaux mettent l'accent sur le perfectionnement technique dans le but de nous permettre de déterminer si l'origine parentale du chromosome X intact dans le Syndrome de Turner influence: 1) la croissance fœtale et postnatale (poids et taille à la naissance ainsi que taille adulte); 2) la réponse au traitement à la GH; 3) la présence de troubles auditifs neurosensoriels. Les résultats qui sont décrits dans ce chapitre ne sont que préliminaires. Puisque l'analyse finale des données ne sera possible qu'une fois la réception des échantillons cliniques complétée, les résultats spécifiques aux premières patientes analysées sont décrits dans ce chapitre.

3.2. MATÉRIEL ET MÉTHODE

3.2.1. Population à l'étude

Le sous-groupe à l'étude est constitué de 108 patientes présentant un TS, lesquelles proviennent de la population de l'étude GDCT (n=155). Chacune des patientes du sous-groupe a été assignée aléatoirement à un traitement à la GH ou non. À ce jour, 90% des filles ont atteint leur taille adulte. Afin d'être admissible à notre étude, elles devaient présenter un caryotype de type 45,X (n=45 témoin; n=46 traitées à la GH); 46,X,i(Xq) (n=1 témoin; n=2 traitées); 46,X,del(Xp) (n=2 traitées) ou présenter un mosaïcisme de type 45,X/46,X,del(Xp) (n=1 témoin; n=1 traitée) ou 45,X/46,X,i(Xq) (n=6 témoins; n=4 traitées). Les caryotypes ont été préalablement déterminés par les analyses cytogénétiques lors du diagnostic clinique. Toute patiente susceptible de posséder une lignée cellulaire contenant plus d'un chromosome X intact a été automatiquement exclue. Comme la détermination de l'origine parentale de l'X requiert au moins l'analyse de l'ADN maternel, en plus de celui de la patiente, seules les patientes dont l'échantillon sanguin maternel a pu être prélevé ont été admises.

3.2.2. Récolte des échantillons

Les comités d'éthique des centres canadiens participants ont approuvé le protocole et les formulaires de consentement (Annexe I). Après consentement éclairé, 10 ml de sang ont été prélevés (patiente et mère) dans le centre hospitalier traitant; 12 centres canadiens participent à l'étude. Le protocole n'inclut pas la collecte de sang paternel par crainte de découvrir des cas de non-paternité, lesquels laissent place à des situations particulièrement délicates au point de vue éthique.

Suite à l'isolation des noyaux lymphocytaires, l'ADNg a été extrait par la technique d'extraction phénol:chloroforme:isoamylOH décrite par John et al (John *et al.*, 1991). Des aliquots ont été préparés et gardés à -20°C jusqu'aux analyses moléculaires.

Soulignons que cette étude est présentement en cours et que jusqu'à maintenant, 30 patientes ont été analysées dont 22 ont pu recevoir la confirmation quant à l'origine parentale de leur chromosome X intact.

3.2.3. Analyses moléculaires: Détermination de l'origine parentale du chromosome X

L'origine parentale du chromosome X intact a été assignée par le génotypage de microsatellites spécifiques au chromosome X dont le choix est influencé par le type de la répétition nucléotidique (di- ou tétranucléotidiques), le haut degré de polymorphisme (7 à 12 allèles), le degré d'hétérozygotie (> 65%) et la fréquence allélique (< 50%). 11 microsatellites (Research Genetics, Inc.) ont été retenus: DXS7100, DXS1053, DXS538, DXS1003, DXS1204, DXS981, DXS1125, DXS986, DXS1120, DXS1047 et DXS102 (Fig. 11).

3.2.3.1. Génotypage

Par PCR, nous avons employé 2 méthodes de marquage du produit de PCR: le marquage par incorporation de [α - 32 P]-dATP (Amersham Pharmacia Biotech) et le marquage de l'amorce sens en 5' à l'aide de [γ - 32 P]-ATP (kination) (Amersham Pharmacia Biotech). Toutes les réactions PCR ont été faites dans un volume de 20 μ l à partir de 25 ng d'ADNg.

Pour les analyses d'incorporation, la mise au point des conditions pour 9 microsatellites (DXS7100, DXS1053, DXS538, DXS1003, DXS1204, DXS981, DXS986, DXS1047 et DXS102) a été effectuée. L'ADNg de la patiente et de sa mère ont été amplifiés en présence de 0.6 μ M d'amorces sens et antisens spécifiques au microsatellite utilisé (DXS7100 sens: 5' TGC ACA AGA GGTCAA TGT CT 3'; antisens: 5' TAA AAT TCC TCA CTC CAC CA 3'); (DXS1053 sens: 5' TTA AGG AAG TAT GAG GCT CCA; antisens: 5' TTG GTG CAA AAG TAA TCA CG 3'); (DXS538 sens: 5' CTG ATT CAC TGT ACA ATG GT 3'; antisens: 5' ATG GAT AAT AAA CAC ACA GGA 3'); (DXS1003 sens: 5' TTC ACC CAT AGA AGC CGT 3';

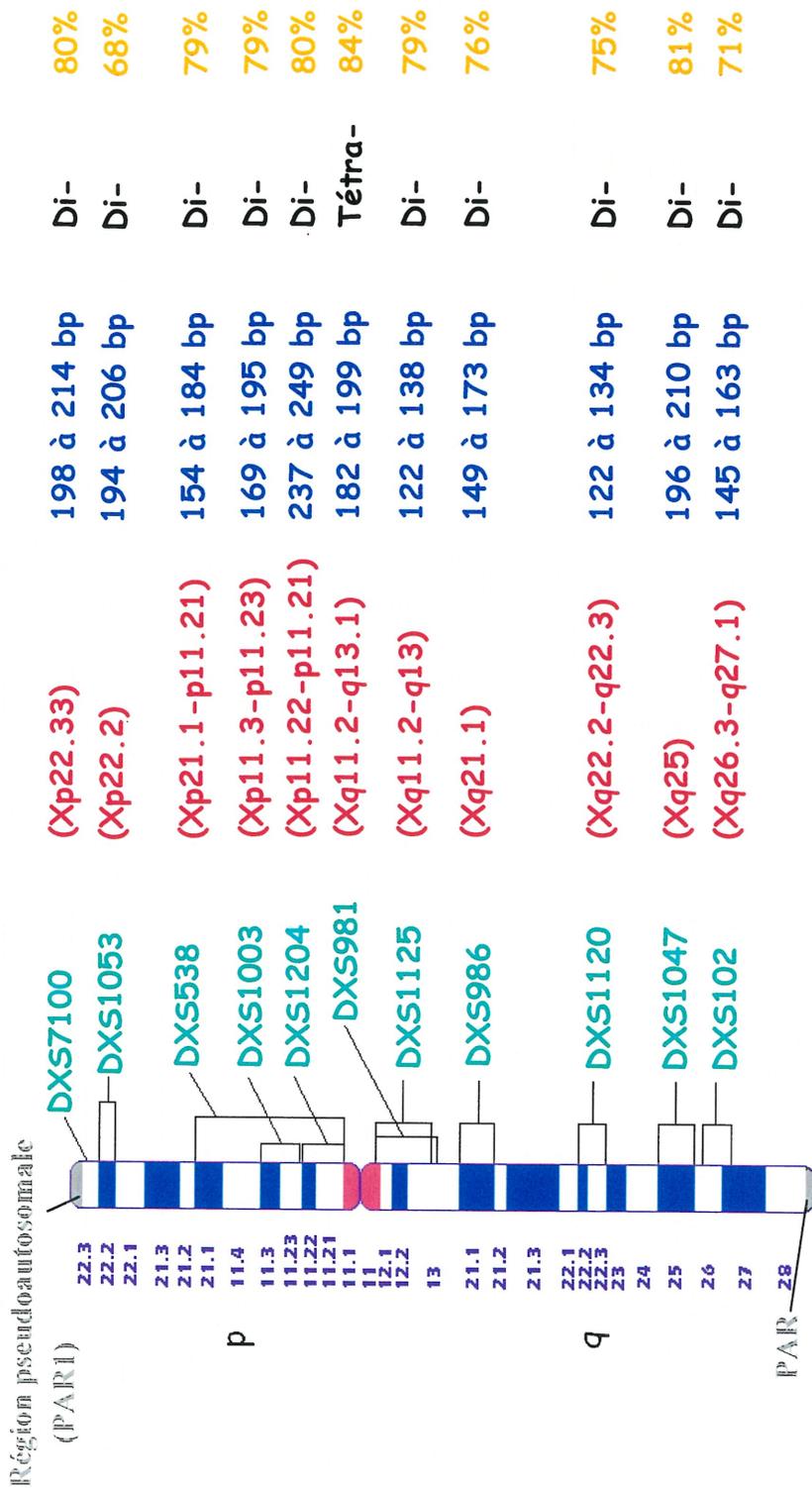


Figure 11: Microsatellites spécifiques au chromosome X humain utilisés dans le génotypage des patientes atteintes du TS.

- ★ Locus
- ★ Tailles des allèles (paires de bases) retrouvés
- ★ Caractéristique de la répétition nucléotidique.
- ★ % d'hétérozygoté

antisens: 5' CCA TTC CTC ACT GGC AAG 3'); (DXS1204 sens: 5' ATG AAC CCT TAA CTC ATT TAG CAG G 3'; antisens: 5' AGC NTG CAC CAA CAT GCC 3'); (DXS981 sens: 5' TCA GAG GAA AAG AAGTAG ACA TAC T 3'; antisens: 5' TTC TCT CCA CTT TTC AGA GTC A 3'); (DXS986 sens: 5' CCT AAG TGC TCA TCA TCC CA 3'; antisens: 5' AGC TCA ATC CAA GTT GCT GA 3'); (DXS1047 sens: 5' CCG GCT ACA AGT GAT GTC TA 3'; antisens: 5' CCT AGG TAA CAT AGT GAG ACC TTG 3'); (DXS102 sens: 5' GTA GTC TCA GTC GAC ATG CTT TGA C 3'; antisens: 5' GCT GAG AAA GTA GAT CCT AAG TGT TC 3') (Research Genetics, Inc.). La réaction contenait également 1X de tampon PCR, 67 μ M de dCTP, dGTP et dTTP, 25 μ M de dATP, 1.5 mM de MgCl₂, 0.45 U de *Taq* ADN polymérase (Life Technologies Inc.) et 1 μ Ci de [α -³²P]-dATP. Le PCR a été réalisé selon les paramètres standards indiqués au protocole de Research Genetics Inc. et selon les conditions de PCR suivantes: une dénaturation de 2 minutes à 95°C, 30 cycles de 45 secondes à 94°C, de 45 secondes à 57°C et de 60 secondes à 72°C ainsi qu'une élévation de 10 minutes à 72°C. Les conditions d'amplification des microsatellites DXS7100, DXS1047, DXS986 et DXS1204 ont dû être optimisées en utilisant 0.5 mM de MgCl₂ et une T° d'hybridation de 59°C tandis que les conditions pour DXS 102 ont dû être optimisées en utilisant une T° d'hybridation de 55°C.

Le marquage en 5' de l'amorce sens a été employé pour les microsatellites DXS1125 (sens: 5' CTT TAG GGA GGT GAG CTT TCA GGT T 3'; antisens: 5' GGA GTG CTC TAC TGC TAG GAT GTA A 3') et DXS1120 (sens: 5' GGA TTC TAA GAC CCT CTC ACA CCA 3'; antisens: 5' CCA TTC AGT TTT ATT CAG GGG AAA G 3'). D'abord, pour chacun d'eux, 2.4 μ M de l'amorce sens a été marquée avec 80 μ Ci de [γ -³²P]-ATP. 15 U de T4 polynucléotide kinase (Life Technologies Inc.) et 1X du tampon kinase ont aussi été incorporés aux 25 μ l de la réaction de marquage. Ensuite, l'amorce radioactive a été éluée sur colonne Séphadex G-25 tel que décrit dans Maniatis *et al.* pour enlever la radioactivité libre (Maniatis *et al.*, 1989). Par la suite, la réaction PCR a été effectuée en présence de 0.8 μ l de la réaction de marquage, 0.48 μ M d'amorce sens non radioactive, 0.6 μ M d'amorce antisens non radioactive, 67 μ M de

chacun des dNTP, 1X de tampon PCR, 1.5 mM de MgCl₂, 0.5 U de *Taq* ADN polymérase, dans un volume final de 20 µl, en respectant les paramètres standards décrits ci-haut.

3.2.3.2. Détermination de l'origine parentale

3 µl de produit de PCR radioactif (ADN maternels et patientes), ont été analysés par électrophorèse sur gel dénaturant contenant 6% de polyacrylamide 19:1 et 7 M d'urée. Les allèles spécifiques aux chromosomes X ont été visualisés par exposition autoradiographique. Le patron allélique attendu pour les mères (46,XX) est de 2 allèles dans le cas d'hétérozygotie ou de 1 allèle dans le cas d'homozygotie tandis que celui pour les patientes atteintes du TS (45,X) est de 1 allèle (hémizygotie). Les génotypes mère-fille ont été comparés pour déterminer la provenance parentale du fragment amplifié chez la patiente. Un fragment identique à l'un des fragments maternels suppose que la patiente a retenu un chromosome X intact d'origine maternelle (X^{mat}). S'il diffère, ceci indique que le chromosome X intact est plutôt d'origine paternelle (X^{pat}).

3.2.3.3. Statistiques

Le pouvoir de discrimination (PD) allélique a été utilisé pour nous permettre de déterminer l'origine parentale de l'X. En résumé, la taille de chacun des allèles amplifiés a été précisée à l'aide de la séquence plasmidique M13mp18 obtenue suivant les procédures inscrites au protocole commercial «Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit» (USB). Pour chacun des microsatellites, la fréquence allélique du fragment amplifié chez la patiente a été assignée selon les valeurs inscrites dans Genome Data Base. Le PD allélique a été calculé en utilisant la formule suivante: Fréquence allélique₁ x fréquence allélique₂ x fréquence allélique_n. L'origine parentale a été assignée définitivement à une patiente lorsque le pouvoir de discrimination atteint une valeur < 0.001 pour la présence d'un X^{mat} et < 0.01 dans les cas où le X^{pat} est retenu. Ce PD réfère au pourcentage d'erreur associé à l'attribution de l'origine parentale.

3.3. RÉSULTATS

La Figure 12 montre des exemples d'analyses microsatellites par comparaison avec la technique de marquage par incorporation de [α - 32 P]-dATP pour le microsatellite DXS538 et celle de marquage en 5' de l'amorce sens pour le microsatellite DXS1120. Des expériences pilotes pour chacun des microsatellites ont permis un choix technique qui leur est approprié afin d'analyser adéquatement l'origine parentale et la taille allélique des fragments amplifiés.

Jusqu'à présent, 30 échantillons d'ADN ont été étudiés. Les résultats de la patiente #3 (P_3) et #7 (P_7) sont rapportés (Fig. 13), à titre d'exemple, pour illustrer les différences observées entre le patron allélique d'une patiente ayant retenu un X^{mat} et une patiente ayant retenu un X^{pat} . En s'attardant aux génotypes patiente (45,X) / mère (46,XX), nous pouvons voir clairement la différence quant au nombre d'allèles amplifiés (1:2). Pour le microsatellite DXS7100, la P_3 a retenu le X^{mat} puisque son unique allèle amplifié est identique à l'un des fragments maternels. L'origine paternelle est assignée au X intact de la P_7 puisque le fragment amplifié diffère complètement du patron allélique maternel.

L'analyse de microsatellites supplémentaires est requise pour définir adéquatement l'origine parentale du chromosome X intact. En début d'étude, le génotypage des premiers microsatellites DXS7100, DXS981 et DXS1053 a permis, à trois reprises, d'attribuer l'origine maternelle au X intact de la P_3 et l'origine paternelle au X intact de la P_7 (Fig. 14). En s'attardant à l'analyse de la P_3 , des tailles alléliques de 208 pb, 194 pb et 200 pb ont été respectivement précisées à l'aide de la séquence plasmidique M13pc18. Il s'avère que les fréquences associées aux tailles alléliques trouvées ne sont pas toutes admissibles au calcul du PD. Dans l'assignation d'une origine maternelle à l'X intact, les fréquences de très basse valeur, e.g., 0.07, sont les plus appropriées. À cette étape, le PD pour la P_3 correspond à 0.07 (Fig. 14). Étant donné que le PD n'est pas < 0.001 , 3 microsatellites additionnels ont dû être génotypés (Tableau VII-A) afin de trouver un PD respectant la valeur statistique prédéterminée. Ainsi, avec un nouveau PD égal à 0.0007, la P_3 a retenu le X^{mat} . Mentionnons que sur 6

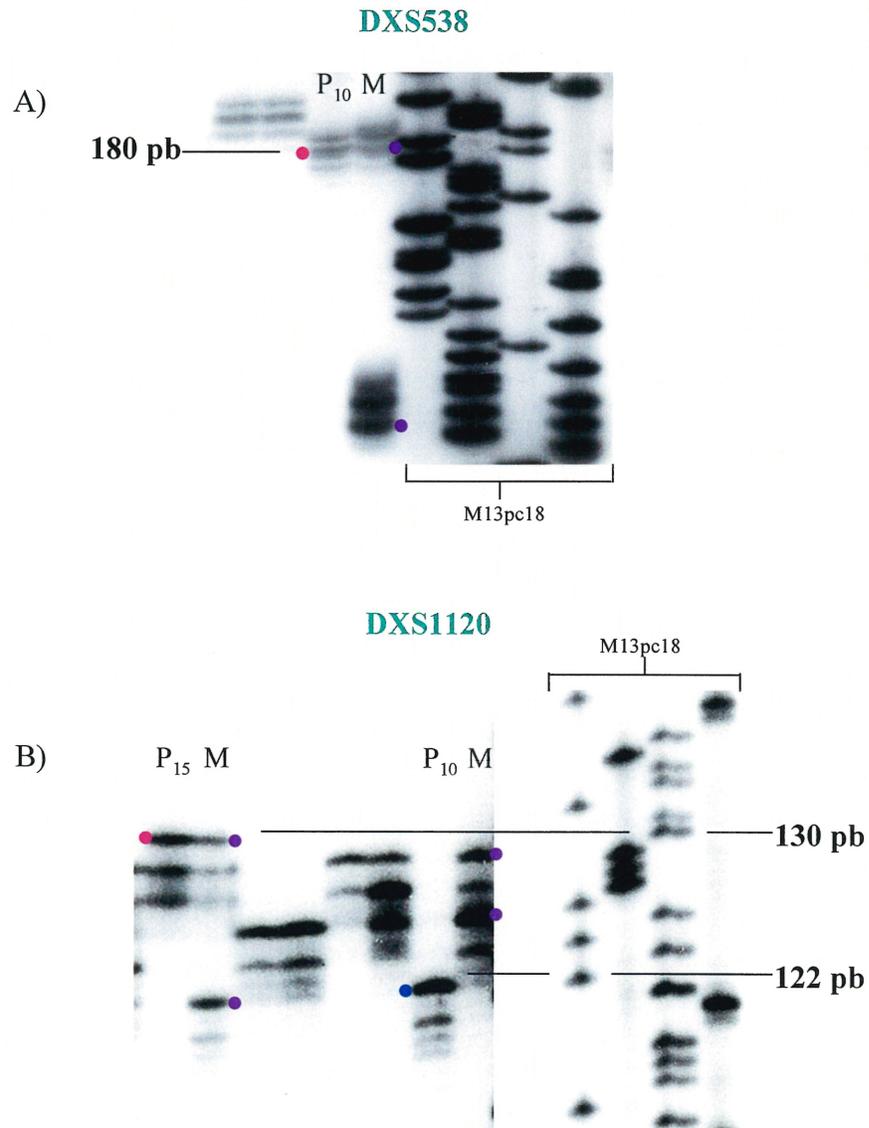


Figure 12: Comparaison des techniques de marquage utilisées. A: Incorporation d' $[\alpha^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ (DXS538); B: Marquage en 5' de l'amorce sens (DXS1120); P: génotype de la patiente; M: génotype maternel; violet: allèles maternels; rose: allèle X^{mat} de la patiente avec ST; bleu: allèle X^{pat} de la patiente avec ST; M13pc18: séquence plasmidique.

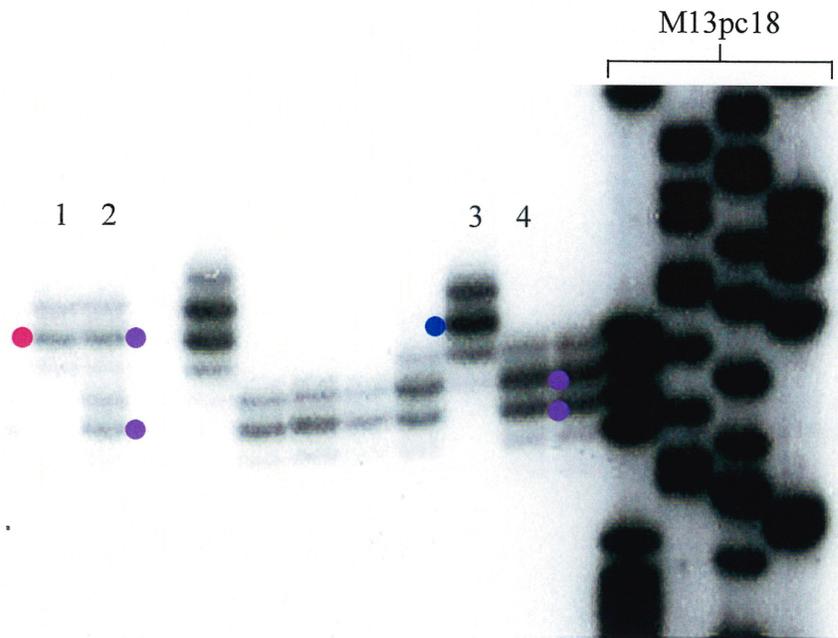


Figure 13: L'origine parentale des allèles suite à l'amplification d'un microsatellite chez des patientes 45,X atteintes du TS (e.g.: DXS7100). Similarité des patrons alléliques entre la patiente #3 et sa mère (X^{mat}). Discordance des patrons alléliques entre la patiente #7 et sa mère (X^{pat}). Colonne 1: génotype de la patiente #3; colonne 2: génotype maternel de la patiente #3; colonne 3: génotype de la patiente #7; colonne 4: génotype maternel de la patiente #7; M13pc18: séquence plasmidique.

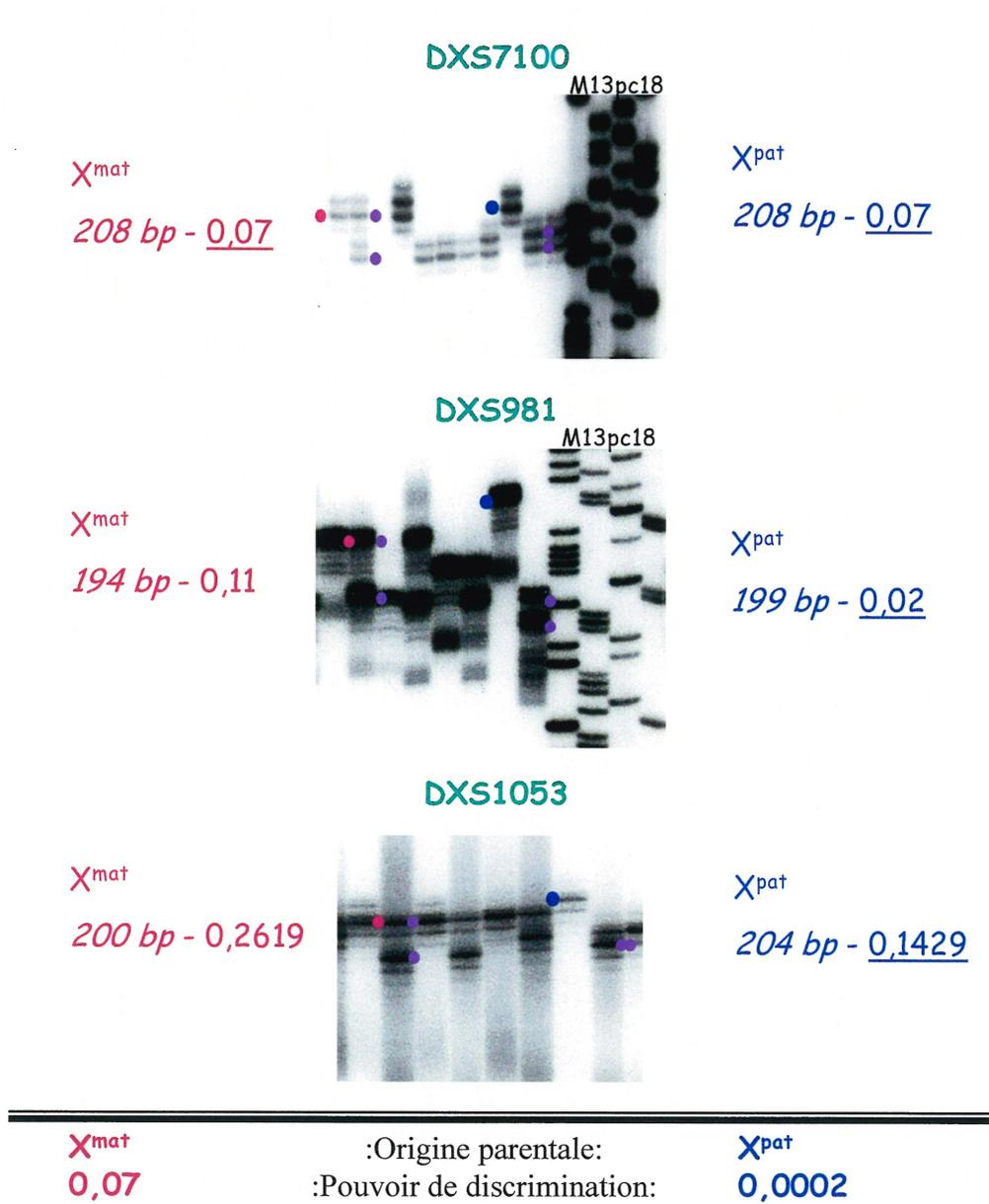


Figure 14: Analyse de microsatellites dans la détermination de l'origine parentale du chromosome X intact chez des filles atteintes du TS (45,X). Rose: patiente #3; bleu: patiente #7; violet: mère respective. Souligné: les fréquences utilisées dans le calcul du PD. M13pc18: séquence plasmidique. Le locus des microsatellites se retrouve en vert au-dessus de chacun des gels.

A)

Patiente 3 Invest. #: 112
 Patiente #: 2309
 Caryotype: 45,X

| | <i>Allèle #</i> | <i>Taille (pb)</i> | <i>Fréquence</i> | <i>Orig. P de l'X</i> | <i>Observations</i> |
|----------------|-----------------|--------------------|------------------|-----------------------|---------------------|
| DXS7100 | 6 | 208 | 0,07 | X ^{mat} | mère hétérozygote |
| DXS1053 | 2 | 200 | 0,2619 | X ^{mat} | mère homozygote |
| DXS538 | 2 | 180 | 0,13 | X ^{mat} | mère hétérozygote |
| DXS981 | 4 | 194 | 0,11 | X ^{mat} | mère hétérozygote |
| DXS1120 | NA | 120 | NA | X ^{mat} | mère hétérozygote |
| DXS102 | 5 | 155 | 0,01 | X ^{mat} | mère hétérozygote |
| | | | <i>PD (n=2)</i> | <i>Final</i> | |
| | | | 0,0007 | X ^{mat} | |

B)

Patiente 7 Invest. #: 112
 Patiente #: 2801
 Caryotype: 45,X

| | <i>Allèle #</i> | <i>Taille (pb)</i> | <i>Fréquence</i> | <i>Orig. P de l'X</i> | <i>Observations</i> |
|----------------|-----------------|--------------------|------------------|-----------------------|---------------------|
| DXS7100 | 6 | 208 | 0,07 | X ^{pat} | mère hétérozygote |
| DXS1053 | 3 | 204 | 0,1429 | X ^{pat} | mère homozygote |
| DXS538 | 1 | 199 | 0,02 | X ^{pat} | mère hétérozygote |
| | | | <i>PD (n=3)</i> | <i>Final</i> | |
| | | | 0,0002 | X ^{pat} | |

Tableau VII: Détermination de l'origine parentale suite à l'obtention du pouvoir de discrimination. A: Compilation des données des génotypes pour la patiente #3; B: Compilation des génotypes pour la patiente #7. Vert: fréquences alléliques utilisées dans la détermination du pouvoir de discrimination (PD); NA: Allèle non répertorié.

génotypages (tous assignant le X^{mat}), le résultat de 2 microsatellites a servi au calcul du PD. De plus, l'allèle 120 pb du marqueur DXS1120 n'est pas répertorié dans la base de données: la rareté de cet allèle renforce l'origine maternelle de l'X intact assignée à cette patiente.

Le même processus d'analyse est effectué pour la P₇. Elle se voit attribuer des tailles alléliques de 208 pb, 199 pb et 204 pb (Fig. 14). Cette fois, le génotypage de 3 microsatellites suffit. Un PD de 0.0002, soit < 0.01 , lui est assigné par multiplication des fréquences respectives ($0.07 \times 0.02 \times 0.1429$). La P₇ a donc conservé le X^{pat} (Tableau VII-B). Dans l'assignation d'une origine paternelle à l'X intact, les fréquences utilisées pour le calcul du PD peuvent être plus élevées (se référer à la discussion).

Dans le but d'être le plus rigoureux possible, compte tenu de la non-disponibilité de l'ADN paternel, nous avons mis au point plusieurs autres microsatellites. En réexaminant 15 échantillons pour lesquels nous avons assigné le PD, nous avons démontré pour 1 de ces 15 échantillons une erreur éventuelle quant à l'attribution de l'origine parentale (maternelle) et à la non-conformité de l'analyse cytogénétique. Le génotypage des microsatellites DXS1053, DXS538 et DXS1204 assigne à la patiente #16 (P₁₆), par exemple, un X intact d'origine maternelle. En effet, le PD calculé ($0.0238 \times 0.13 \times 0.1905 = 0.0006$) respecte la valeur d'acceptation établie (< 0.001) (Fig. 15A). Par contre l'analyse d'un quatrième microsatellite révèle la présence d'un allèle paternel.

Nous avons ainsi constaté que cette technique offre un moyen de vérifier les données caryotypiques envoyées par les investigateurs. À la Figure 15B, nous constatons que les caryotypes déterminés par les analyses de cytogénétique peuvent être en conflit avec nos données moléculaires. Le caryotype initial de la patiente #24 (P₂₄) est 46, X,i(Xq). L'analyse du microsatellite DXS1204 laisse soupçonner un caryotype avec diploïdie du bras «p» (Fig 15B-1). De la même manière, l'investigation des différents loci chez la patiente #20 (P₂₀) a montré la nécessité de réévaluer le caryotype initial de 45,X étant donné l'hétérozygosité de plusieurs loci (DXS1053, DXS1003, DXS1204, DXS981) (Fig 15B-2).

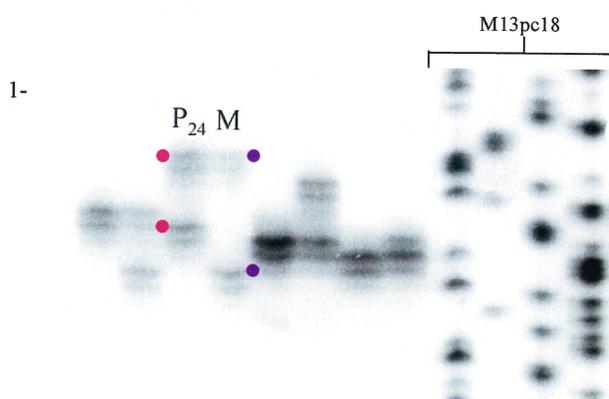
Nous retrouvons au Tableau VIII l'origine parentale des 22 échantillons génotypés jusqu'à maintenant. Au total, 9 patientes se voient assigner l'origine paternelle à leur chromosome X intact retenu comparativement à 13 patientes ayant

A)

Patiente 16 Invest. #: 114
 Patiente #: 2523
 Caryotype: 46,X,i(Xq)

| | Allèle # | Taille (pb) | Fréquence | Orig. P de l'X | Observations |
|---------|----------|-------------|----------------|--------------------------------------|-------------------|
| DXS1053 | 7 | 196 | 0,0238 | X ^{mat} | mère homozygote |
| DXS538 | 2 | 180 | 0,13 | X ^{mat} | mère homozygote |
| DXS1003 | 5 | 183 | 0,18 | X ^{pat} | mère hétérozygote |
| DXS1204 | 2 | 245 | 0,1905 | X ^{mat} | mère hétérozygote |
| DXS981 | 8-6 | 186-190 | 0,22-0,16 | X ^{mat} et X ^{pat} | mère homozygote |
| DXS1120 | 6-3 | 124-130 | 0,01-0,33 | X ^{mat} et X ^{pat} | mère hétérozygote |
| | | | PD (n=) | Final | |
| | | | ND | ND | |

B)



2- Patiente 20 Invest. #: 104
 Patiente #: 2000
 Caryotype: 45,X

| | Allèle # | Taille (pb) | Fréquence | Orig. P de l'X | Observations |
|---------|----------|-------------|----------------|--------------------------------------|-----------------|
| DXS7100 | 5 | 202 | 0,26 | X ^{mat} | mère homozygote |
| DXS1053 | 1-2 | 198-202 | 0,4762-0,0476 | X ^{mat} et X ^{pat} | mère homozygote |
| DXS538 | 3 | 178 | 0,23 | X ^{mat} | mère homozygote |
| DXS1003 | 5-NA | 183-171 | 0,18-NA | X ^{mat} et X ^{pat} | mère homozygote |
| DXS1204 | 7-2 | 241-245 | 0,0714-0,1905 | X ^{mat} et X ^{pat} | mère homozygote |
| DXS981 | 4-5 | 194-191 | 0,11-0,12 | X ^{mat} et X ^{pat} | mère homozygote |
| DXS986 | 4 | 159 | 0,01 | X ^{mat} | mère homozygote |
| DXS1047 | 8 | 202 | 0,3095 | X ^{mat} | mère homozygote |
| | | | PD (n=) | Final | |
| | | | ND | ND | |

Figure 15: Ambiguïtés rencontrées en cours d'étude. A) Attribution de l'origine parentale. L'origine maternelle d'allèles, même à fréquences relativement basses, peut cacher une origine paternelle de l'X intact si ces allèles sont aussi retrouvés chez le père. B) Caryotype non conforme à l'analyse cytogénétique. 1-: L'analyse du microsatellite DXS1204 (Xp) révèle une diploïdie pour la patiente #24 (P₂₄). Selon l'analyse cytogénétique, la P₂₄ devrait posséder un caryotype 46,X,i(Xq). M13pc18: séquence plasmidique. 2-: Les analyses microsatellites de la patiente #20 révèle un caryotype différent de celui assigné en cytogénétique (45,X). ND: non déterminé.

| <i>Patiente #</i> | <i>Org. Par.</i> | <i>PD (n)</i> | <i># of microsat. Total</i> | <i>Caryotype</i> |
|-------------------|------------------|---------------|-----------------------------|--|
| 1 | X ^{pat} | 0.0001 (5) | 6 | 45,X |
| 2 | X ^{pat} | 0.00004 (3) | 7 | 45,X |
| 3 | X ^{mat} | 0.0007 (2) | 6 | 45,X |
| 4 | X ^{pat} | 0.00007 (4) | 10 | 45,X |
| 5 | X ^{mat} | 0.0007 (3) | 6 | 45,X/46,X,der(X).nuc ish Xcen (DXZ1x2) |
| 6 | X ^{mat} | 0.0005 (2) | 5 | 45,X |
| 7 | X ^{pat} | 0.0002 (3) | 3 | 45,X |
| 8 | X ^{mat} | 0.00004 (3) | 6 | 45,X |
| 9 | X ^{mat} | 0.00001 (3) | 7 | 45,X |
| 10 | X ^{pat} | 0.00001 (5) | 10 | 45,X |
| 11 | X ^{mat} | 0.00002 (3) | 6 | 45,X |
| 13 | X ^{pat} | 0.006 (3) | 6 | 45,X |
| 14 | X ^{mat} | 0.0001 (3) | 6 | 45,X |
| 15 | X ^{mat} | 0.0003 (3) | 6 | 45,X |
| 18 | X ^{pat} | 0.004 (3) | 8 | 45,X |
| 19 | X ^{pat} | 0.0001 (4) | 6 | 45,X |
| 21 | X ^{mat} | 0.00002 (3) | 6 | 45,X |
| 22 | X ^{pat} | 0.001 (4) | 6 | 45,X |
| 23 | X ^{mat} | 0.00002 (3) | 10 | 45,X |
| 26 | X ^{mat} | 0.00002 (3) | 10 | 45,X |
| 28 | X ^{mat} | 0.0000005 (4) | 8 | 45,X |
| 30 | X ^{mat} | 0.00002 (3) | 8 | 45,X |

Tableau VIII: Origine parentale du chromosome X intact chez des filles atteintes du TS Résumé des échantillons génotypés. (n): nombre de microsatellites utilisés dans le calcul du PD; # de micros. total: nombre de microsatellites analysés.

conservé le X d'origine maternelle. Les PD rapportés sont bien inférieurs à 0.001 dans les cas X^{mat} et 0.01 dans les cas X^{pat} . Ces résultats nous indiquent également que l'analyse de plusieurs microsatellites est souvent nécessaire pour être en mesure de trouver des fréquences alléliques valables en vue du calcul d'un PD respectant la valeur statistique souhaitée.

Nos résultats préliminaires (Fig. 16) confirment que le caryotype $45,X^{\text{mat}}$ est plus fréquent que celui $45,X^{\text{pat}}$ (59%:41%, n=22). À cette étape de l'étude, la prévalence du chromosome X^{mat} est d'environ 1.4 fois plus élevée.

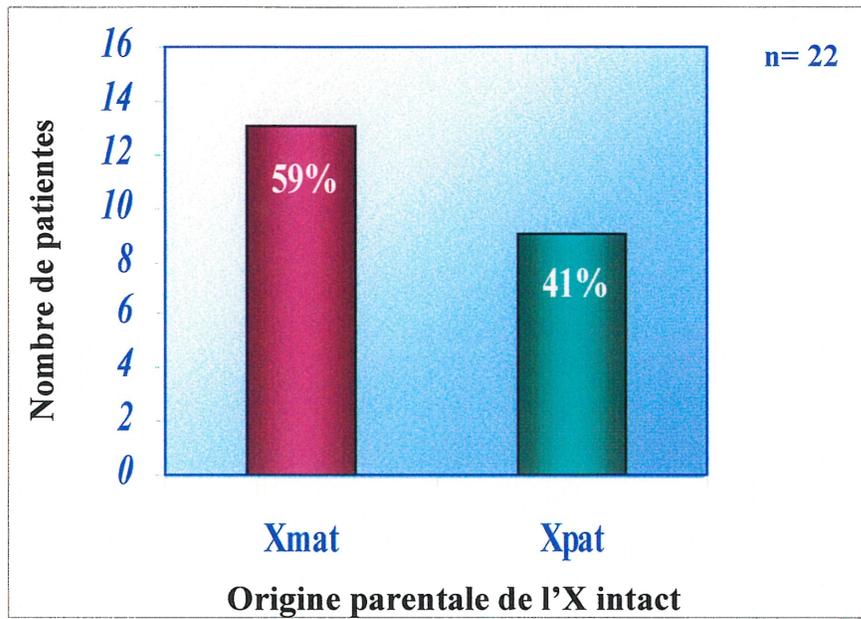


Figure 16.: Prévalence du chromosome X^{mat} versus celui X^{pat} chez des filles atteintes du Syndrome de Turner.

3.4. DISCUSSION

À cette étape de l'étude, nous avons entrepris la mise au point des analyses de génotypage à l'aide de microsatellites en vue de déterminer l'origine parentale du chromosome X intact chez les patientes atteintes du TS. Les résultats préliminaires obtenus sont en accord avec les observations décrites dans la littérature. En considérant les naissances et les avortements spontanés, les équipes de recherche s'entendent en faveur d'une prédominance d'environ 2 à 4 fois du caryotype caractérisé par la présence d'un X^{mat} intact comparativement à celui où nous retrouvons un X^{pat} (Hassold *et al.*, 1988; Jacobs *et al.*, 1990; Mathur *et al.*, 1991; Lorda-Sanchez *et al.*, 1992; Chu *et al.*, 1994). Dans l'attente d'un échantillonnage potentiel de 108 patientes atteintes du TS, nous avons pu assigner l'origine parentale du chromosome X intact pour 22 patientes et ainsi mettre en évidence une prévalence de 1.4 fois (X^{mat} : 59% : X^{pat} : 41%). Ce modeste écart, par comparaison aux valeurs rapportées, peut être expliqué par le petit nombre d'échantillons analysés.

3.4.1. Approche expérimentale utilisée

3.4.1.1. Génotypage par l'utilisation de microsatellites

Les techniques de marquage par incorporation d' $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ et de marquage de l'amorce sens en 5' peuvent être utilisées aisément une fois les conditions optimisées. En effet, plusieurs essais-pilotes ont été requis pour chacun des microsatellites choisis afin d'obtenir des amplifications claires et précises de la région chromosomique ciblée. Le choix de l'une ou l'autre des méthodes ne change en rien les résultats obtenus quant à l'origine parentale du chromosome X intact. Néanmoins, il demeure parfois plus facile d'analyser les patrons alléliques en utilisant la seconde technique puisqu'une seule copie d'ADN (brin sens) et, par le fait même, moins de fragments d'ombre (*Shadow bands*) sont perceptibles sur l'autoradiographie. Il est pertinent de souligner que l'un des désavantages importants des polymorphismes de répétitions à 2 nucléotides se définit

par la présence, en plus des fragments alléliques, d'une série de bandes d'ombre, lesquelles sont générées par plusieurs facteurs tels le marquage inadéquat du produit de PCR, l'amplification de produits non spécifiques, la dénaturation incomplète des fragments lors de l'électrophorèse ou encore par les erreurs mises en place par la *Taq* ADN polymérase (e.g., ajout d'une adénine en 3') (Litt *et al.*, 1993; Symons *et al.*, 2000). Leur présence peut obscurcir la position des fragments alléliques et rendre ainsi la détermination de la taille allélique ardue et parfois impossible. Cependant, dans la majorité des cas, nous pouvons discriminer les fragments alléliques des fragments d'ombre en s'appuyant sur leur plus forte intensité sur l'autoradiographie. Toutefois, nous avons dû à quelques reprises considérer les paramètres limitants énumérés ci-haut dans le but de résoudre certaines difficultés rencontrées au fil de nos premières analyses.

Par ailleurs, les études moléculaires que nous avons effectuées aident à confirmer pour chacune des patientes le caryotype préalablement établi par les analyses cytogénétiques. Nous avons réalisé que les caryotypes initialement déterminés pouvaient quelquefois être en conflit avec nos données moléculaires (Fig. 15B). Pour certaines patientes, il nous a été possible de mettre en évidence d'éventuelles délétions chromosomiques ou encore du mosaïcisme caché. La patiente #24, par exemple, s'était vue assigner un caryotype 46, X,i(Xq). La mise en évidence d'une diploïdie du bras «p» suite au génotypage du microsatellite DXS1204 laisse envisager l'existence d'une lignée cellulaire caractérisée par un caryotype différent de l'isochromosomie du bras «q». De la même manière, l'investigation des différents loci chez la patiente #20 a montré la nécessité de réévaluer le caryotype 45,X initial étant donné l'hétérozygotie de plusieurs loci (détection d'allèles maternels et paternels). Quant à la globalité des résultats obtenus pour la patiente #12 dont le caryotype initial était également 45,X, elle révèle la présence de régions monosomiques et disomiques.¹ En demandant au médecin référant de préciser le caryotype de cette dernière, il s'est avéré qu'il était plutôt de type 45,X/46,X,del(X)(q12-q26.2). De plus, nous avons recommandé une analyse

¹ Ces données n'ont pas été présentées dans ce mémoire puisqu'elles n'ont été que tout récemment obtenues.

caryotypique à haute résolution pour les patientes #20 et 24; nous sommes en attente d'une confirmation. Bien que l'assignation de l'origine parentale de l'X intact lors de situations de mosaïcisme ou d'anomalies structurales n'est aucunement empêchée, expérimentalement nous devons *a priori* nous concentrer sur les régions de monosomie. Le choix des microsatellites doit alors respecter la spécificité caryotypique de chacune des patientes à l'étude.

Par conséquent, le génotypage par PCR de microsatellites hautement polymorphiques demeure l'une des techniques les plus sensibles présentement pour l'étude de l'aneuploïdie, du mosaïcisme et de l'origine parentale des chromosomes. À titre d'exemple, le Tableau VI donne le pourcentage d'Y cryptique retrouvé chez les filles atteintes du TS par divers critères d'inclusion. En absence de signes de virilisation ou de chromosomes marqueurs (fragments de chromosome non identifiés), l'incidence d'Y cryptique est probablement très faible (< 5%). Mentionnons que toute patiente virilisée ayant un chromosome marqueur ou qui est connue comme porteuse d'Y cryptique a été retranchée de l'étude GDCT initiale. Néanmoins, il est important de se remémorer que nous ne devons pas exclure la possibilité d'en faire la détection au fil de nos analyses futures. Ainsi, le PCR parfois imbriqué, parfois combiné à d'autres méthodes (FISH, Southern) est la seule façon, grâce à sa haute sensibilité, de mettre en évidence la présence de matériel chromosomique Y. Cette sensibilité est tout aussi valable dans l'investigation de la présence de tous types de mosaïcisme. En réalité, cette amélioration technique a permis d'augmenter au-delà de 50% la détection du mosaïcisme dans le TS (Tableau VI).

Dans la mesure où nous ne voulons pas nous insérer de biais dans l'évaluation statistique de l'effet de l'origine parentale du chromosome X intact sur l'expression phénotypique et sur la réponse au traitement à la GH, il est nécessaire d'établir une caractérisation caryotypique rigoureuse afin de permettre un regroupement exact des patientes à l'étude. En ce sens, nous savons que contrairement aux patientes 45,X, les Turnériennes 46,X,i(Xq), par exemple, peuvent entrer en puberté spontanée. Ceci est une nuance importante puisque les changements associés à la sécrétion d'œstrogène au moment de la puberté peuvent conduire à une fusion épiphysaire plus précoce et ainsi inhiber la croissance. De plus, il est connu que l'activité ovarienne spontanée dans la

population TS influence négativement la réponse à la GH (Cacciari *et al.*, 1999). Ainsi, des patientes porteuses d'isochromosomie Xq, de portions chromosomiques X diverses ou de mosaïcisme pourraient se retrouver faussement assignées au groupe 45,X, ce qui laisserait place par la suite à des conclusions statistiques erronnées quant à l'effet réel de l'origine parentale du chromosome X sur la taille finale ou encore sur la réponse au traitement à la GH.

3.4.1.2. Calcul du PD

Nos résultats préliminaires nous ont permis de constater qu'il était beaucoup plus difficile de confirmer l'origine maternelle que l'origine paternelle du chromosome X intact. En effet, l'assignation de l'origine maternelle requiert toujours une attention particulière. Cette difficulté vient du fait que seul l'ADN maternel est disponible comme outil de comparaison des génotypes. (Il en a été décidé ainsi pour des raisons d'ordre éthique dans les situations où la non-paternité serait mise en évidence.) En effet, lorsque l'unique allèle amplifié chez la Turnérienne est aussi retrouvé dans le patron allélique de la mère, il n'existe aucune certitude pour affirmer que l'allèle est strictement d'origine maternelle. Nous ne pouvons pas omettre la possibilité que le père soit porteur de ce même polymorphisme et qu'il l'ait transmis à sa fille, d'où l'intérêt d'analyser plusieurs sites pour minimiser les erreurs. Il est d'autant plus important de considérer cet aspect dans les situations où l'allèle possède une fréquence allélique relativement élevée (i.e., lorsque l'allèle est fréquemment retrouvé dans la population).

Nous présumons, lors des analyses initiales, que l'utilisation d'un minimum de 3 microsatellites et d'une valeur de PD < 0.01 suffisaient pour assigner adéquatement l'origine parentale au chromosome X intact chez les patientes atteintes du TS. Toutefois, en poursuivant le génotypage de plusieurs microsatellites pour les patientes à qui nous avons déjà assigné un X^{mat}, il a été possible de mettre en évidence la présence de matériel chromosomique d'origine paternelle dans un cas sur 10 (e.g., patiente #16: Fig. 15A). De cette constatation, nous en sommes venus à la déduction que le risque relatif de nous tromper en assignant l'origine parentale doit être plus faible dans la détermination du X^{mat} que du X^{pat}, surtout dans des populations homogènes sur le plan

génétiq. L'augmentation du PD à une valeur < 0.001 , pour les patientes avec X^{mat} , prend alors tout son sens (risque relatif: X^{mat} : 0.1%, X^{pat} : 1.0%). Cependant, des résultats similaires à ceux rapportés pour la patiente #16 nous indiquent également qu'il est préférable de calculer le PD spécifique au groupe X^{mat} à l'aide des fréquences alléliques < 0.1 (représentation $< 10\%$ de l'allèle dans la population). En fait, la multiplication de fréquences alléliques à la fois supérieures ainsi qu'inférieures à cette valeur peut également donner un PD acceptable sans pour autant refléter la véritable nature maternelle de l'allèle. Ceci reflète bien les limites imposées par l'utilisation des analyses statistiques. En d'autres mots, nos données expérimentales suggèrent que, lors de la détermination de l'origine maternelle de l'X, nous devons avoir recours au génotypage d'un nombre plus important de microsatellites (souvent une dizaine), comparativement à l'assignation de l'origine paternelle, en plus de devoir tenir compte des fréquences alléliques < 0.1 et ce, afin d'obtenir un PD < 0.001 représentatif. Cette rigueur n'est nullement nécessaire dans l'assignation du X^{pat} puisque la divergence des génotypes mère/fille indique sans contredit une origine paternelle.

3.4.2. Analyse raisonnée des corrélations attendues

3.4.2.1. Influence de l'origine parentale de l'X intact sur l'expression de divers traits phénotypiques.

Nous pensons que l'activité différentielle des chromosomes X peut jouer un rôle dans la manifestation de certains phénotypes associés au TS. La plus grande prévalence de patientes X^{mat} comparativement aux patientes X^{pat} suggère que l'expression de quelques gènes liés au chromosome X varie dépendamment de leur provenance parentale. Bien que les causes de cette prévalence ne soient pas encore connues, le rôle de l'empreinte génomique dans la viabilité intra-utérine est l'une des hypothèses qui a été émise. Considérant l'importance de l' X^{mat} dans la préimplantation de l'embryon et la nécessité de l'inactivation préférentielle de l' X^{pat} dans les tissus extra-embryonnaires (Jamieson *et al.*, 1996), il est donc possible que la perte du X^{mat} soit moins compatible avec la survie *in utero* que la perte du X^{pat} . Néanmoins, les données recueillies jusqu'à

maintenant n'indiquent aucune divergence entre la prévalence de l' X^{mat} pour les avortements spontanés et les naissances (Hassold *et al.*, 1992). Ainsi, les effets de l'empreinte génomique spécifique au chromosome X ne semble pas avoir un rôle à jouer en ce qui concerne l'incidence élevée des pertes fœtales dans le TS.

Cependant, il a effectivement été démontré que l'empreinte génomique pouvait affecter le phénotype. Une étude indique que les patientes possédant un X^{mat} ont une tendance plus élevée au développement d'anomalies cardiovasculaires et de palmure cervicale que les patientes ayant retenu le X^{pat} (Chu *et al.*, 1994). De plus, une corrélation significative entre la taille avant traitement et la taille maternelle (non pas pour la taille paternelle) a été trouvée chez les filles X^{mat} . Jusqu'ici, les études qui ont tenté de soutenir le rôle potentiel de l'empreinte génomique dans les variations de taille et de poids à la naissance ainsi que de taille adulte des filles atteintes du TS ont échoué (Mathur *et al.*, 1991; Lorda-Sanchez *et al.*, 1992). Toutefois, il se peut que l'absence de corrélation soit due en partie au nombre de patientes étudiées ou à des facteurs qui n'ont pas été considérés, comme la présence de mosaïcisme caché. En ce sens, le nombre de patientes (N=108) et la prudence avec laquelle nous analysons et répartissons les caryotypes constituent la force de notre étude.

Les patientes atteintes du TS sont exposées à des pertes d'audition fréquentes. Celles-ci peuvent être la conséquence de troubles auditifs conductifs ainsi que neuro-sensoriels. À la lumière d'une seule étude, l'origine parentale de l' X ne serait pas le facteur causal de l'occurrence des troubles auditifs rencontrés dans le TS (Sculerati *et al.*, 1996). Encore une fois, aucune attention particulière n'a été portée en ce qui a trait à la discrimination des divers caryotypes et seulement 17 patientes ont statistiquement été analysées (9 X^{mat} : 8 X^{pat}). Nos intérêts sont essentiellement tournés vers les anomalies neuro-sensorielles. Nous pensons qu'il ne faut pas négliger les indications déjà existantes quant à l'importance fonctionnelle de l'empreinte génomique dans le système nerveux (Isles et Wilkinson, 2000). En effet, l'idée que le concept d'empreinte parentale puisse être impliqué dans les différences comportementales et cognitives devient de plus en plus manifeste pour expliquer des conditions comme le TS. Plusieurs constatations renforcent l'hypothèse de l'implication de l'empreinte au niveau neuronal dans le TS.

En effet, non seulement les patientes X^{pat} et X^{mat} présentent des déficits de perception et de mémoire visuospatiales ainsi que de mémoire verbale lorsque comparées à un groupe témoin, mais surtout, les patientes X^{pat} connaissent de meilleures performances que les filles X^{mat} aux tests de QI verbal et d'habiletés inhibitrices tout comme dans leur adaptation sociale (Skuse *et al.*, 1997; Bishop *et al.*, 2000; Skuse, 2000; Donnelly *et al.*, 2000). En se basant sur les observations mises en évidence par les laboratoires de Skuse et de Donnelly, nous pouvons nous attendre à trouver des corrélations en faveur de l'incidence des troubles auditifs neuro-sensoriels et de l'origine parentale du chromosome X intact dans le TS.

3.4.2.2. *Influence de l'origine parentale de l'X intact sur la réponse au traitement à la GH*

Nous ne connaissons pas les causes moléculaires expliquant la variabilité interindividuelle spécifique à la réponse au traitement à la GH observées dans la population TS. L'étude de Tsezou *et al.* est la seule jusqu'ici à avoir tenté de mettre en évidence une corrélation, mais en vain, entre l'origine parentale de l'X intact et la réponse au traitement à la GH (Tsezou *et al.*, 1999). Cependant, cette étude présentait plusieurs lacunes expérimentales. Nous ne pouvons pas passer sous silence des paramètres tels la petite taille de l'échantillon, la façon de regrouper les caryotypes, l'absence de groupe témoin et la courte durée du traitement. De plus, plusieurs facteurs pouvant influencer la vitesse de croissance n'ont en aucune façon été considérés. D'abord, la similitude de la vitesse de croissance entre les groupes de patientes X^{mat} et X^{pat} mesurée pendant les deux premières années du traitement peut être biaisée par la présence d'activité ovarienne spontanée ou de l'adrénarchie (sécrétion d'androgène). L'activité ovarienne associée à une production d'œstrogène est souvent associée aux caryotypes mosaïques possédant du matériel isochromosomique Xq ou encore deux chromosomes X intacts. Inversement, les patientes 45,X sont généralement caractérisées par une dysgénésie ovarienne complète. De plus, l'âge moyen des patientes étudiées était compatible avec l'âge de l'adrénarchie. Dans leur étude, l'évaluation de la corrélation entre l'origine parentale de l'X et la réponse au traitement à la GH a été effectuée à l'aide de 17 patientes (âge chronologique moyen: 9.8 ans) dont 9 seulement

avaient un caryotype 45,X. Ainsi, il est probable que la réponse au traitement à la GH ait été confondue avec la présence ou non de ces facteurs.

Plusieurs de ces points ont été nettement améliorés dans notre étude. D'abord, il est capital d'effectuer spécifiquement les analyses de corrélation sur les caryotypes monosomiques complets. De plus, notre protocole expérimental est constitué d'un groupe témoin non traité et le protocole d'induction pubertaire est standardisé. Nous possédons également l'information concernant la présence ou non de puberté, variable à contrôler dans l'analyse des différents groupes. Finalement, il tient compte du suivi des patientes jusqu'à leur taille adulte, ce qui est préférable pour l'évaluation de la vitesse de croissance.

Jusqu'à maintenant, la première phase de notre étude, qui est de déterminer l'origine parentale du chromosome X intact chez des patientes atteintes du TS, est toujours en cours. La poursuite du projet dépend de la réception et du génotypage de la totalité des échantillons de notre cohorte. Les analyses à venir tenteront dans un premier temps de mettre à jour des corrélations entre l'origine parentale de l'X intact ainsi que le poids et la taille à la naissance, la taille adulte, la réponse au traitement à la GH et la présence de troubles auditifs neuro-sensoriels. Par la suite, d'autres analyses statistiques seront effectuées pour mieux comprendre l'influence du génotype sur la variabilité phénotypique.

Cette étude pourrait s'avérer d'un grand intérêt dans l'amélioration des soins et des coûts de thérapie chez les patientes atteintes du Syndrome de Turner. Elle nous ouvrira la voie sur une meilleure compréhension du concept d'empreinte génomique et vers une caractérisation des gènes associés au chromosome X impliqués dans la variabilité phénotypique du Syndrome de Turner.

CONCLUSION GÉNÉRALE

En conclusion, l’empreinte génomique désigne un phénomène épigénétique complexe conduisant à l’expression préférentielle de certains gènes selon l’origine parentale allélique. Cette régulation génique est particulièrement répandue chez les mammifères placentaires. Elle est en accord avec la notion de non équivalence ou de complémentarité des génomes parentaux. Les gènes soumis à l’empreinte tendent à affecter la croissance fœto-placentaire et le comportement. L’altération des mécanismes de régulation de l’empreinte perturbe le développement et joue un rôle dans plusieurs désordres humains tels le syndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS) et le Syndrome de Turner (TS), sujets de ce mémoire.

Le BWS, caractérisé par une macrosomie pré- et postnatale, des traits dysmorphiques et une prédisposition au développement de tumeurs embryonnaires, est assigné au locus 11p15.5, siège de multiples gènes soumis à l’empreinte. Plusieurs anomalies génétiques sont associées aux cas sporadiques de BWS telles une isodisomie paternelle (UPD) du locus 11p15.5 et des mutations du gène *p57^{KIP2}*; plus souvent, des modifications épigénétiques sont observées, entraînant un profil de méthylation erroné aux loci des centres de contrôle de l’empreinte BWSIC1 et BWSIC2. Il est connu que la perte du profil normal de méthylation, pour l’une ou l’autre de ces régions, est en corrélation avec l’expression biallélique d’*IGF2*, condition *sine qua non* de la surcroissance chez ces patients. La discordance du BWS chez des jumeaux MZ a été décrite pour 18 paires seulement et, jusqu’ici, les mécanismes moléculaires impliqués demeurent inconnus. Nos travaux suggèrent l’hypothèse que des altérations épigénétiques peuvent expliquer la discordance phénotypique des jumeaux MZ. Afin de déterminer la MZ d’une paire de jumelles discordantes, de multiples sites polymorphiques ont été génotypés par RFLP, SSCP et par l’analyse de microsatellites. Le génotypage a confirmé la MZ prédite par l’examen histologique du placenta (présence de membranes monochorioniques et diamniotiques). Aucun indice ne soutient la présence de réarrangement chromosomique ou d’UPD au locus 11p15.5. Les profils

de méthylation au locus BWSIC1 ont été évalués au moyen de la technique de séquençage au bisulfite. Un profil de méthylation biallélique (hyperméthylation) au centre de contrôle BWSIC1 a été uniquement observé chez la jumelle BWS. Nos résultats constituent la première démonstration d'une divergence des profils de méthylation au locus BWSIC1 chez des jumelles MZ discordantes pour le BWS et proposent une étiologie à cette discordance. Ceci suggère que des modifications épigénétiques sont survenues après la fécondation et la division de la masse cellulaire interne (bouton embryonnaire) conduisant à un placenta monochorionique, mais diamnionique. Les événements, qu'ils soient environnementaux ou génétiques (mutation somatique à un autre loci), pouvant être à l'origine des défauts épigénétiques ne sont pas encore connus.

L'autre pathologie humaine étudiée, le TS, résulte d'une monosomie complète ou partielle du chromosome X. La majorité des études ont démontré une prévalence plus élevée pour le caryotype $45,X^{\text{mat}}$ que pour celui $45,X^{\text{pat}}$. À la naissance, les filles TS démontrent déjà un retard de croissance. Par la suite, elles présentent un retard de croissance postnatale et une dysgénésie gonadique. De plus, elles peuvent présenter plusieurs traits dismorphiques et une prédisposition aux malformations cardiaques et rénales. Une variabilité considérable est observée au niveau phénotypique et suite au traitement à l'hormone de croissance (GH). Notre étude vise à déterminer si l'origine parentale du chromosome X chez les patientes $45,X$ influence le poids et la taille à la naissance, la taille adulte, la réponse au traitement à la GH et la présence de troubles auditifs neuro-sensoriels. Afin d'assigner l'origine parentale du chromosome X intact pour 108 patientes TS participant à une étude pan-canadienne (Étude GDCT: *Efficacy of GH treatment to final height in TS*), nous avons fait la mise au point de 2 méthodes de génotypage pour 11 microsatellites hautement polymorphiques spécifiques à l'X. Le génotypage complet, au moyen du sang périphérique des patientes TS et de leur mère biologique, de 22 échantillons a été réalisé. En respectant un pouvoir de discrimination $< 0,001$ pour les patientes ayant retenu le X^{mat} et $< 0,01$ pour les patientes ayant retenu le X^{pat} , nous pouvons confirmer l'origine parentale de l'X. Nos résultats préliminaires démontrent la prédominance de 1.4 fois du X^{mat} sur le X^{pat} . Une fois l'analyse de tous

les échantillons complétée (étude en cours), nous vérifierons statistiquement l'existence d'une relation entre certains traits phénotypiques et l'origine parentale du chromosome X.

BIBLIOGRAPHIE

- Alders, M., Blik, J., Redeker, B., *et al.* Cloning of candidate genes involved in the Beckwith-Wiedemann syndrome and childhood tumors. *Med.Pediatr.Oncol.* 27:495-497, 1996.
- Alders, M., Hodges, M., Hadjantonakis, A.-K., *et al.* The human Achaete-Scute homologue 2 (ASCL2, HASH2) maps to chromosome 11p15.5, close to IGF2 and is expressed in extravillous trophoblasts. *Hum.Mol.Genet.* 6:859-867, 1997.
- Alders, M., Ryan, A., Hodges, M., *et al.* Disruption of a novel imprinted zing-finger gene, ZNF215, in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am.J.Hum.Genet.* 66:1473-1484, 2000.
- Antequera, F. and Bird, A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.* 90:11995-11999, 1993.
- Avner, P. and Heard, E. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat.Genet.* 2:59-67, 2001.
- Barlow, D.P. Methylation and imprinting: from host defense to gene regulation? *Science* 260:309-310, 1993.
- Barlow, D.P. Gametic imprinting in mammals. *Science* 270:1610-1613, 1995.
- Barlow, D.P. Competition--a common motif for the imprinting mechanism? *EMBO J.* 16:6899-6905, 1997.
- Barlow, D.P., Stoeger, R., Hermann, B.G., Saito, K. and Schweifer, N. The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. *Nature* 349:84-87, 1991.

- Beckwith, J. Macroglossia, omphalocele, adrenal cytomegaly, gigantism, and hyperplastic visceromegaly. *Birth Defects Orig.Artic.Ser.* 5:188-196, 1969.
- Bell, A.C. and Felsenfeld, G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene. *Nature* 405:482-485, 2000.
- Berry, A.C., Belton, E.M. and Chantler, C. Monozygotic twins discordant for Wiedemann-Beckwith syndrome and the implications for genetic counselling. *J.Med.Genet.* 17:137-138, 1980.
- Bestor, T.H. Cloning of a mammalian DNA methyltransferase. *Gene* 74:9-12, 1988.
- Bhattacharya, S., Ramchandani, S., Cervoni, N. and Szyf, M. A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* 397:579-583, 1999.
- Binder, G., Koch, A., Wajs, E. and Ranke, M.B. Nested polymerase chain reaction study of 53 cases with Turner's syndrome: is cytogenetically undetected Y mosaicism common? *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 80:3532-3536, 1995.
- Bishop, D.V., Canning, E., Elgar, K., Morris, E., Jacobs, P.A. and Skuse, D.H. Distinctive patterns of memory function in subgroups of females with Turner syndrome: evidence for imprinted loci on the X-chromosome affecting neurodevelopment. *Neuropsychologia* 38:712-721, 2000.
- Blik, J., Maas, S.M., Ruijter, J.M., *et al.* Increased tumour risk for BWS patients correlates with aberrant H19 and not KCNQ1OT1 methylation: occurrence of KCNQ1OT1 hypomethylation in familial cases of BWS. *Hum.Mol.Genet.* 10:467-476, 2001.
- Bose, B., Wilkie, R.A., Madlom, M., Forsyth, J.S. and Faed, M.J. Wiedemann-Beckwith syndrome in one of monozygotic twins. *Arch.Dis.Child* 60:1191-1192, 1985.
- Brannan, C.I. and Bartolomei, M.S. Mechanisms of genomic imprinting. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 9:164-170, 1999.

- Brannan, C.I., Dees, E.C., Ingram, R.S. and Tilghman, S.M. The product of the H19 gene may function as an RNA. *Mol.Cell Biol.* 10:28-36, 1990.
- Brock, D.J.H. Genetic Diseases. In: *Molecular Genetics for the Clinician*, Cambridge University Press, p. 4-25, 1993.
- Brown, K.W., Villar, A.J., Bickmore, W., *et al.* Imprinting mutation in the Beckwith-Wiedemann syndrome leads to biallelic IGF2 expression through an H19-independent pathway. *Hum.Mol.Genet.* 5:2027-2032, 1996.
- Burns, J.L., Jackson, D.A. and Hassan, A.B. A view through the clouds of imprinting. *FASEB J.* 15:1694-1703, 2001.
- Cacciari, E., Mazzanti, L. and The Italian Study Group for Turner Syndrome. Final height of patients with Turner's syndrome treated with growth hormone (GH): Indications for GH therapy alone at high doses and late estrogen therapy. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 84:4510-4515, 1999.
- Caspary, T., Cleary, M.A., Baker, C.C., Guan, X.J. and Tilghman, S.M. Multiple mechanisms regulate imprinting of the mouse distal chromosome 7 gene cluster. *Mol.Cell Biol.* 18:3466-3474, 1998.
- Catchpoole, D., Lam, W.W., Valler, D., *et al.* Epigenetic modification and uniparental inheritance of H19 in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J.Med.Genet.* 34:353-359, 1997.
- Catchpoole, D., Smallwood, A.V., Joyce, J.A., *et al.* Mutation analysis of H19 and NAP1L4 (hNAP2) candidate genes and IGF2 DMR2 in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J.Med.Genet.* 37:212-215, 2000.
- Cheung, W.L., Briggs, S.D. and Allis, C.D. Acetylation and chromosomal functions. *Curr.Opin.Cell Biol.* 12:326-333, 2000.

- Chien, C.H., Lee, J.S., Tsai, W.Y. and Wang, T.R. Wiedemann-Beckwith syndrome with congenital central hypothyroidism in one of monozygotic twins. *J.Formos.Med.Assoc.* 89:132-136, 1990.
- Chu, C.E. and Connor, J.M. Molecular biology of Turner's syndrome. *Arch.Dis.Child* 72:285-286, 1995.
- Chu, C.E., Donaldson, M.D., Kelnar, C.J., *et al.* Possible role of imprinting in the Turner phenotype. *J.Med.Genet.* 31:840-842, 1994.
- Clark, S.J., Harrison, J., Paul, C.L. and Frommer, M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic.Acids.Res.* 22:2990-2997, 1994.
- Clayton-Smith, J., Read, A.P. and Donnai, D. Monozygotic twinning and Wiedemann-Beckwith syndrome. *Am.J.Med.Genet.* 42:633-637, 1992.
- Cohen, P. Hyperpituitarism, Tall stature, and overgrowth syndrome. In: *Nelson Textbook of Pediatrics*, Edited by Behrman, R.E., Kliegman, R.M. and Jenson, H.B. Philadelphia: W.B. Saunders Company, pp. 1685-1687, 2000.
- Crum, C.P. Female Genital Tract. In: *Robbins Pathologic Basis of Disease*, Edited by Cotran, R.S., Kumar, V., Robbins, S.L. and Schoen, F.J. Philadelphia: W.B. Saunders Company, pp. 1033-1088, 1994.
- Dacou-Voutetakis, C., Karavanaki-Karanassiou, K., Petrou, V., Georgopoulos, N., Maniati-Christidi, M. and Mavrou, A. The growth pattern and final height of girls with Turner syndrome with and without human growth hormone treatment. *Pediatrics* 101:663-668, 1998.
- Dao, D., Walsh, C.P., Yuan, L., *et al.* Multipoint analysis of human chromosome 11p15/mouse distal chromosome 7: inclusion of H19/IGF2 in the minimal WT2 region, gene specificity of H19 silencing in Wilms' tumorigenesis and methylation hyper-dependence of H19 imprinting. *Hum.Mol.Genet.* 8:1337-1352, 1999.

- Davenport, M.L., Punyasavatsut, N., Gunther, D., Savendahl, L. and Stewart, P.W. Turner syndrome: a pattern of early growth failure. *Acta Paediatr.Suppl.* 88:118-121, 1999.
- Davis, G.H., Dodds, K.G., Wheeler, R. and Jay, N.P. Evidence that an imprinted gene on the X Chromosome increases ovulation rate in sheep. *Biol.Reprod.* 64:216-221, 2001.
- De Groot, N. and Hochberg, A. Gene imprinting during placental and embryonic development. *Mol.Reprod.Dev.* 36:390-406, 1993.
- Deal, C., Paquette, J., Drews, R., Lagacé, G. and Collu, R. Studies on the genomic imprinting of genes at the 11p15.5 locus: Bi-allelic expression of *Hras*. *The Endocrine Society* 1993.
- Deal, C.L. Parental genomic imprinting. *Curr.Opin.Pediatr.* 7:445-458, 1995.
- DeChiara, T.M., Robertson, E.J. and Efstratiadis, A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* 64:849-859, 1991.
- Donaldson, M.D.C. Unresolved problems in the treatment of short stature for Turner syndrome. *Intern.Growth Monitor* 8:2-9, 1998.
- Donnelly, S.L., Wolpert, C.M., Menold, M.M., *et al.* Female with autistic disorder and monosomy X (Turner Syndrome): Parent-of-origin effect of the X chromosome. *Am.J.Med.Genet.* 96:312-316, 2000.
- Elias, E.R., DeBaun, M.R. and Feinberg, A.P. Beckwith-Wiedemann Syndrome. In: *Principles of Molecular Medicine*, Edited by Jameson, J.L. Humana Press, pp. 1047-1052, 1998.
- Elliott, M., Bayly, R., Cole, T., Temple, I.K. and Maher, E.R. Clinical features and natural history of Beckwith-Wiedemann syndrome: presentation of 74 new cases. *Clin.Genet.* 46:168-174, 1994.

- Elliott, M. and Maher, E.R. Beckwith-Wiedemann syndrome. *J.Med.Genet.* 31:560-564, 1994.
- Ellison, J.W., Wardak, Z., Young, M.F., Gehron, R.P., Laig-Webster, M. and Chiong, W. PHOG, a candidate gene for involvement in the short stature of Turner syndrome. *Hum.Mol.Genet.* 6:1341-1347, 1997.
- Engel, J.R., Smallwood, A., Harper, A., *et al.* Epigenotype-phenotype correlations in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J.Med.Genet.* 37:921-926, 2000.
- Engemann, S., Strodicke, M., Paulsen, M., *et al.* Sequence and functional comparison in the Beckwith-Wiedemann region: implications for a novel imprinting centre and extended imprinting. *Hum.Mol.Genet.* 9:2691-2706, 2000.
- Falls, J.G., Pulford, D.J., Wylie, A.A. and Jirtle, R.L. Genomic imprinting: implications for human disease. *Am.J.Pathol.* 154:635-647, 1999.
- Feinberg, A.P. *Genomic Imprinting: The Genetic Basis of Human Cancer.*, New York:McGraw-Hill Health Professions Division, pp. 95-107, 1998.
- Feinberg, A.P. The two-domain hypothesis in Beckwith-wiedemann syndrome. *The J.Clin.Invest.* 106:739-740, 2000.
- Ford, C.E., Jones, K.W., Polani, P.E., de Almeida, J.C. and Brigg, J.H. A sex chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's Syndrome). *Lancet* 1:711-713, 1959.
- Franceschini, P., Guala, A., Vardeu, M.P. and Franceschini, D. Monozygotic twinning and Wiedemann-Beckwith syndrome. *Am.J.Med.Genet.* 46:353-354, 1993.
- Frevel, M.A., Hornberg, J.J. and Reeve, A.E. A potential imprint control element identification of a conserved 42 bp sequence unstream of H19. *Trends Genet.* 15:216-218, 1999a.

- Frevel, M.A., Sowerby, S.J., Petersen, G.B. and Reeve, A.E. Methylation sequencing analysis refines the region of H19 epimutation in Wilms' tumor. *J.Biol.Chem.* 274:29331-29340, 1999b.
- Fulmer-Smentek, S.B. and Francke, U. Association of acetylated histones with paternally expressed genes in the Prader-Willi deletion region. *Hum.Mol.Genet.* 10:645-652, 2001.
- Gaitanou, M., Buanne, P., Pappa, C., *et al.* Cloning, expression and localization of human BM88 shows that it maps to chromosome 11p15.5, a region implicated in Beckwith-Wiedeman syndrome and tumorigenesis. *Biochem.J.* 355:715-724, 2001.
- Gaston, V., Le Bouc, Y., Soupre, V., *et al.* Analysis of the methylation status of the KCNQ1OT and H19 genes in leukocyte DNA for the diagnosis and prognosis of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur.J.Hum.Genet.* 9:409-418, 2001.
- Giannoukakis, N., Deal, C., Paquette, J., Goodyer, C.G. and Polychronakos, C. Parental genomic imprinting of the human IGF2 gene. *Nat.Genet.* 4:98-101, 1993.
- Gicquel, C., Gaston, V., Cabrol, S. and Le Bouc, Y. Assessment of Turner's syndrome by molecular analysis of the X chromosome in growth-retarded girls. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 83:1472-1476, 1998.
- Goto, T. and Monk, M. Regulation of X-chromosome inactivation in development in mice and humans. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 62:362-378, 1998.
- Grandjean, V., Smith, J., Schofield, P.N. and Ferguson-Smith, A.C. Increased IGF-II protein affects p57Kip2 in vivo and in vitro: Implications for Beckwith-Wiedemann syndrome. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.* 97:5279-5284, 2000.
- Gravholt, C.H., Juul, S., Naeraa, R.W. and Hansen, J. Prenatal and postnatal prevalence of Turner's syndrome: a registry study. *BMJ.* 312:16-21, 1996.

- Gravholt, C.H., Juul, S., Naeraa, R.W. and Hansen, J. Morbidity in Turner syndrome. *J.Clin.Epidemiol.* 51:147-158, 1998.
- Grumbach, M.M. and Conte, F.A. Disorders of Sex Differentiation. In: *Williams Textbook of Endocrinology*, Edited by Wilson and Foster, pp. 891-899, 1992.
- Hall, J.G. Genomic imprinting: review and relevance to human diseases. *Am.J.Hum.Genet.* 46:857-873, 1990.
- Hall, J.G. Twinning: mechanisms and genetic implications. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 6:343-347, 1996.
- Hao, Y., Crenshaw, T., Moulton, T., Newcomb, E. and Tycko, B. Tumour-suppressor activity of H19 RNA. *Nature* 365:764-767, 1993.
- Hark, A.T., Schoenherr, C.J., Katz, D.J., Ingram, R.S., Levorse, J.M. and Tilghman, S.M. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* 405:486-489, 2000.
- Hark, A.T. and Tilghman, S.M. Chromatin conformation of the H19 epigenetic mark. *Hum.Mol.Genet.* 7:1979-1985, 1998.
- Harper, J.W. and Elledge, S.J. Cdk inhibitors in development and cancer. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 6:56-64, 1996.
- Hassold, T., Benham, F. and Leppert, M. Cytogenetic and molecular analysis of sex-chromosome monosomy. *Am.J.Hum.Genet.* 42:534-541, 1988.
- Hassold, T., Pettay, D., Robinson, A. and Uchida, I. Molecular studies of parental origin and mosaicism in 45,X conceptuses. *Hum.Genet.* 89:647-652, 1992.
- Hatada, I., Nabetani, A., Morisaki, H., *et al.* New p57KIP2 mutations in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum.Genet.* 100:681-683, 1997.
- Hatada, I., Ohashi, H., Fukushima, Y., *et al.* An imprinted gene p57KIP2 is mutated in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nat.Genet.* 14:171-173, 1996.

- Hedborg, F., Holmgren, L., Sandstedt, B. and Ohlsson, R. The cell type-specific IGF2 expression during early human development correlates to the pattern of overgrowth and neoplasia in the Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am.J.Pathol.* 145:802-817, 1994.
- Henry, I., Bonaiti-Pellie, C., Chehensse, V., *et al.* Uniparental paternal disomy in a genetic cancer-predisposing syndrome. *Nature* 351:665-667, 1991.
- Henry, I., Puech, A., Riesewijk, A., *et al.* Somatic mosaicism for partial paternal isodisomy in Wiedemann-Beckwith syndrome: a post-fertilization event. *Eur.J.Hum.Genet.* 1:19-29, 1993.
- Hochberg, Z. and Zadik, Z. Final height in young women with Turner syndrome after GH therapy: an open controlled study. *Eur.J.Endocrinol.* 141:218-224, 1999.
- Holthuizen, P.E., Steenbergh, P.H. and Sussenbach, J.S. Regulation of IGF Gene Expression. In: *The IGF System: Molecular Biology, Physiology, and Clinical Applications*, Edited by Rosenfeld, R.G. and Roberts, C.T.Jr. Totowa: Humana Press Inc., pp. 37-61, 1999.
- Hoovers, J.M.N., Kalikin, L.M., Johnson, L.A., *et al.* Multiple genetic loci within 11p15 defined by Beckwith-Wiedemann syndrome rearrangement breakpoints and subchromosomal transferable fragments. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.* 92:12456-12460, 1995.
- Horike, S., Mitsuya, K., Meguro, M., *et al.* Targeted disruption of the human LIT1 locus defines a putative imprinting control element playing an essential role in beckwith-wiedemann syndrome. *Hum.Mol.Genet.* 9:2075-2083, 2000.
- Howell, C.Y., Bestor, T.H., Ding, F., *et al.* Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 Gene. *Cell* 104:829-838, 2001.
- Hsieh, C.L. Dynamics of DNA methylation pattern. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 10:224-228, 2000.

- Hurst, L.D. and McVean, G.T. Do we understand the evolution of genomic imprinting? *Curr.Opin.Genet.Dev.* 8:701-708, 1998.
- Hurst, L.D. and Smith, N.G. Molecular evolutionary evidence that H19 mRNA is functional. *Trends Genet.* 15:134-135, 1999.
- Isles, A.R. and Wilkinson, L.S. Imprinted genes, cognition and behaviour. *Trends Cognitive Sc.* 4:309-318, 2000.
- Itoh, N., Becroft, D.M., Reeve, A.E. and Morison, I.M. Proportion of cells with paternal 11p15 uniparental disomy correlates with organ enlargement in Wiedemann-Beckwith syndrome. *Am.J.Med.Genet.* 92:111-116, 2000.
- Jacobs, P.A., Betts, P.R., Cockwell, A.E., *et al.* A cytogenetic and molecular reappraisal of a series of patients with Turner's syndrome. *Ann.Hum.Genet.* 54:209-223, 1990.
- Jaenisch, R., Schnieke, A. and Harbers, K. Treatment of mice with 5-aza-cytidine efficiently activates silent retroviral genomes in different tissues. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.* 82:1451-1455, 1985.
- Jamieson, R.V., Tam, P.P. and Gardiner-Garden, M. X-chromosome activity: impact of imprinting and chromatin structure. *Int.J.Dev.Biol.* 40:1065-1080, 1996.
- Jinno, Y., Sengoku, K., Nakao, M., *et al.* Mouse/human sequence divergence in a region with a paternal-specific methylation imprint at the human H19 locus. *Hum.Mol.Genet.* 5:1155-1161, 1996.
- Jirtle, R. L. <http://www.geneimprint.com> (2000).
- Jirtle, R.L., Sander, M. and Barrett, J.C. Genomic imprinting and environmental disease susceptibility. *Environ.Health Perspect.* 108:271-278, 2000.

- John, R.M., Ainscough, J.F.X., Barton, S.C. and Surani, M.A. Distant cis-element regulate imprinted expression of the mouse p57kip2 (Cdkn1c) gene: implications for the human disorder, Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum.Mol.Genet.* 10:1601-1609, 2001.
- John, R.M., Hodges, M., Little, P., Barton, S.C. and Surani, M.A. A human p57(KIP2) transgene is not activated by passage through the maternal mouse germline. *Hum.Mol.Genet.* 8:2211-2219, 1999.
- John, R.M. and Surani, M.A. Genomic imprinting, mammalian evolution, and the mystery of egg-laying mammals. *Cell* 101:585-588, 2000.
- John, S.W., Weitzner, G., Rozen, R. and Sriver C.R. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic.Acids.Res.* 19:408, 1991.
- Jones, P.L., Veenstra, G.J., Wade, P.A., *et al.* Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat.Genet.* 19:187-191, 1998.
- Jong, M.T., Gray, T.A., Ji, Y., *et al.* A novel imprinted gene, encoding a RING zinc-finger protein, and overlapping antisense transcript in the Prader-Willi syndrome critical region. *Hum.Mol.Genet.* 8:783-793, 1999.
- Joyce, J.A., Lam, W.K., Catchpoole, D.J., *et al.* Imprinting of IGF2 and H19: lack of reciprocity in sporadic Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum.Mol.Genet.* 6:1543-1548, 1997.
- Julier, C., Hyer, R.N., Davies, J., *et al.* Insulin-IGF2 region on chromosome 11p encodes a gene implicated in HLA-DR4-dependent diabetes susceptibility. *Nature* 354:155-159, 1991.

- Keith, L. and Machin, G. Zygosity testing: current status and evolving issues. *J.Reprod.Med.* 42:699-707, 1997.
- Killian, J.K., Byrd, J.C., Jirtle, J.V., *et al.* M6P/IGF2R imprinting evolution in mammals. *Mol.Cell* 5:707-716, 2000.
- Kocova, M., Siegel, S.F., Wenger, S.L., Lee, P.A. and Trucco, M. Detection of Y chromosome sequences in Turner's syndrome by Southern blot analysis of amplified DNA. *Lancet* 342:140-143, 1993.
- Kono, T., Obata, Y., Yoshimzu, T., Nakahara, T. and Carroll, J. Epigenetic modifications during oocyte growth correlates with extended parthenogenetic development in the mouse. *Nat.Genet.* 13:91-94, 1996.
- Kosho, T., Muroya, K., Nagai, T., *et al.* Skeletal features and growth patterns in 14 patients with haploinsufficiency of SHOX: implications for the development of Turner syndrome. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 84:4613-4621, 1999.
- Koufos, A., Grundy, P., Morgan, K., *et al.* Familial Wiedemann-Beckwith syndrome and a second Wilms' tumor locus both map to 11p15.5. *Am.J.Hum.Genet.* 44:711-719, 1989.
- Lalande, M. Parental imprinting and human disease. *Annu.Rev.Genet.* 30:173-195, 1997.
- Lam, W.W., Hatada, I., Ohishi, S., *et al.* Analysis of germline CDKN1C (p57KIP2) mutations in familial and sporadic Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) provides a novel genotype-phenotype correlation. *J.Med.Genet.* 36:518-523, 1999.
- Lawler, S.D. Genetic studies on hydatidiform moles. *Adv.Exp.Med.Biol.* 176:147-161, 1984.

- Lee, M.P., Brandenburg, S., Landes, G.M., Adams, M., Miller, G. and Feinberg, A.P. Two novel genes in the center of the 11p15 imprinted domain escape genomic imprinting. *Hum.Mol.Genet.* 8:683-690, 1999a.
- Lee, M.P., DeBaun, M., Randhawa, G., Reichard, B.A., Elledge, S.J. and Feinberg, A.P. Low frequency of p57KIP2 mutation in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am.J.Hum.Genet.* 61:304-309, 1997a.
- Lee, M.P., DeBaun, M.R., Mitsuya, K., *et al.* Loss of imprinting of a paternally expressed transcript, with antisense orientation to KVLQT1, occurs frequently in Beckwith-Wiedemann syndrome and is independent of insulin-like growth factor II imprinting. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.* 96:5203-5208, 1999b.
- Lee, M.P., Hu, R.J., Johnson, L.A. and Feinberg, A.P. Human KVLQT1 gene shows tissue-specific imprinting and encompasses Beckwith-Wiedemann syndrome chromosomal rearrangements. *Nat.Genet.* 15:181-185, 1997b.
- Lee, M.P., Reeves, C., Schmitt, A., *et al.* Somatic mutation of TSSC5, a novel imprinted gene from human chromosome 11p15.5. *Cancer Res.* 58:4155-4159, 1998.
- Leighton, P.A., Ingram, R.S., Eggenschwiler, J., Efstratiadis, A. and Tilghman, S.M. Disruption of imprinting caused by deletion of the H19 gene region in mice *Nature* 375:34-39, 1995.
- Leonard, N.J., Bernier, F.P., Rudd, N., *et al.* Two pairs of male monozygotic twins discordant for Wiedemann-Beckwith syndrome. *Am.J.Med.Genet.* 61:253-257, 1996.
- Li, E., Beard, C. and Jaenisch, R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 366:362-365, 1993.
- Li, E., Bester, T.H. and Jaenisch, R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69:915-926, 1992.

- Li, M., Squire, J., Shuman, C., *et al.* Imprinting status of 11p15 genes in Beckwith-Wiedemann syndrome patients with CDKN1C mutations. *Genomics* 74:370-376, 2001.
- Li, M., Squire, J.A. and Weksberg, R. Molecular genetics of Wiedemann-Beckwith syndrome. *Am.J.Med.Genet.* 79:253-259, 1998.
- Li, Y.M., Franklin, G., Cui, H.M., *et al.* The H19 transcript is associated with polysomes and may regulate IGF2 expression in trans. *J.Biol.Chem.* 273:28247-28252, 1998.
- Linder, D., McCaw, B.K. and Hecht, F. Parthenogenic origin of benign ovarian teratomas. *N.Engl.J.Med.* 292:63-66, 1975.
- Litt, M., Hauge, X. and Sharma, K. Shadow Bands Seen When Typing Polymorphic Dinucleotide Repeats: Some Causes and Cures. *Biotechniques* 15:280-284, 1993.
- Litz, C.E., Taylor, K.A., Qiu, J.S., Pescovitz, O.H. and de Martinville, B. Absence of detectable chromosomal and molecular abnormalities in monozygotic twins discordant for the Wiedemann-Beckwith syndrome. *Am.J.Med.Genet.* 30:821-833, 1988.
- Lopez, M., Canto, P., Aguinaga, M., *et al.* Frequency of Y chromosomal material in Mexican patients with Ullrich-Turner syndrome. *Am.J.Med.Genet.* 76:120-124, 1998.
- Lorda-Sanchez, I., Binkert, F., Maechler, M. and Schinzel, A. Molecular study of 45,X conceptuses: correlation with clinical findings. *Am.J.Med.Genet.* 42:487-490, 1992.
- Lubinsky, M.S. and Hall, J.G. Genomic imprinting, monozygous twinning, and X inactivation. *Lancet* 337(8752):1288, 1991.

- Luoh, S.W., Bain, P.A., Polakiewicz, R.D., *et al.* Zfx mutation results in small animal size and reduced germ cell number in male and female mice. *Development* 124:2275-2284, 1997.
- Lyon, A.J., Preece, M.A. and Grant, D.B. Growth curve for girls with Turner syndrome. *Arch.Dis.Child* 60:932-935, 1985.
- Machin, G. Some causes of genotypic and phenotypic discordance in monozygotic twin pairs. *Am.J.Med.Genet.* 61:216-228, 1996.
- Maher, E.R. and Reik, W. Beckwith-Wiedemann syndrome: imprinting in clusters revisited. *J.Clin.Invest.* 105:247-252, 2000.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. Molecular cloning : a laboratory manual. Second Edition (Tome 3), Cold Harbor Laboratory Press, Appendix E-38, 1989.
- Manji, S.S., Parker, N.J., Williams, R.T., *et al.* STIM1: a novel phosphoprotein located at the cell surface. *Biochim.Biophys.Acta* 1481:147-155, 2000.
- Mannens, M., Hoovers, J.M., Redeker, E., *et al.* Parental imprinting of human chromosome region 11p15.3-pter involved in the Beckwith-Wiedemann syndrome and various human neoplasia. *Eur.J.Hum.Genet.* 2:3-23, 1994.
- Martinez y Martinez, R., Martinez-Carboney, R., Ocampo-Campos, R., *et al.* Wiedemann-Beckwith syndrome: clinical, cytogenetical and radiological observations in 39 new cases. *Genet.Couns.* 3:67-76, 1992.
- Mathur, A., Stekol, L., Schatz, D., Maclaren, N.K., Scott, M.L. and Lippe, B. The parental origin of the single X chromosome in Turner syndrome: lack of correlation with parental age or clinical phenotype. *Am.J.Hum.Genet.* 48:682-686, 1991.
- Matsuoka, S., Edwards, M.C., Bai, C., *et al.* p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev.* 9:650-662, 1995.

- Matsuoka, S., Thompson, J.S., Edwards, M.C., *et al.* Imprinting of the gene encoding a human cyclin-dependent kinase inhibitor, p57KIP2, on chromosome 11p15. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.* 93:3026-3030, 1996.
- McGrath, J. and Solter, D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 37:179-183, 1984.
- Mertineit, C., Yolder, J.A., Taketo, T., Laird, D.W., Trasler, J.M. and Bestor, T.H. Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells. *Development* 125:889-897, 1998.
- Migeon, B.R., Jeppesen, P., Torchia, B.S., *et al.* Lack of X inactivation associated with maternal X isodisomy: evidence for a counting mechanism prior to X inactivation during human embryogenesis. *Am.J.Hum.Genet.* 58:161-170, 1996.
- Migeon, B.R., Luo, S., Stasiowski, B.A., *et al.* Deficient transcription of XIST from tiny ring X chromosomes in females with severe phenotypes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90:12025-12029, 1993.
- Miller, A.P. and Willard, H.F. Chromosomal basis of X chromosome inactivation: identification of a multigen domain Xp11.21-p11.22 that escapes X inactivation. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.* 95:8709-8714, 1998.
- Mitsuya, K., Meguro, M., Lee, M.P., *et al.* LIT1, an imprinted antisense RNA in the human KvLQT1 locus identified by screening for differentially expressed transcripts using monochromosomal hybrids. *Hum.Mol.Genet.* 8:1209-1217, 1999.
- Moore, G.E., Abu-Amero, S.N., Bell, G., *et al.* Evidence that insulin is imprinted in the human yolk sac. *Diabetes* 50:199-202, 2001.
- Moore, T., Constancia, M., Zubair, M., *et al.* Multiple imprinted sense and antisense transcripts, differential methylation and tandem repeats in a putative imprinting control region upstream of mouse Igf2. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.* 94:12509-12514, 1997.

- Morison, I.M. and Reeve, A.E. A catalogue of imprinted genes and parent-of-origin effects in humans and animals. *Hum.Mol.Genet.* 7:1599-1609, 1998a.
- Morison, I.M. and Reeve, A.E. Insulin-like growth factor 2 and overgrowth: molecular biology and clinical implications. *Mol.Med.Today* 4:110-115, 1998b.
- Moulton, T., Crenshaw, T., Hao, Y., *et al.* Epigenetic lesions at the H19 locus in Wilms' tumour patients. *Nat.Genet.* 7:440-447, 1994.
- Moutou, C., Junien, C., Henry, I. and Bonaiti-Pellie, C. Beckwith-Wiedemann syndrome: a demonstration of the mechanisms responsible for the excess of transmitting females. *J.Med.Genet.* 29:217-220, 1992.
- Muller, S., van den Boom, D., Zirkel, D., *et al.* Retention of imprinting of the human apoptosis-related gene TSSC3 in human brain tumors. *Hum.Mol.Genet.* 9:757-763, 2000.
- Munns, C.F.J. and Batch, J.A. Hyperinsulinism and Beckwith-Wiedemann syndrome. *Arch.Di* 84:F67-F69, 2001.
- Nagahama, H., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Nagata, M. and Tomita, K. Spatial and temporal expression patterns of the cyclin dependant Kinase (CDK) Inhibitors p27Kip1 and p57Kip2 During Mouse Development. *Anat.Embryol.(Berl.)* 203:77-87, 2001.
- Nan, X., Ng, H.-H., Johnson, C.A., *et al.* Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCp2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393:386-389, 1998.
- Nathwani, N.C., Unwin, R., Brook, C.G.D. and Hindmarsh, P.C. The influence of renal and cardiovascular abnormalities on blood pressure in Turner Syndrome. *Clin.Endocrinol.* 52:371-377, 2000.

- Newell-Price, J., Clark, A.J.L. and King, P. DNA methylation and silencing of gene expression. *Trends Endocrinol.Metab.* 11:142-148, 2000.
- Neyroud, N., Richard, P., Vignier, N., *et al.* Genomic organization of the KCNQ1 K⁺ channel gene and identification of c-terminal mutations in the Long-QT syndrome. *Circ.Res.* 84:290-297, 1999.
- Ng, H.-H., Zhang, Y., Hendrich, B., *et al.* MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat.Genet.* 23:58-61, 1999.
- Nicholls, R.D., Saitoh, S. and Horsthemke, B. Imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Trends Genet.* 14:194-200, 1998.
- Nijhuis-van der Sanden, R.W., Smits-Engelsman, B.C. and Eling, P.A. Motor performance in girls with Turner syndrome. *Dev.Med.Child Neurol.* 42:685-690, 2000.
- O'Keefe, D., Dao, D., Zhao, L., *et al.* Coding mutations in p57KIP2 are present in some cases of Beckwith-Wiedemann syndrome but are rare or absent in Wilms' tumors. *Am.J.Hum.Genet.* 61:295-303, 1997.
- Obata, Y., Kaneko-Ishino, T., Koide, T., *et al.* Disruption of primary imprinting during oocyte growth leads to the modified expression of imprinted genes during embryogenesis. *Development* 125:1553-1560, 1998.
- Ogata, T. and Matsuo, N. Turner syndrome and female sex chromosome aberrations: deduction of the principal factors involved in the development of clinical features. *Hum.Genet.* 95:607-629, 1995.
- Ogata, T., Matsuo, N. and Nishimura, G. SHOX haploinsufficiency and overdosage: impact of gonadal function status. *J.Med.Genet.* 38:1-6, 2001.
- Ogawa, O., Becroft, D.M., Morison, I.M., *et al.* Constitutional relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting associated with Wilms' tumour and gigantism. *Nat.Genet.* 5:408-412, 1993.

- Ogura, A., Susuki, O., Tanemura, K., Mochida, K., Kobayashi, Y. and Matsuda, J. Development of normal mice from metaphase I oocytes fertilized with primary spermatocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.* 95:5611-5615, 1998.
- Ohlsson, R., Hedborg, F., Holmgren, L., Walsh, C. and Ekstrom, T.J. Overlapping patterns of IGF2 and H19 expression during human development: biallelic IGF2 expression correlates with lack of H19 expression. *Development* 120:361-368, 1994.
- Ohlsson, R., Nystrom, A., Pfeifer-Ohlsson, S., *et al.* IGF2 is parentally imprinted during human embryogenesis and in the Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nat.Genet.* 4:94-97, 1993.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A. and Li, E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99:247-257, 1999.
- Olney, A.H., Buehler, B.A. and Waziri, M. Wiedemann-Beckwith syndrome in apparently discordant monozygotic twins. *Am.J.Med.Genet.* 29:491-499, 1988.
- OMIM. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>
- Orstavik, R.E., Tommerup, N., Eiklid, K. and Orstavik, K.H. Non-random X chromosome inactivation in an affected twin in a monozygotic twin pair discordant for Wiedemann-Beckwith syndrome. *Am.J.Med.Genet.* 56:210-214, 1995.
- Paldi, A. and Jami, J. L'empreinte génomique: complémentarité fonctionnelle des deux génomes parentaux. *Médecine Sc.* 7:247-254, 1991.
- Paquette, J., Giannoukakis, N., Polychronakos, C., Vafiadis, P. and Deal, C. The INS 5' variable number of tandem repeats is associated with IGF2 expression in humans. *J.Biol.Chem.* 273:14158-14164, 1998.

- Patsalis, P.C., Sismani, C., Hadjimarcou, M.I., *et al.* Detection and incidence of cryptic Y chromosome sequences in Turner syndrome patients. *Clin.Genet.* 53:249-257, 1998.
- Paulsen, M., El-Maarri, O., Engemann, S., *et al.* Sequence conservation and variability of imprinting in the Beckwith-Wiedemann syndrome gene cluster in human and mouse. *Hum.Mol.Genet.* 9:1829-1841, 2000.
- Pedone, P.V., Pikaart, M.J., Cerrato, F., *et al.* Role of histone acetylation and DNA methylation in the maintenance of the imprinted expression of the H19 and Igf2 genes. *FEBS Lett.* 458:45-50, 1999.
- Pfeifer, K. Mechanisms of genomic imprinting. *Am.J.Hum.Genet.* 67:777-787, 2000.
- Ping, A.J., Reeve, A.E., Law, D.J., Young, M.R., Boehnke, M. and Feinberg, A.P. Genetic linkage of Beckwith-Wiedemann syndrome to 11p15. *Am.J.Hum.Genet.* 44:720-723, 1989.
- Prawitt, D., Enklaar, T., Klemm, G., *et al.* Identification and characterization of MTR1, a novel gene with homology to melastatin (MLSN1) and the trp gene family located in the BWS-WT2 critical region on chromosome 11p15.5 and showing allele-specific expression. *Hum.Mol.Genet.* 9:203-216, 2000.
- Preece, M.A. and Moore, G.E. Genomic imprinting, uniparental disomy and foetal growth. *Trends Endocrinol.Metab.* 11:270-275, 2000.
- Rainier, S., Johnson, L.A., Dobry, C.J., Ping, A.J., Grundy, P.E. and Feinberg, A.P. Relaxation of imprinted genes in human cancer. *Nature* 362:747-749, 1993.
- Rao, E., Weiss, B., Fukami, M., *et al.* Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat.Genet.* 16:54-63, 1997.
- Razin, A. and Cedar, H. DNA methylation and genomic imprinting. *Cell* 77:473-476, 1994.

- Reeve, A.E., Eccles, M.R., Wilkin, R.J., Bell, G.I. and Millow, L.J. Expression of insulin-like growth factor II transcripts in Wilms' tumour. *Nature* 317:258-260, 1985.
- Reik, W., Brown, K.W., Schneid, H., Le Bouc, Y., Bickmore, W. and Maher, E.R. Imprinting mutations in the Beckwith-Wiedemann syndrome suggested by altered imprinting pattern in the IGF2-H19 domain. *Hum.Mol.Genet.* 4:2379-2385, 1995.
- Reik, W. and Maher, E.R. Imprinting in clusters: lessons from Beckwith-Wiedemann syndrome. *Trends Genet.* 13:330-334, 1997.
- Reik, W. and Walter, J. Imprinting mechanisms in mammals. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 8:154-164, 1998.
- Reik, W. and Walter, J. Genomic Imprinting: parental influence on the genome. *Nature Reviews: Genetics* 2:21-32, 2001.
- Richards, C.S., Watkins, S.C., Hoffman, E.P., *et al.* Skewed X Inactivation in a female MZ twin results in Duchenne Muscular Dystrophy. *Am.J.Med.Genet.* 46:672-681, 1990.
- Rochiccioli, P., David, M., Malpuech, G., *et al.* Study of final height in Turner's syndrome: ethnic and genetic influences. *Acta Paediatr.* 83:305-308, 1994.
- Rosenfeld, R.G., Attie, K.M., Frane, J., *et al.* Growth hormone therapy of Turner's syndrome: beneficial effect on adult height. *J.Pediatr.* 132:319-324, 1998.
- Ross, J.L., Feuillan, P., Kushner, H., Roeltgen, D. and Cutler, G.B.J. Absence of growth hormone effects on cognitive function in girls with Turner syndrome. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 82:1814-1817, 1997.
- Rotwein, P. Molecular Biology of IGF-I and IGF-II. In: *The IGF System: Molecular Biology, Physiology, and Clinical Applications*, Edited by Rosenfeld, R.G. and Roberts, C.T.Jr. Totowa: Humana Press Inc., pp. 19-35, 1999.

- Rougeulle, C., Cardoso, C., Fontes, M., Colleaux, L. and Lalonde, M. An imprinted antisense RNA overlaps UBE3A and a second maternally expressed transcript. *Nat.Genet.* 19:15-16, 1998.
- Rovet, J.F. Caractéristiques psychologiques des fillettes atteintes du Syndrome de Turner. *Contemporary Pediatrics* 1992.
- Runge, S., Nielsen, F.C., Nielsen, J., Lykke-Andersen, J., Wewer, U.M. and Christiansen, J. H19 RNA binds four molecules of insulin-like growth factor II mRNA-binding protein. *J.Biol.Chem.* 275:29562-29569, 2000.
- Saenger, P. Turner's syndrome. *N.Engl.J.Med.* 335:1749-1754, 1996.
- Schneid, H., Seurin, D., Vazquez, M.P., Gourmelen, M., Cabrol, S. and Le Bouc, Y. Parental allele specific methylation of the human insulin-like growth factor II gene and Beckwith-Wiedemann syndrome. *J.Med.Genet.* 30:353-362, 1993.
- Sculerati, N., Oddoux, C., Clayton, C.M., Lim, J.W. and Oster, H. Hearing loss in Turner syndrome. *Laryngoscope* 106:992-997, 1996.
- Sekiya, T., Fushimi, M., Hori, H., Hirohashi, S. and Sugimura, T. Molecular cloning and the total nucleotide sequence of the human c-Ha-ras-1 gene activated in a melanoma from a Japanese patient. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.* 81:4771-4775, 1984.
- Simon, I., Tenzen, T., Reubinoff, B.E., Hillman, D., McCarrey, J.R. and Cedar, H. Asynchronous replication of imprinted genes is established in the gametes and maintained during development. *Nature* 401:929-932, 1999.
- Skuse, D.H. Imprinting, the X-chromosome, and the male brain: explaining sex differences in the liability to autism. *Pediatr.Res.* 47:9-16, 2000.
- Skuse, D.H., James, R.S., Bishop, D.V., *et al.* Evidence from Turner's syndrome of an imprinted X-linked locus affecting cognitive function. *Nature* 387:705-708, 1997.

- Sleutels, F., Barlow, D.P. and Lyle, R. The uniqueness of the imprinting mechanism. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 10:229-233, 2000.
- Smilnich, N.J., Day, C.D., Fitzpatrick, G.V., *et al.* A maternally methylated CpG island in KvLQT1 is associated with an antisense paternal transcript and loss of imprinting in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.* 96:8064-8069, 1999.
- Solter, D. Differential imprinting and expression of maternal and paternal genomes. *Annu.Rev.Genet.* 22:127-146, 1988.
- Sperling, M.A. Hypoglycemia. In: *Nelson Textbook of Pediatrics*, Edited by Behrman, R.E., Kliegman, R.M. and Jenson, H.B. Philadelphia: W.B. Saunders Company, pp. 439-450, 2000.
- Stewart, C.E.H. and Rotwein, P. Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol.Rev.* 76:1005-1026, 1996.
- Sun, F.L., Dean, W.L., Kelsey, G., Allen, N.D. and Reik, W. Transactivation of Igf2 in a mouse model of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature* 389:809-815, 1997.
- Surani, M.A. Imprinting and the initiation of gene silencing in the germ line. *Cell* 93:309-312, 1998.
- Surani, M.A., Barton, S.C. and Norris, M.L. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 308:548-550, 1984.
- Symons, A.R.C., Marshall, V.M. and Foote, S.J. Improvements in allelic discrimination of microsatellite markers using denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *Mamm.Genome* 11:671-674, 2000.

- Szabo, P.E. and Mann, J.R. Biallelic expression of imprinted genes in the mouse germ line: implications for erasure, establishment, and mechanisms of genomic imprinting. *Genes Dev.* 9:1857-1868, 1995.
- Taback, S.P. Meta-analysis of adult height outcomes following growth hormone treatment in patients with Turner syndrome. The IMAGINE-TS Study Group. *Pediatr.Res.* 49:72A, 2001.
- Taback, S.P., Collu, R., Deal, C.L., *et al.* Does growth-hormone supplementation affect adult height in Turner's syndrome? *Lancet* 348:25-27, 1996.
- Taback, S.P. and Van Vliet, G. Growth hormone, adult height and psychosocial outcome in Turner syndrome: the need for controlled studies. From Turner syndrome in a life-span perspective; *Proceedings of the 4th International Symposium on Turner Syndrome.*, 1995.
- Tada, M., Tada, T., Lefebvre, L., Barton, S.C. and Surani, M.A. Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells. *EMBO J.* 16:6510-6520, 1997.
- Tada, T., Obata, Y., Tada, M., *et al.* Imprint switching for non-random X-chromosome inactivation during mouse oocyte growth. *Development* 127:3101-3105, 2000.
- Thorvaldsen, J.L., Duran, K.L. and Bartolomei, M.S. Deletion of the H19 differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of H19 and Igf2. *Genes Dev.* 12:3693-3702, 1998.
- Tilghman, S.M. The sins of the fathers and mothers: genomic imprinting in mammalian development. *Cell* 96:185-193, 1999.
- Truesdell, L., Deal, C., Truesdell, F., and Hallé Tougas, S. L'Association du Syndrome de Turner du Québec. 1998. Ref Type: Pamphlet

- Tsezou, A., Hadjiathanasiou, C., Gourgiotis, D., *et al.* Molecular genetics of Turner syndrome: correlation with clinical phenotype and response to growth hormone therapy. *Clin.Genet.* 56:441-446, 1999.
- Tycko, B. Genomic imprinting: mechanism and role in human pathology. *Am.J.Pathol.* 144:431-443, 1994.
- Ueda, T., Abe, K., Miura, A., *et al.* The paternal methylation imprint of the mouse H19 locus is acquired in the gonocyte stage during foetal testis development. *Genes Cells* 5:649-659, 2000.
- Van den Broeck, J., Massa, G.G., Attanasio, A., *et al.* Final height after long-term growth hormone treatment in Turner syndrome. European Study Group. *J.Pediatr.* 127:729-735, 1995.
- Viville, S. Empreinte génomique, comportement maternel et conflit d'intérêt reproductif. *Médecine Sc.* 15:528-534, 1999.
- Vu, T.H. and Hoffman, A.R. Promoter-specific imprinting of the human insulin-like growth factor-II gene. *Nature* 371:714-717, 1994.
- Wang, Z.Q., Fung, M.R., Barlow, D.P. and Wagner, E.F. Regulation of embryonic growth and lysosomal targeting by the imprinted *Igf2/Mpr* gene. *Nature* 372:464-467, 1994.
- Watanabe, T., Yoshimura, A., Mishima, Y., *et al.* Differential chromatin packaging of genomic imprinted regions between expressed and non-expressed alleles. *Hum.Mol.Genet.* 9:3029-3035, 2000.
- Weksberg, R., Glaves, M., Teshima, I., Waziri, M., Patil, S. and Williams, B.R. Molecular characterization of Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) patients with partial duplication of chromosome 11p excludes the gene *MYOD1* from the BWS region. *Genomics* 8:693-698, 1990.

- Weksberg, R. and Shuman, C. Beckwith-Wiedemann Syndrome. *Gene Clinics*. 2000.
<http://www.geneclinics.com>
- Weksberg, R. and Squire, J.A. Molecular biology of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Med.Pediatr.Oncol.* 27:462-469, 1996.
- Weng, E.Y., Moeschler, J.B. and Graham, J.M.J. Longitudinal observations on 15 children with Wiedemann-Beckwith syndrome. *Am.J.Med.Genet.* 56:366-373, 1995.
- Wiedemann, H.R. Complex malformatif familial avec hernie, ombilicale et macroglossie - un syndrome nouveau? *J.Genet.Hum.* 13:223-232, 1964.
- Wiedemann, H.R. Tumours and hemihypertrophy associated with Wiedemann-Beckwith syndrome. *Eur.J.Pediatr.* 141:129, 1983.
- Wilkin, F., Paquette, J., Ledru, E., Hamelin, C., Pollak, M. and Deal, C.L. H19 sense and antisense transgenes modify insulin-like growth factor-II mRNA levels. *Eur.J.Biochem.* 267:4020-4027, 2000.
- Wutz, A., Smrzka, O.W., Schweifer, N., Schellander, K., Wagner, E.F. and Barlow, D.P. Imprinted expression of the Igf2r gene depends on an intronic CpG island. *Nature* 389:745-749, 1997.
- Xu, Y., Goodyer, C.G., Deal, C. and Polychronakos, C. Functional polymorphism in the parental imprinting of the human IGF2R gene. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 197:747-754, 1993.
- Xu, Y.Q., Grundy, P. and Polychronakos, C. Aberrant imprinting of the insulin-like growth factor II receptor gene in Wilms' tumor. *Oncogene* 14:1041-1046, 1997.
- Yu, Y., Xu, F., Peng, H., *et al.* NOEY2 (ARHI), an imprinted putative tumor suppressor gene in ovarian and breast carcinomas. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.* 96:214-219, 1999.

- Zemel, S., Bartolomei, M.S. and Tilghman, S.M. Physical linkage of two mammalian imprinted genes, H19 and insulin-like growth factor 2. *Nat.Genet.* 2:61-65, 1992.
- Zhang, P., Liegeois, N.J., Wong, C., *et al.* Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature* 387:151-158, 1997.
- Zinn, A.R. and Ross, J.L. Turner syndrome and haploinsufficiency. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 8:322-327, 1998.
- Zinn, R. Sex chromosome disorders. In: *Principles of molecular medicine*, Edited by Jameson, J.L. New Jersey: Humana Press, pp. 561-579, 1998.
- Zinn, R. and Ross, J.L. Search for the Turner gene. *Clin.Pediatr.Endo.* 6:59-68, 1997.

ANNEXE I: Formulaire de consentement pour l'étude GDCT

RENSEIGNEMENTS ET FORMULAIRE DE CONSENTEMENT ÉCLAIRÉ À L'INTENTION DE LA PATIENTE

Addenda 3 à l'étude B9R-CA-GDCT

Introduction

Dans ce document, <vous> doit être compris comme <votre enfant ou vous-mêmes>.

En tant que patiente faisant présentement partie de l'étude B9R-CA-GDCT (GDCT), vous êtes invitée à prendre part volontairement à un addenda (prolongation) à cette étude qui sera appelé *Addenda pour l'exécution de tests génétiques* [désigné ci-après par le sigle GDCT(3)].

Comme vous le savez, la plupart des filles et des femmes atteintes du syndrome de Turner n'ont qu'un seul chromosome X dans leurs cellules au lieu des 2 chromosomes habituels. Dans certains cas, ce chromosome provient de la mère et dans d'autres il provient du père. Des données préliminaires laissent croire que la croissance d'une fille atteinte du syndrome de Turner peut être influencée par l'origine du chromosome X, soit du père ou de la mère. Le but de la prolongation de l'étude GDCT est de déterminer si l'origine parentale du chromosome X influence le poids et la taille à la naissance et/ou la taille adulte chez les patientes à qui il manque un chromosome X (45,XO) ou qui possèdent l'une des combinaisons chromosomiques énumérées ci-dessous. Si vous acceptez de participer à cet addenda et que vous nous donnez la permission de demander à votre mère d'y participer également, les tests prescrits seront effectués lors de votre prochaine visite. De plus, si vous êtes d'accord on demandera à votre père de participer sur une base volontaire. Sa participation se limitera à la mesure de sa taille et sera facultative. Elle ne modifiera en rien votre participation à cet addenda.

Votre participation à cette étude devrait durer le temps de cette visite. Environ 120 patientes participeront à cet addenda.

Objectifs de l'addenda

Le but de cet addenda est de déterminer :

- la relation entre l'origine parentale du chromosome X (c.-à-d. qui, du père ou de la mère, a fourni le chromosome X de la patiente) et le poids et la taille à la naissance ou la taille adulte chez les patientes à qui il manque un chromosome X (45,XO) ou qui possèdent l'une des combinaisons chromosomiques énumérées ci-dessous.

Conditions de participation

Quelques-unes des conditions de participation à cette étude sont les suivantes :

- Vous faites présentement partie de l'étude GDCT ou en avez déjà fait partie.

- Vous avez l'une des combinaisons chromosomiques suivantes (ou une forme mosaïque d'une de ces combinaisons) :
 - (1) 45,XO
 - (2) 46,X,del(X)p
 - (3) 46,X,i(Xq).
- Votre mère biologique accepte de participer à cet addenda.

Le médecin chargé de l'étude ou un membre de son personnel vous a parlé des autres conditions de participation à l'étude.

Marche à suivre

Si vous acceptez de participer à cet addenda à l'étude GDCT, on prélèvera un échantillon de 10 mL de sang (environ 2 cuillerées à thé, ce qui équivaut à 3 % d'un don de sang à la Croix-Rouge) chez vous et chez votre mère lors de votre prochaine visite dans le cadre de l'étude. L'échantillon sera envoyé au laboratoire du Dr Cheri Deal, à l'Hôpital Sainte-Justine, à Montréal. Votre ADN (le matériel génétique de votre organisme) sera isolé de vos cellules sanguines et analysé pour déterminer si votre chromosome X provient de votre mère. Votre échantillon d'ADN sera conservé jusqu'à un an après que tous les échantillons requis pour l'étude aient été prélevés, au cas où il faudrait l'analyser de nouveau. Votre matériel génétique ne sera utilisé que dans le cadre d'études liées au syndrome de Turner. Si vous êtes d'accord, on mesurera la taille de votre père mais on ne lui fera pas subir de tests sanguins.

Risques

Vous comprenez que votre participation à cet addenda peut comporter certains risques.

Bien que les prises de sang ne causent pas de problèmes graves pour la plupart des gens, elles peuvent entraîner des saignements, des ecchymoses (bleus), des malaises, des infections et/ou une douleur au point de piqûre ou des étourdissements.

En cas de lésion, de réaction indésirable ou d'autre trouble de santé au cours de l'étude, communiquez sans tarder avec le personnel infirmier ou avec le docteur Cheri Deal en composant le 514-345-4735 le jour ou au 514-345-4988 le soir et la nuit.

Participation sur une base volontaire

La participation à cet addenda est entièrement libre, c'est-à-dire que personne ne peut vous obliger à en faire partie. Vous pouvez décider de ne pas y participer ou de vous en retirer en tout temps, sans pénalité ni perte des avantages auxquels vous aviez droit avant de participer à cette étude. Si vous décidez de vous retirer, le docteur Cheri Deal ou un membre de son personnel en parleront avec vous.

Arrêt de l'étude

Le docteur Cheri Deal ou Eli Lilly and Company (le commanditaire de cette étude) peuvent en tout temps, et pour quelque raison que ce soit, arrêter l'étude ou annuler votre participation sans votre consentement.

Traitement et indemnisation en cas de lésions corporelles

Au Canada, le système de soins de santé peut ou non couvrir certains types de lésions qui pourraient résulter de votre participation à cette étude. Si vous suivez les directives du médecin responsable de cette étude et que vous subissez une lésion à cause d'une substance ou d'un traitement administré conformément au protocole, Eli Lilly and Company s'engage à payer tous les frais médicaux pour le traitement de cette lésion qui ne sont pas couverts par l'assurance-maladie gouvernementale.

Vous ne recevrez, ni maintenant ni plus tard, aucune indemnisation, aucun avantage financier ni aucune redevance pour les produits mis au point à partir des recherches sur l'ADN ou d'autres données recueillies pendant cette étude. Vous comprenez que les connaissances acquises de l'analyse de votre ADN pourront être utilisées à des fins scientifiques. Vous comprenez également que l'analyse de votre échantillon d'ADN peut contribuer à la création de nouveaux tests diagnostiques, de nouveaux médicaments ou d'autres éléments susceptibles de présenter une valeur commerciale pour le commanditaire, et que vous n'en recevrez aucun avantage financier.

Avantages possibles

Vous pourrez en apprendre plus sur votre santé grâce aux examens physiques et tests de laboratoire effectués dans le cadre de cette étude.

À la fin de cette étude, votre médecin pourra vous dire si le chromosome X dans vos cellules sanguines provient de votre mère. Cette information vous sera donnée seulement si mère, père et fille y consentent. De plus, cette information ouvrira la voie à d'autres études visant à mieux comprendre le rôle de certains gènes situés sur le chromosome X dans la croissance et les caractéristiques physiques des patientes atteintes du syndrome de Turner. Les connaissances acquises pendant l'étude permettront aux médecins de donner de meilleurs conseils génétiques aux filles atteintes du syndrome de Turner et à leurs familles.

Les connaissances acquises durant l'étude seront bénéfiques au commanditaire, la compagnie Eli Lilly and Company, et possiblement à d'autres patients à l'avenir.

Questions

Vous pouvez obtenir de plus amples renseignements sur cette étude et vos droits auprès de l'ombudsman de l'Hôpital Ste-Justine que vous pouvez joindre au 514-345-4749.

Vous pouvez également contacter le docteur Cheri Deal, de l'Hôpital Sainte-Justine à Montréal, qui est responsable des tests génétiques dans le cadre de cette étude. Vous pouvez la contacter

directement au (514) 345-4735 pour toute question à laquelle votre médecin traitant n'a pu répondre à votre entière satisfaction.

On vous fera part immédiatement de tout nouveau renseignement obtenu au cours de l'étude qui pourrait influencer votre décision de continuer de participer à l'étude.

Confidentialité

Si vous acceptez de participer à cette étude, les renseignements obtenus seront remis à Eli Lilly and Company, à ses représentants et sous-traitants, ainsi qu'au comité d'éthique chargé de cette étude, à la Direction générale de la protection de la santé (DGPS), à la *Food and Drug Administration* (FDA) des États-Unis et à des organismes semblables dans d'autres pays, qui pourront tous faire l'étude de votre dossier. Les dossiers médicaux révélant votre identité demeureront confidentiels; ils ne seront divulgués par Eli Lilly and Company qu'aux personnes susmentionnées ou si la loi le stipule.

Les renseignements médicaux qui vous concernent peuvent être entrés dans une base de données informatisée.

Signatures

Pour faire partie de l'étude, vous ou votre représentant autorisé devez signer et dater la feuille des signatures (Annexe 1).

Renseignements pour le patient et Formulaire de consentement
Annexe 1
Feuille des signatures

Humatrope Treatment to Final Height in Turner Syndrome

Feuille des signatures

Pour faire partie de cette étude, vous ou votre représentant autorisé devez signer cette feuille. Le consentement verbale doit avoir été obtenu de l'enfant qui ne peut pas signer

En signant cette feuille, vous ou votre représentant autorisé confirmez que :

- Vous avez lu et compris toutes les informations contenues dans le présent document nommé Renseignements pour le patient et Formulaire de consentement, et que vous avez eu le temps d'y réfléchir.
- Vous avez posé toutes vos questions et qu'on y a répondu à votre entière satisfaction. Le médecin ou un membre de son personnel vous a expliqué les mots que vous ne compreniez pas.
- Vous participez à cette étude sur une base volontaire et que vous acceptez de suivre les directives et de fournir les informations nécessaires au médecin, aux infirmières ou à tout autre membre du personnel, sur demande.
- Vous comprenez que vous pouvez sans contrainte vous retirer en tout temps de cette étude et que vous recevrez la même qualité de soins. Les échantillons vous concernant seront détruits.
- Vous avez reçu une copie à garder du présent document nommé Renseignements pour le patient et Formulaire de consentement.

 Nom de la patiente
 (écrire en lettres moulées ou taper)
 Veuillez inscrire la date au moment de la signature.

 Initiales de la patiente et numéro

 Signature de la patiente de plus de 14 ans

 Date

 Signature du représentant autorisé/parent

 Date

 Signature de la personne qui obtient le consentement

 Date

 Signature du chercheur (s'il n'a pas déjà signé)

 Date

 Pour les études menées dans le cadre d'un essai pour un US IND, chaque formulaire de consentement éclairé doit être signé ci-dessus par un chercheur ou un chercheur adjoint dont le nom figure au formulaire FD 1572.

Renseignements pour le patient et formulaire de consentement pour le protocole B9R-CA-GDCT(3)
 Rens. pat. et form. cons. spécifique au protocole approuvé par Lilly le 14 septembre 1998
 Rens. pat. et form. cons. révisé spécifique au protocole approuvé par Lilly le 4 mars 1999

Humatrope (LY137998) B9R-CA-GDCT(3)
 FCÉ spécifique au protocole approuvé par Lilly le 14 septembre 1998

Initiales de la patiente _____
 Page 6 de 6

Humatrope Treatment to Final Height in Turner Syndrome

Addenda 3 à l'étude B9R-CA-GDCT

Feuille des signatures

Pour connaître les informations concernant la provenance du chromosome X, vous et vos parents devez signer cette feuille. Le consentement verbale a été obtenu de l'enfant qui ne peut pas signer.

En signant cette feuille, vous et vos parents confirmez que :

- Vous acceptez de recevoir les informations concernant la provenance du chromosome X.
- Vous comprenez que cette information ne sera disponible que si la patiente, la mère et le père acceptent de recevoir les informations.

 Nom de la patiente
 (écrire en lettres moulées ou taper)
Veillez inscrire la date au moment de la signature.

 Initiales de la patiente et numéro

 Signature de la patiente de plus de 14 ans

 Date

 Signature du père Date

 Signature de la mère Date

 Signature de la personne qui obtient le consentement

 Date

 Signature du chercheur (s'il n'a pas déjà signé)

 Date

Pour les études menées dans le cadre d'un essai pour un US IND, chaque formulaire de consentement éclairé doit être signé ci-dessus par un chercheur ou un chercheur adjoint dont le nom figure au formulaire FD 1572.

Renseignements pour le patient et formulaire de consentement pour le protocole B9R-CA-GDCT(3)
 Rens. pat. et form. cons. spécifique au protocole approuvé par Lilly le 14 septembre 1998
 Rens. pat. et form. cons. révisé spécifique au protocole approuvé par Lilly le 4 mars 1999

ANNEXE II: Résumés (BWS et TS) présentés lors de congrès

OR10-102**Monozygotic Twins (MZ) Discordant for Beckwith-Wiedemann Syndrome (BWS): Can Epigenetic Modifications at 11p15.5 be Causative?**

Catherine Hamelin, Jean Paquette, Chris Wake, Patricia Crock, Cheri Deal. Pediatrics, Hôpital Ste-Justine/Université de Mon, Montréal, Canada; Pediatrics, John Hunter Children's Hospital, Newcastle, Australia.

Introduction: BWS is characterized by pre- and post-natal macrosomia, dysmorphic features (e.g. omphalocele, ear lobe creases) and an increased predisposition to embryonal neoplasia (e.g. Wilms' tumor). BWS maps to 11p15.5, an imprinted gene cluster. Genetic abnormalities have been described in sporadic cases, including uniparental disomy (UPD) of paternal origin and rare mutations in *p57^{KIP2}*; more frequently, epigenetic modifications are found involving aberrant methylation at two BWS imprint control loci, BWSIC1 and BWSIC2. It has been shown that loss of normal, allele-specific methylation profiles at either of these loci is associated with, if not directly causative of, biallelic *IGF2* expression, the *sine qua non* of overgrowth in BWS. Sporadic BWS in only one MZ twin is limited to reports of 20 pairs, and to date, molecular mechanisms have remained obscure. We hypothesized that epigenetic modifications could account for the discordant phenotype in MZ twins. **Patients:** These female twins were born at 30 w gestation (C-section for pre-eclampsia). Physical findings in the affected twin included a 28% birth weight differential, omphalocele, ear lobe creases, macroglossia, enlarged liver, spleen and kidneys; hyperinsulinemic hypoglycemia occurred within the first hours of life. **Methods:** Multiple polymorphic loci (including several on the X chromosome and on chromosome 11p15.5) were genotyped by RFLP, SSCP or microsatellite analysis. Allelic methylation profiles at BWSIC1 were evaluated by bisulfite sequencing of cloned PCR products. **Results:** Genotype analysis confirmed the findings of monozygosity based on placental histopathology. No evidence was found for chromosomal rearrangements or UPD for chromosome 11p15. Biallelic methylation at BWSIC1 was only observed in the affected twin. **Conclusion:** This is the first demonstration of divergent methylation profiles at BWSIC1 in MZ twins discordant for BWS, and suggests that epigenetic modifications may be responsible for the observed discordance.

Pediatric Research, Pediatric Endocrinology Montréal 2001., June; 49 (6):18-A, 2001.

#34. L'ORIGINE PARENTALE DU CHROMOSOME X DANS LE SYNDROME DE TURNER : SES IMPLICATIONS DANS LA CROISSANCE FŒTALE ET POSTNATALE AINSI QUE DANS LA RÉPONSE AU TRAITEMENT À L'HORMONE DE CROISSANCE

C. Hamelin, J. Paquette et C. Deal.

Centre de recherche de l'Hôpital Sainte-Justine, Dépt. d'endocrinologie, Univ. de Montréal.

Le Syndrome de Turner (TS) est une monosomie complète ou partielle du chromosome X. L'incidence est de 1 fille sur 2500 nouvellement nées. À la naissance, ces enfants ont une petite taille et démontrent un retard de croissance postnatale et une dysgénésie gonadique. Une variabilité est observée au niveau phénotypique et suite au traitement à l'hormone de croissance (GH). Des évidences laissent croire à une prévalence du caryotype $45,X^{Mat}$ sur celui $45,X^{Pat}$ dans la population et à une implication de l'origine parentale du X sur la sévérité du phénotype. Notre but est de déterminer si l'origine parentale du chromosome X chez les patientes $45,X$ influence le poids et la taille à la naissance, la taille adulte et la réponse au traitement à la GH.

Pour déterminer l'origine de l'X, l'analyse par microsatellites hautement polymorphiques est effectuée par PCR sur 115 patientes atteintes du TS.

Jusqu'ici, la mise au point de 2 méthodes de marquage (incorporation, kination) et de 7 microsatellites, distribués le long du chromosome X, a été effectuée. Ainsi, le génotypage d'une trentaine d'échantillons reçus a été réalisé. En respectant un pouvoir de discrimination nettement inférieur à 0,01, nous confirmons l'origine parentale du chromosome X intact. Nos résultats préliminaires démontrent bien la prédominance du caryotype $45,X^{Mat}$ sur celui $45,X^{Pat}$ (M 70%:P 30%). Suite à l'analyse de tous les échantillons, nous vérifierons statistiquement s'il existe une corrélation entre l'origine parentale de l'X, le phénotype et la réponse au traitement à la GH.

Cette étude s'avère d'un grand intérêt dans l'amélioration des soins et des coûts de thérapie chez les patientes atteintes du TS. Elle permettra une meilleure compréhension du concept d'empreinte génomique et une caractérisation des gènes associés au chromosome X impliqués dans la variabilité phénotypique du TS.

Médecine Sciences. Résumé des communications du Club de recherches cliniques du Québec., Supplément n°2; 16: 23, 2000.