

Université de Montréal

Caractérisation de l'inactivation du chromosome X chez l'humain à la naissance :
distribution et transmission des ratios d'inactivation

par

Véronique Bolduc

Programme de biologie moléculaire
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du
grade de maîtrise en biologie moléculaire

Avril, 2006

©, Véronique Bolduc, 2006



OH
506
U54
2006
v.027

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Caractérisation de l'inactivation du chromosome X chez l'humain à la naissance :
distribution et transmission des ratios d'inactivation

Présenté par :
Véronique Bolduc

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Elliot Drobetsky
Président-rapporteur

Lambert Busque
Directeur de recherche

Réjean Lapointe
Membre du jury

Résumé

Suite à l'inactivation d'un des 2 chromosomes X dans toutes leurs cellules, les femmes sont des mosaïques de cellules qui expriment soit les gènes liés au chromosome X d'origine paternelle, soit ceux liés au X d'origine maternelle. Normalement, 50% des cellules d'une femme expriment le X_p et 50% expriment le X_m. Cependant, nombre de femmes présentent un ratio d'inactivation X_p/X_m favorisant l'un des allèles (par exemple 75/25 ou 25/75). À la naissance, les mécanismes embryologiques déterminant le ratio d'inactivation initial, et par conséquent pouvant causer des ratios d'inactivation biaisés, sont inconnus. Dans le but d'élucider ces questions, nous avons conduit une étude épidémiogénétique en recrutant plus de 500 nouveau-nées filles et leur mère. Nos résultats ont révélé que, chez la nouveau-née, les ratios d'inactivation de deux tissus différents sont fortement similaires, démontrant une origine commune et précoce de ce mécanisme. En se basant sur la comparaison des ratios d'inactivation entre mères et filles, nous avons également démontré qu'il n'y a pas de transmission du phénotype et que la composante héréditaire de ce phénomène est probablement faible. Ces résultats suggèrent que le choix initial du chromosome à inactiver soit aléatoire, contrairement au modèle de la souris. Par ailleurs, nous avons observé que de la naissance à l'âge adulte, il y a un accroissement du nombre d'individus présentant un ratio d'inactivation biaisé, ce qui s'explique possiblement par une sélection cellulaire précoce se produisant dans tous les tissus et suggérant que des gènes importants pour la croissance cellulaire soient situés sur le chromosome X.

Mots clés : Inactivation du chromosome X, ratios d'inactivation, mosaïcisme biaisé, HUMARA, corrélation inter-tissus, transmission, *XIST*

Abstract

X-chromosome inactivation (XCI) renders females mosaics for two cell populations, expressing either paternal (X_p) or maternal (X_m) X-linked genes. Normally, females present 50% of their cells that express X_p , and 50% that express X_m . However, a number of females present an inactivation ratio X_p/X_m favouring one of the allele (for example 75/25 or 25/75). At birth, the embryological mechanisms determining the initial X-inactivation ratio, and as a consequence, that may be responsible for skewed X-inactivation ratios, are unknown. To address these issues, we conducted an epidemiogenetic study by recruiting over 500 female neonates and their mother. Our results showed that, in neonates, the different tissues present similar X-inactivation ratios, suggesting the common and early origin of this process. Based on the comparison of mothers and daughters X-inactivation ratios, we also demonstrated that there is no transmission of the phenotype, and thus that its hereditary component is weak. These results suggest as well that the initial choice of which X-chromosome to inactivate is stochastic, which is in contrast with the mouse model where X-linked variants influence that choice. Moreover, we observed, from birth to adulthood, an increasing number of females showing skewed X-inactivation ratios. This phenomenon could possibly be explained by X-chromosome-based cellular selections occurring in all tissues, suggesting that genes important for cell growth are located on the X-chromosome.

Key words: X-chromosome inactivation, X-inactivation ratios, skewing, HUMARA, tissue correlation, transmission, *XIST*

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	viii
Liste des abréviations	ix
Remerciements	x
Chapitre 1 INTRODUCTION	1
1.1 Inactivation du chromosome X	2
1.1.1 Chromosomes sexuels et compensation de dosage	3
1.1.2 Hypothèse de Mary Lyon	4
1.1.3 Inactivation impregnée ou aléatoire	5
1.1.4 Développement	5
1.1.5 Éléments génétiques et processus moléculaire	8
1.1.6 Caractéristiques du X inactif	17
1.2 Mosaïcisme	19
1.2.1 Définition	19
1.2.2 Ratios d'inactivation	20
1.2.3 Méthodes pour déterminer les ratios d'inactivation	22
1.3 Mosaïcisme biaisé	24
1.3.1 Essais de clonalité	25
1.3.2 Mosaïcisme biaisé et maladies	27
1.3.3 Incidence du mosaïcisme biaisé chez des femmes normales	28
1.3.4 Corrélations inter-tissus des ratios d'inactivation	29
1.3.5 Mosaïcisme biaisé à la naissance vs mosaïcisme biaisé associé à l'âge	29
1.3.6 Causes du mosaïcisme biaisé associé à l'âge	30
1.3.7 Causes du mosaïcisme biaisé à la naissance	32

1.4 Projet de recherche	36
1.4.1 But du projet de recherche	36
1.4.2 Hypothèses de recherche et objectifs spécifiques	37
1.4.3 Description	37
1.4.4 Pertinence	39
Chapitre 2 MÉTHODES	40
2.1 Obtention des spécimens	40
2.1.1 Recrutement de la cohorte	40
2.1.2 Traitement des spécimens	40
2.2 Phénotypage	42
2.2.1 Essai méthylation (HUMARA)	42
2.2.2 Essai transcription (IDS)	45
2.3 Génotypage	48
2.3.1 Polymorphismes de la région XIST	48
2.3.2 Profil génétique – zygosité des jumelles	50
2.4 Analyses statistiques	50
Chapitre 3 RÉSULTATS (MANUSCRIPT)	51
3.1 Accord des co-auteurs	52
3.2 Apport des co-auteurs	53
3.3 Analysis of X-inactivation ratios in mother-neonate pairs demonstrates a stochastic body-wide origin and a selection bias during development	54
Chapitre 4 DISCUSSION	83
4.1 Mesure du ratio d'inactivation (phénotype)	83

4.2 Description de la cohorte	85
4.3 Hérité	86
4.4 Corrélations inter-tissus chez les NN	90
4.5 Évolution du mosaïcisme biaisé de la fécondation à la vieillesse	92
Chapitre 5 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	96
Bibliographie	100
Annexe 1 Calcul pour déterminer le ratio d'inactivation	xi

Liste des tableaux

Mémoire

I Causes du mosaïcisme biaisé néonatal	33
--	----

Manuscrit

I Incidences of skewing ($\geq 75\%$ and $\geq 90\%$) for two tissues of a cohort of mothers and neonates	72
IIA Incidences of skewing in neonates of skewed mothers vs non-skewed mothers	74
IIB Incidences of skewing in mothers of skewed neonates vs non-skewed neonates	74
III UNPHASED analysis of five-marker haplotypes versus the degree of skewing for 154 neonates	76
IV Phylogenic view of X-chromosome inactivation	77

Liste des figures

Mémoire

1	Dynamique de l'ICX durant la formation des gamètes et le développement, chez la souris	7
2	Éléments génétiques de la région <i>Xic</i> murine	10
3	Processus de l'ICX	16
4	Mosaïcisme	21
5	Mosaïcisme biaisé	26
6	Détermination des ratios d'inactivation : HUMARA	44
7	Détermination des ratios d'inactivation : IDS.	47
8	Amplification par PCR du gène HUMARA	xi

Manuscrit

1	Scatter plots and correlations of blood vs buccal epithelial tissue XCI ratios	73
2	Linear regressions and correlations of mothers versus neonates XCI ratios	75
3	Model showing changes in skewing of XCI incidences over age	78

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
DS	Degree of skewing (degré de mosaïcisme biaisé)
G6PD	Glucose-6-phosphate-deshydrogenase
HPRT	Hypoxantyl phosphorybosyl transferase
HUMARA	Human androgen receptor assay
ICM	Inner cell mass
ICX	Inactivation du chromosome X
IDS	Iduronate-2-sulfatase
kb	kilobase
NN	Nouveau-nées
PAR	Pseudo-autosomal region
PCR	Polymerase chain reaction
PGK	Phosphoglycerate kinase
Pmat	Proportion de cellules qui expriment l'allèle maternel
Psup	Proportion de cellules qui expriment l'allèle supérieur
Ptrans	Proportion de cellules qui expriment l'allèle transmis
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
SNP	Single nucleotide polymorphism
STR	Short tandem repeat
<i>Tsix</i>	Transcrit anti-sens à Xist
WASP	Wiscott-aldrich syndrome protein
<i>Xce</i>	X-inactivation controlling element
<i>Xic</i>	X-inactivation center
<i>Xist</i>	X-inactive specific transcript
<i>Xite</i>	X-inactivation intergenic transcription elements

Remerciements

Dr Busque, mon directeur, dont l'esprit répond plus vite que l'éclair, homme passionné et humain qui m'a enseigné le dépassement de soi,

Pierre, mon coup de foudre professionnel, humble et posé, qui m'a enveloppé d'optimisme et de confiance,

Sylvie, ma « 3^e directrice », si généreuse de son temps, de ses conseils, qui m'a accueilli à bras ouverts dans le monde des statistiques,

Rolande, la recruteuse, pour ses contacts avec les mères et le travail immense qu'elle a accompli,

Claude, ma lumière dans un laboratoire sans fenêtres, qui n'a cessé de m'encourager dans mes périodes d'angoisse,

Marianne, dont l'entrain n'a d'égal,

Eve et Myriam, nos stagiaires adorées, douces comme les beaux jours dont leur arrivée au labo chaque été est le signe,

Dr Marie-Pierre Dubé, pour sa collaboration soutenue,

Le personnel du 7^e AB de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, pour nous avoir accueillis tous les matins durant l'année du recrutement,

Mes parents et ma sœur, qui croient en moi,

Un chaleureux merci.

Chapitre 1

INTRODUCTION

L'inactivation d'un des deux chromosomes X (ICX) dans toutes les cellules d'une femme se produit durant le développement, à un moment encore précisément indéterminé. Du fait de l'ICX, les femmes sont considérées comme des mosaïques, puisqu'elles sont composées d'un mélange de cellules qui expriment le chromosome X paternel (X_p) et de cellules qui expriment le chromosome X maternel (X_m). Normalement, chez une femme, la moitié des cellules expriment X_p et la moitié expriment X_m . Cependant, de nombreuses femmes présentent un ratio d'inactivation X_p/X_m favorisant l'un des chromosomes (par exemple 75/25 ou 25/75).

Le ratio d'inactivation du chromosome X (ratio d'ICX ou ratio d'inactivation) est donc la mesure qui permet de déterminer, chez une femme et un tissu donnés, le degré de mosaïcisme, c'est-à-dire la proportion de cellules qui expriment un chromosome X (par exemple le paternel), par rapport à la proportion de cellules qui expriment l'autre chromosome X. Les ratios d'ICX ont été beaucoup étudiés chez les femmes adultes et âgées. Ces études ont permis de mettre en valeur la particularité qu'ont les cellules sanguines d'être de plus en plus biaisées avec l'âge (i.e d'exprimer en plus grande proportion le chromosome X paternel plutôt que le maternel, ou vice-versa). L'hypothèse la plus documentée pour expliquer ces biais croissants suggère qu'ils soient causés par des sélections cellulaires basées sur des variants génétiques exprimés par le chromosome X actif. Dans ce cas, identifier les gènes en cause pourrait mener au développement d'éventuels outils thérapeutiques afin de favoriser la croissance de cellules sanguines humaines en culture, lors de greffes de moelle osseuse, par exemple.

Cependant, la littérature souffre d'un manque de données pour appuyer et étudier plus en profondeur cette hypothèse fascinante des sélections cellulaires basées sur le chromosome X. Entre autres, aucun groupe de recherche n'a procédé à

l'étude des ratios d'ICX à la naissance, soit peu de temps après leur établissement. Ainsi, les mécanismes embryologiques qui déterminent le ratio d'inactivation initial, et qui, par conséquent, pourraient provoquer un ratio d'inactivation biaisé dès la naissance, sont inconnus. Par exemple, il se pourrait que les ratios d'inactivation biaisés, lors de l'embryogénèse, soient produits par un autre mécanisme la sélection cellulaire, par exemple par un biais du choix du chromosome à inactiver. Chez la souris, il est connu qu'un tel mécanisme est opérationnel. De connaître la cause (ou les causes) des ratios d'inactivation biaisés néonataux nous permettrait d'épurer les données chez les femmes âgées et de faciliter la recherche de gènes importants pour l'hématopoïèse, tout en permettant l'identification de gènes importants pour le mécanisme de l'ICX chez l'humain.

Cette présente étude vise plus précisément à analyser les ratios d'ICX chez des femmes nouveau-nées, afin de mieux caractériser les mécanismes de l'ICX chez l'humain et de mieux comprendre la dynamique des ratios d'ICX avec l'âge. Avant d'énoncer les bases de ce présent projet de recherche, il importe d'introduire les notions de ratios d'inactivation et de mosaïcisme biaisé, ainsi que de faire le point sur les connaissances à ce jour. Mais avant tout, une introduction à l'inactivation du chromosome X (définition et mécanisme) s'impose.

1.1 Inactivation du chromosome X

L'ICX consiste en la répression transcriptionnelle d'un chromosome X dans toutes les cellules femelles, dans l'embryogénèse. Suite à la première description de ce phénomène par Mary Lyon¹, l'inactivation du chromosome X (ICX) s'est révélée être d'une importance capitale pour le développement embryonnaire. Un défaut d'ICX mène à des malformations graves chez l'embryon² et même à la mort embryonnaire³. Aussi, de nombreuses recherches au cours des décennies suivantes ont été effectuées afin de mieux caractériser le phénomène. Aujourd'hui encore, l'ICX reçoit encore l'attention de nombreux chercheurs partout dans le monde.

1.1.1 Chromosomes sexuels et compensation de dosage

Chez l'humain, les chromosomes sexuels (X et Y) seraient issus d'une paire d'autosomes et auraient divergés il y a environ 300 millions d'années⁴. Au cours de cette évolution, le chromosome Y aurait subi divers remaniements, dont la perte de la majorité de ses gènes fonctionnels. De plus, les gènes conservés auraient muté, ce qui aurait conduit à l'émergence du chromosome déterminant le sexe masculin⁵. Même si les chromosomes X et Y sont très différents, ils peuvent encore subir des recombinaisons, spécifiquement dans les régions situées aux extrémités, nommées régions pseudo-autosomales (RPA)⁶. Les RPA sont les sections des chromosomes sexuels (X et Y) qui se comportent comme des autosomes, c'est-à-dire qu'elles y partagent des gènes.

Le chromosome Y contient un nombre limité de gènes, qui soit sont impliqués dans la détermination du sexe et la spermatogénèse, soit possèdent un homologue sur le chromosome X⁷. Le chromosome X, au contraire, est beaucoup plus large, étant formé de quelque 155 millions de bases regroupant 1098 gènes, impliqués dans différentes voies métaboliques⁸. Récemment, la séquence humaine du chromosome X a été déterminée à 99,3 %⁸.

L'apparition des organismes sexués, comme les mammifères, a amené un nouveau besoin, celui de compenser pour les dosages géniques différents entre les 2 sexes⁹. En effet, chez l'humain par exemple, les femmes possèdent 2 chromosomes X, alors que les hommes n'en possèdent qu'un seul. Le chromosome Y ne contenant que peu de gènes, il y aurait plus de produits géniques (ARN et protéines) dans les cellules femelles que dans les cellules mâles si les 2 chromosomes X de la femme s'exprimaient. Les mécanismes de compensation de dosage s'assurent donc d'établir des niveaux équivalents d'expression pour les gènes liés au chromosome X entre les mâles XY et des femelles XX; de même qu'ils permettent le développement et la viabilité.

Les organismes ont développé différents mécanismes à cette fin. Chez la drosophile, l'expression des gènes sur le seul chromosome X des cellules mâles est doublée, pour égaler le dosage des cellules femelles⁹; alors que chez le ver,

les 2 chromosomes X des femelles sont régulés à la baisse⁹. Chez les mammifères, par contre, l'inégalité du dosage génique entre mâles et femelles est compensé par l'inactivation d'un des 2 chromosomes X dans toutes les cellules des femelles¹. Ainsi, les mammifères sont les seuls à avoir adopté un mécanisme qui fait en sorte que les 2 chromosomes du sexe homogamétique (la femelle en l'occurrence) subissent des traitements différents.

1.1.2 Hypothèse de Mary Lyon

C'est en 1961 que la généticienne anglaise Mary Lyon a pour la première fois décrit le phénomène biologique fondamental qu'est l'inactivation du chromosome X (ICX)^{1,10}. Jusqu'alors, il avait été observé que dans des cellules diploïdes de souris femelles, un des 2 chromosomes X se trouvait sous forme d'hétérochromatine (nommé « corpuscule de Barr » par la suite)¹¹. Lyon a ainsi suggéré (1) que ce corps d'hétérochromatine était un chromosome X génétiquement inactif, (2) que, dans différentes cellules d'un même animal, le chromosome inactivé pouvait être soit d'origine paternelle ou maternelle et (3) que cette inactivation se produisait tôt dans le développement embryonnaire^{1,10}. Cette hypothèse a été établie en se basant principalement sur deux évidences génétiques. La première évidence est venue du phénotype des souris de génotype XO, qui sont des femelles normales et fertiles¹⁰. Ce phénotype démontrait qu'un seul chromosome X actif était nécessaire pour le développement normal d'une souris femelle. La deuxième évidence est provenue du phénotype mosaïque des souris femelles hétérozygotes pour un gène affectant la couleur de la fourrure et lié au chromosome X¹⁰. En effet, ces souris, plutôt que de montrer un phénotype intermédiaire, montraient un phénotype en mosaïque, formé de tuiles (« patches ») de cellules exprimant l'allèle normal et de tuiles exprimant l'allèle muté.

Il a par la suite été mis en évidence que l'ICX se produisait chez tous les mammifères, puisque des corpuscules de Barr ont été retrouvés dans des cellules de plusieurs autres mammifères, tels le rat, l'opossum et l'humain¹².

Finalement, il a été établi que l'inactivation suivait la règle « n-1 » et consistait plutôt en l'inactivation de tous les chromosomes X qu'une cellule peut posséder, sauf un^{10,13}. Autrement dit, le processus consiste à protéger un seul chromosome X de l'inactivation, dans chaque cellule diploïde. Dans une cellule diploïde qui possède plus de 2 chromosomes X (par exemple, XXY, XXX et XXXX), seulement 1 chromosome X reste actif et la cellule est viable¹⁰.

1.1.3 Inactivation imprégnée ou aléatoire

L'ICX peut se présenter sous 2 formes, selon les mammifères ou les tissus¹⁴ : la forme imprégnée (« imprinted ») ou la forme aléatoire. La forme imprégnée est dépendante de l'origine parentale des chromosomes X et provoque l'inactivation du chromosome X d'origine paternelle. L'ICX imprégnée serait régulée dans le spermatocyte, où une marque épigénétique serait déposée sur le chromosome X du père. Cette marque deviendrait une empreinte après la fécondation, ce qui entraînerait l'inactivation préférentielle du chromosome paternel^{15,16}. La forme aléatoire, pour sa part, n'est pas régulée durant la gamétogenèse, mais plutôt durant le développement. Au moment où l'ICX est déclenchée dans l'embryon, chaque cellule a le loisir de choisir de façon aléatoire un chromosome à inactiver, indépendamment de l'origine parentale de celui-ci¹.

On croit que l'ICX serait d'abord apparue chez les métathériens (ou marsupiaux) sous la forme imprégnée¹⁷. Chez cette espèce, tous les tissus montrent une empreinte de l'ICX. Chez certains eutheriens (mammifères placentaires) comme la souris, les tissus extra-embryonnaires (comme le placenta) exhibent aussi une inactivation imprégnée^{18,19}. Chez l'humain, certaines études suggèrent que l'inactivation soit imprégnée dans le placenta²⁰⁻²², alors que d'autres réfutent cette hypothèse²³⁻²⁶. Au contraire, les tissus dérivés de l'épiblaste (soit tous les tissus embryonnaires), montrent une inactivation aléatoire, où les 2 chromosomes X ont la possibilité d'être inactivés²⁷.

1.1.4 Développement

L'ICX a été beaucoup étudié chez la souris, où il a été montré qu'il était un processus finement régulé durant le développement. Les travaux initiaux

suggéraient que le zygote XX hérite de deux chromosomes X actifs²⁸ et que l'inactivation d'un de ces deux X se produise à différents temps selon les tissus, simultanément avec la différenciation cellulaire²⁹. Cependant, les outils utilisés à l'époque ne permettaient d'évaluer le chromosome inactif que lorsque l'inactivation était accomplie. Les études plus récentes, en utilisant des outils plus précis pour visualiser le chromosome engagé vers l'inactivation, ont mis en évidence que le portrait est plus complexe. De la gamétogenèse à la fécondation, chaque chromosome X traverse divers stades d'activité et d'inactivité, en fonction de l'origine parentale. Puis, à un certain stade de l'embryogenèse, un des 2 chromosomes X est définitivement inactivé, et le restera dans toutes les cellules somatiques de l'animal à venir. Étant donné la grande flexibilité du chromosome X, qui peut être inactivé, réactivé, puis inactivé à nouveau, l'ICX est considéré comme un processus très dynamique au cours du développement murin (Figure 1)^{27,30}.

Lignées germinales

Dans la cellule germinale femelle, le chromosome X inactif est réactivé et ce, juste avant l'entrée en méiose (résumé par ³¹), de telle sorte que tous les gamètes possèdent un X actif. Ce chromosome demeurerait actif dans l'ovocyte, de l'ovulation à la fécondation.

Durant la spermatogenèse, le scénario inverse se produit : le chromosome X, qui est actif dans toutes les cellules somatiques chez le mâle, est transitoirement inactivé lors de la formation du corps hétérochromatique XY (« XY body »)³², qui se produit au moment de la méiose. Le gamète mature possède donc un chromosome X inactif.

Fécondation

Suite à la fécondation, le chromosome X paternel serait silencieux lors des premiers clivages, probablement en raison de la transmission d'un chromosome X

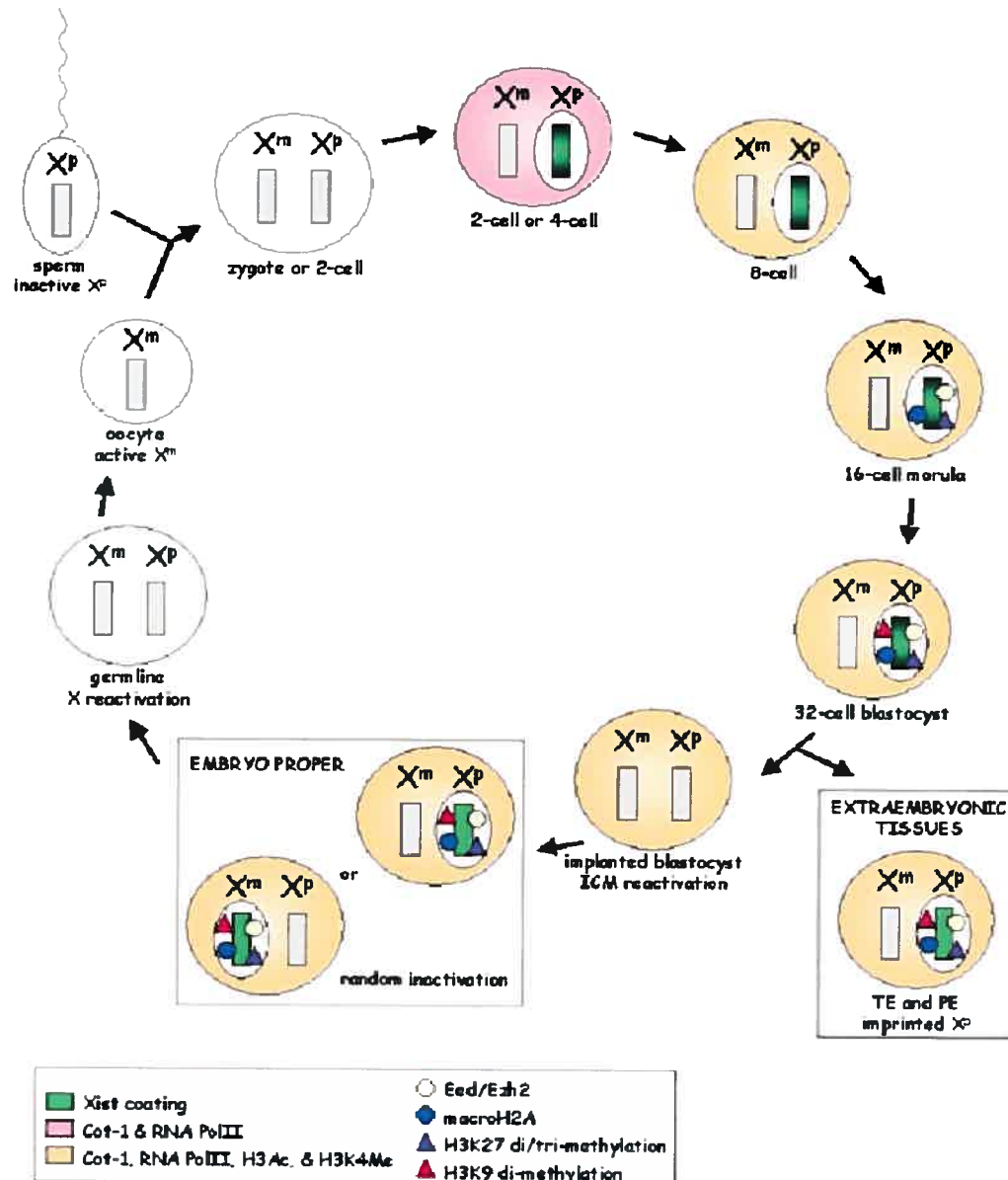


Figure 1 Dynamique de l'ICX durant la formation des gamètes et le développement, chez la souris. Le spermatozoïde contenant un Xi et l'ovocyte contenant un Xa fusionnent pour donner un zygote dont les 2 chromosomes X sont actifs. Dès le stade 4-cellules, le Xp montre les premiers signes d'inactivation (recouvrement par Xist). Au stade blastocyste, les tissus extraembryonnaires conservent l'empreinte (Xp inactif); dans la masse de cellules internes (ICM), le Xp est réactivé afin de compléter l'inactivation aléatoire. Image tirée de Cheng et Disteche, BioEssays, 2004³⁰

paternel pré-inactivé³³. Cependant, il a récemment été observé que l'accumulation de *Xist* et l'exclusion de l'ARN polymérase au chromosome paternel n'étaient visibles qu'à partir du stade 4-cellules, suggérant que ce chromosome soit transitoirement réactivé de la fécondation au stade 2-cellules³⁴. De plus, il a été observé, sur 2 gènes, que l'expression était bi-allélique au stade 2-cellules et mono-alléliques aux stades subséquents³⁴.

Embryon précoce

Toujours chez la souris, l'empreinte du X paternel serait conservée jusqu'au stade du blastocyste, au moment où le trophoctoderme et la masse de cellules internes (ICM pour « inner cell mass ») deviennent spécialisés. Par la suite, il y aurait réactivation du chromosome X paternel dans toutes les cellules de l'ICM, tel que dévoilé par la perte de l'accumulation de *Xist* et de la méthylation de l'histone H3 en ses lysines 9 et 27 (H3K9 et H3K27), qui sont des marques épigénétiques associées au chromosome X inactif^{34,35}. Les 2 chromosomes X demeureraient actifs pour une courte période de temps, ce qui permettrait par la suite à l'inactivation aléatoire de se produire. Cette deuxième inactivation serait par la suite définitive.

Une fois l'inactivation complétée, le chromosome X est transmis de façon stable lors des mitoses subséquentes (résumé par³¹).

Chez l'humain, il n'est pas connu si le chromosome X suit la même dynamique d'inactivation que celui de la souris. Par ailleurs, il n'est pas connu à quel stade l'ICX s'accomplit chez l'humain.

1.1.5 Éléments génétiques et processus moléculaire

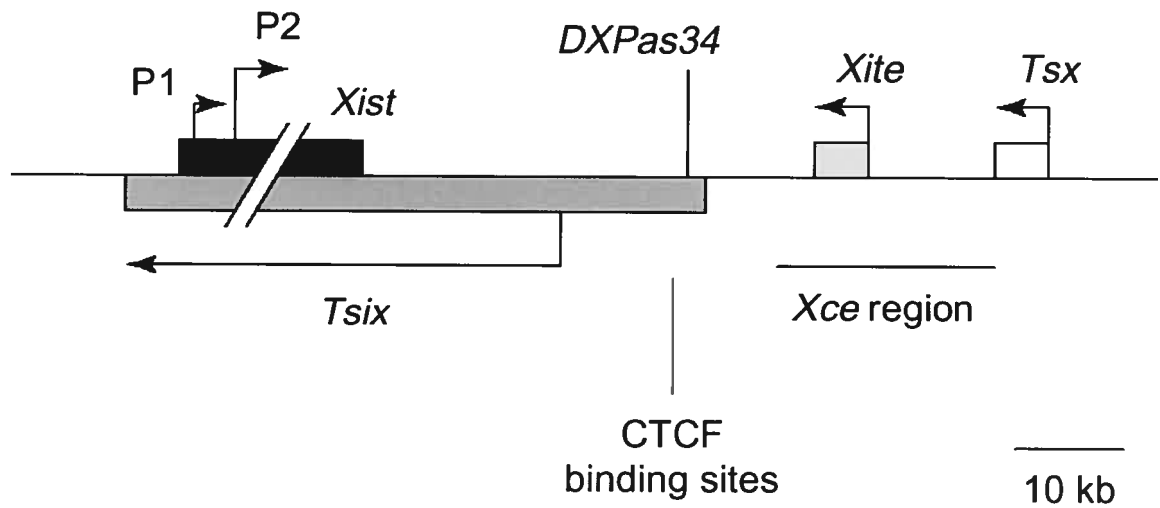
Comme l'ICX nécessite de traiter différemment chacun des 2 chromosomes X d'une même cellule, celle-ci doit donc être capable à la fois de protéger un des 2 X de l'inactivation, ainsi que de rendre l'autre X compétent à l'inactivation transcriptionnelle. Les modèles courants prédisent que la communication entre les 2 chromosomes X soit assurée par des facteurs autosomaux (*en trans*), alors que les changements épigénétiques menant à la répression transcriptionnelle soient

assurés par des éléments génétiques et épigénétiques en *cis*. Tous ces éléments seraient responsables d'orchestrer les étapes menant à l'ICX, c'est-à-dire le comptage, où la cellule recense le nombre de chromosomes X qu'elle possède, le choix, où la cellule désigne le X qui restera actif (Xa) et celui qui sera inactivé (Xi), l'initiation et la propagation de l'inactivation, quand le sort du chromosome à inactiver est scellé, et finalement le maintien de l'inactivation dans les cellules somatiques. Non seulement ces divers éléments doivent-ils être bien régulés, mais aussi doivent-ils travailler de concert, afin de mener à bien et au bon moment un processus aussi complexe que l'inactivation du chromosome X.

Les cellules souches embryonnaires (ES) de souris se sont avérées être un modèle avantageux pour étudier les processus menant à l'inactivation aléatoire. Ces cellules dérivent de la masse de cellules internes du blastocyste, à un stade où l'inactivation aléatoire ne s'est pas encore produite^{34,35}. Soumise à des conditions favorables à sa différenciation, la cellule ES récapitule les étapes menant à l'ICX, et passe de 2 X actifs à un seul X actif³⁶. Comme l'étude du processus de l'ICX s'est faite à partir de ce modèle cellulaire, la majorité des connaissances se rapportent à la souris. Certaines des caractéristiques de l'ICX murine sont aussi applicables à l'humain, mais certaines ne le sont pas. Elles seront discutées dans les paragraphes suivants. Afin de distinguer les gènes murins de leurs homologues humains, les premiers seront identifiés en lettres minuscules, alors que leur contre-parties humaines seront identifiées en lettres majuscules.

Élément en cis : Xic/XIC

Il a été découvert que les éléments responsables de l'ICX soient sous le contrôle d'un domaine en *cis*, nommé le centre de l'inactivation du X ou *XIC* (« X-inactivation center ») (Figure 2). Situé en Xq13 chez l'humain et dans la région synthénique chez la souris, *Xic/XIC* est requis en *cis* pour qu'un chromosome puisse s'inactiver³⁷. Aussi, l'absence d'un des 2 *Xic/XIC* dans une cellule empêche celle-ci d'initier l'ICX³⁸.



TRENDS in Genetics

Figure 2 Éléments génétiques de la région *Xic* murine. *Xist* code pour un ARN de plus de 17-kb, qui, au moment de l'inactivation, est transcrit uniquement par le chromosome à inactiver. Le transcrit *Tsix*, anti-sens à *Xist*, régule négativement ce dernier. *Tsix* serait contrôlé par la méthylation au *DXPas34*, de même que par la transcription de *Xite*. *Tsix* et *Xite* sont transcrits par le chromosome qui demeure actif. *Xce* affecte le choix du chromosome à inactiver, probablement en affectant en *cis* la transcription de *Tsix* (et donc de *Xist*). Au moins 40 sites potentiels de liaison à l'ADN de CTCF ont été identifiés près du site *DXPas34*.

Tiré de Latham, Trends genetics, 2005³⁹

Gènes du *Xic/XIC* : *Xist/XIST*, *Tsix*

La région *Xic/XIC* contient au moins 11 gènes connus, mais seulement 2 seraient impliqués dans l'ICX, soit *Xist/XIST*, effecteur de l'inactivation^{40,41} et *Tsix*, anti-sens à *Xist* et impliqué dans la régulation de celui-ci⁴². Ces 2 gènes codent pour des ARNs non-traduits qui se localisent au chromosome X.

Xist/XIST, pour « X-inactive specific transcript », a d'abord été identifié à cause de son expression spécifique au X inactif^{40,41,43}. C'est un gène qui code pour un long ARN (environ 17 Kb), ne contenant pas de cadres de lecture ouverts⁴⁴. Même si les homologues humain et murin ne présentent qu'un faible taux global de conservation (environ 49% d'homologie)⁴⁵, les transcrits *XIST* et *Xist* sont tous deux les effecteurs de l'inactivation^{46,47}. Par diverses expériences de délétion et de surexpression, il a été mis en évidence que *Xist* était requis en *cis* pour que l'inactivation se produise⁴⁷⁻⁴⁹. L'ARN du gène *Xist* recouvre le chromosome duquel il est transcrit^{46,50,51}, ce qui initie le recrutement des protéines engagées dans le remodelage de la chromatine et de l'ICX⁵².

De par son rôle central dans l'ICX, le gène *Xist/XIST* doit être finement régulé. Chez les cellules femelles, à un moment précis du développement, *Xist* est réprimé sur le futur X actif, alors qu'il est sur-réglé et stabilisé sur le futur X inactif^{50,53}. Cette sur-régulation permet à l'ARN de s'accumuler en *cis*, et éventuellement de déclencher la répression des gènes sur ce chromosome⁴⁷. La présence de régulateurs positifs et négatifs de *Xist* a été mise en évidence dans la région *Xic*, respectivement en amont⁵⁴ et en aval⁵⁵ du gène. Ces régulateurs contrôleraient *Xist* au niveau de l'intensité de son expression ou du choix de l'allèle à exprimer.

Un des gènes identifiés récemment comme régulateur de *Xist* est *Tsix*. Ce dernier, à l'instar de *Xist*, code pour un ARN non-traduit, dont la localisation est exclusivement nucléaire⁴². De plus, l'expression de *Tsix* est aussi régulée de façon dynamique durant l'ICX, puisqu'elle est d'abord bi-allélique, mais devient mono-allélique lors de l'initiation de l'ICX, mais cette fois à partir du X actif⁴². La transcription de *Tsix* débute à environ 15-kb en aval de *Xist* et peut couvrir ce

locus en entier^{42,56,57}. Le transcrit de *Tsix* se fait donc à partir du brin opposé à *Xist*, c'est-à-dire qu'il y est anti-sens^{42,58}.

Par diverses expériences de délétions, transgénèse, et troncation de transcrits, il a été suggéré que *Tsix* régulerait négativement *Xist* en *cis* et bloquerait l'inactivation sur le futur X actif^{59,60}. Cependant, le mécanisme par lequel *Tsix* agit pour influencer la régulation de *Xist* n'est pas encore bien connu. Il semble que la transcription anti-sens à travers le locus de *Xist* soit essentielle pour son rôle^{56,61,62}, contrairement à *Xist*, pour qui c'est l'ARN, et non la transcription, qui assure la fonction. Ainsi, la transcription du gène *Tsix* pourrait réprimer directement l'expression et l'accumulation de *Xist* en encombrant stériquement le locus anti-sens avec la machinerie transcriptionnelle. Récemment, une étude a avancé l'hypothèse que *Tsix* avait plutôt un rôle à jouer dans le remodelage de la chromatine du locus *Xist/Tsix*⁶³.

Puisque *Tsix* régule *Xist*, ou du moins, est impliqué dans la régulation de son locus, on doit connaître les éléments qui régulent *Tsix* afin de comprendre comment l'ICX est régulée. Jusqu'à présent, quelques régulateurs positifs de *Tsix* ont été identifiés, comme *DXPas34* et *Xite* (discuté plus loin).

Chez l'humain, un transcript anti-sens à *XIST* a aussi été détecté⁶⁴. Seulement, ce transcrit est considérablement réduit en abondance et en taille, de même qu'il ne recouvre pas le locus *XIST* en entier, puisque la transcription de *TSIX* se termine avant le promoteur de *XIST*⁶⁴. Ainsi, la transcription de *TSIX* s'effectue à partir du chromosome inactivé et persiste dans les tissus placentaires et foetaux durant l'embryogenèse, suggérant que *TSIX* ne peut réprimer *XIST* et qu'il n'est pas l'élément protégeant un chromosome de l'inactivation⁶⁵. De plus, la transcription de *TSIX* n'a pas d'empreinte maternelle⁶⁵, ce qui est consistant avec le fait que l'inactivation n'est probablement pas imprégnée dans les tissus placentaires humains^{23,66}.

Autres éléments génétiques du Xic : Xce, Xite

D'autres éléments importants pour l'ICX seraient situés dans le 50 kb de région en amont de *Tsix*⁵⁵. À l'intérieur de ces bornes ont été identifiés jusqu'à présent deux éléments dont la caractérisation n'est pas encore complétée : un locus contrôlant le choix du X (*Xce*) et des sites de transcription intergénique (*Xite*).

Xce, pour « X-inactivation controlling element », biaise le choix du chromosome X à inactiver en modifiant sa probabilité d'être choisi⁶⁷⁻⁶⁹. *Xce* a d'abord été identifié dans une génération F1 d'hybrides de souris, chez qui la majorité des cellules inactivaient le chromosome X du même parent⁷⁰. En utilisant cette approche expérimentale, 4 allèles différents de *Xce* ont été identifiés (provenant de 4 lignées différentes de souris), et nommés selon le gradient de leur probabilité à demeurer sur le chromosome X actif ($Xce^a < Xce^b < Xce^c < Xce^d$)^{67,68,71}. En d'autres termes, 2 chromosomes X dans une cellule ont la même chance d'être inactivés s'ils possèdent le même allèle *Xce*; tandis qu'un chromosome X est plus souvent inactivé s'il possède un allèle *Xce* plus faible que son homologue.

Bien que *Xce* ait été identifié depuis longtemps, sa localisation exacte n'est pas connue. On croit que *Xce* résiderait en aval de *Xist*, probablement dans la région de 15 kb en amont de *Tsix*⁷² et qu'il ne serait composé que de 1 ou quelques facteurs (gènes)⁷⁰.

Le mécanisme moléculaire de *Xce* n'est pas tout à fait élucidé non plus. Il est connu que *Xce* exerce un effet primaire, sur le choix du chromosome à inactiver, plutôt qu'un effet secondaire, sur la survie cellulaire⁶⁹. De plus, il a été relevé que les différents allèles *Xce* corrélaient avec différents niveaux de méthylation sur l'ADN du chromosome X porteur, précisément dans une région située en 3' de *Xist* (*DXPas34*, voir section suivante), suggérant que *Xce* ait un effet (direct ou indirect) sur le locus, et puisse ainsi, possiblement, influencer l'expression de *Xist*⁷³. Cette observation pourrait expliquer le fait que le niveau d'ARN de *Xist* soit inversement corrélé à la force de l'allèle *Xce*⁴⁰. Il est donc possible, même s'il manque des preuves, que *Xce* influence le choix du chromosome en agissant sur l'expression de *Xist*.

Pour l'instant, il n'est pas connu s'il existe un *XCE* humain.

Xite (pour « *X*-inactivation intergenic transcription elements ») est situé en amont du promoteur de *Tsix*, et se compose d'éléments intergéniques dont la transcription est régulée de façon similaire à *Tsix* : dans des cellules ES mâles et femelles, l'expression de *Xite* est maximale au moment de l'initiation de l'ICX et nulle dans les cellules somatiques⁷⁴. De par sa location, et de par le fait qu'une délétion de *Xite* augmente la probabilité du chromosome muté d'être choisi pour l'inactivation, *Xite* est un locus candidat pour *Xce*. De plus, en comparant des lignées de souris possédant différents allèles *Xce*, il a été observé que *Xite* contenait de nombreux polymorphismes et des sites différentiels de sensibilité à la Dnase⁷⁵. Cependant, il reste à démontrer que *Xite* est effectivement *Xce*.

Xite agirait en favorisant l'expression de *Tsix* en *cis* sur le futur X actif⁷⁴. Dans une cellule possédant différents allèles de *Xite*, l'allèle qui démontre une plus grande sensibilité à la Dnase démontre aussi une plus grande expression des transcrits intergéniques. Cette aspect différentiel pourrait générer une asymétrie dans l'expression de *Tsix*⁷⁵, et être à la base du choix du X à inactiver (discuté plus loin).

Par ailleurs, *Xite* ne semble pas avoir d'homologue chez l'humain, puisque les recherches par homologie de séquences ont révélé que ce gène était absent du chromosome X humain. Encore une fois, ceci accentue l'hypothèse voulant que les mécanismes de l'inactivation soient différents entre la souris et l'homme.

Élément épigénétique du Xic : DXPas34

DXPas34, situé à environ 15 kb en aval du gène *Xist* et 1 kb en aval du promoteur du gène *Tsix*, est un îlot CpG qui présente des sites de méthylation différentielle⁷³, qui sont régulés en fonction du développement⁷⁶. À cause de ce profil et de la proximité au promoteur de *Tsix*, il est suggéré que *DXPas34* soit un régulateur de *Tsix*. En conséquence, la délétion de *DXPas34* a aboli la transcription anti-sens⁷⁷.

Éléments en trans

Jusqu'à présent, de nombreux éléments en *cis* ont été identifiés en tant que régulateurs de l'inactivation. Pourtant, les modèles de l'ICX incluent tous des éléments en *trans*. À ce jour, un seul élément *trans*, qui est un facteur autosomal, a été identifié.

Facteur autosomal : CTCF

En étudiant *DXPas34*⁷³, il a été mis en évidence que cette région contenait des répétitions de 60-70 pb qui présentaient des ressemblances aux sites de liaison connus pour CTCF⁷⁸. CTCF est un facteur de transcription qui agit, en autres, en tant qu'insulateur à différents gènes imprégnés^{79,80}. C'est ainsi que la liaison de CTCF à *DXPas34* a été démontrée *in vitro* et *in vivo*, suggérant un rôle pour ce facteur dans le comptage et le choix du chromosome à inactiver⁷⁸. CTCF agirait en régulant la transcription de *Xist* ou *Tsix*⁷⁸. Il a été suggéré que CTCF soit impliqué dans la désignation du futur Xa, en promouvant l'expression de *Tsix* sur le Xa ou en bloquant l'accès de *Xist* à des « enhancers »⁷⁸.

Chez l'humain, CTCF pourrait aussi être impliqué dans la régulation du promoteur de *Xist* lors des premiers stades de l'ICX⁸¹.

Vision intégrée du comptage, du choix et de l'initiation de l'inactivation

Afin de mieux comprendre comment est initiée l'ICX, il est important d'intégrer tous les éléments régulateurs identifiés jusqu'à maintenant et de s'interroger sur leur rôle dans le comptage, le choix et l'initiation de l'ICX (Figure 3).

Le modèle courant est celui de la balance d'expression *Xist-Tsix* (résumé par ^{75,82,83}). Puisque l'expression de *Tsix* doit être sous-réglée sur le futur chromosome Xi (pour permettre l'expression de *Xist* par ce chromosome) et qu'elle doit persister sur le futur chromosome Xa (pour réguler négativement *Xist*), l'asymétrie de l'expression de *Tsix* est le but à atteindre. Pour ce faire, un facteur bloquant (ou facteur autosomal, par exemple CTCF) serait produit en quantité limitée de telle sorte qu'il ne pourrait s'associer qu'à un seul des 2 *Xic*. Ce faisant, ce facteur participerait au comptage, puisque sa liaison à un chromosome X aurait

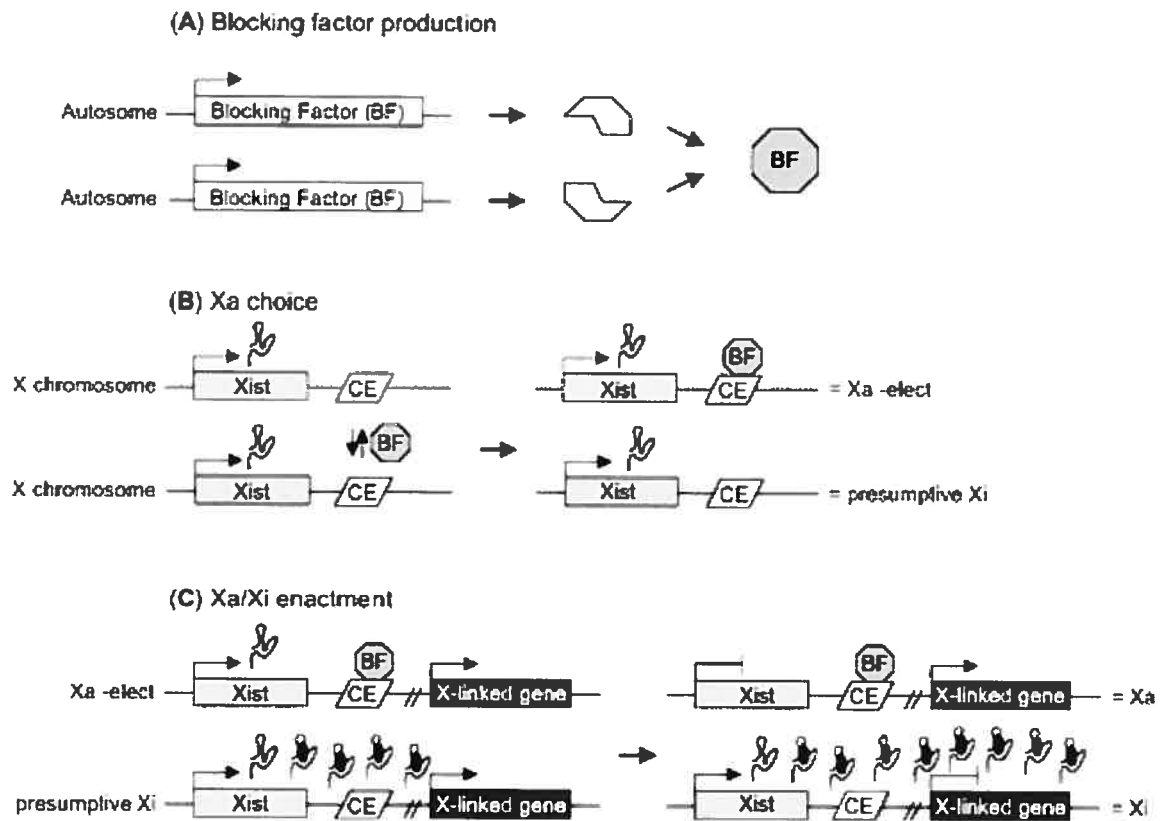


Figure 3 Processus de l'ICX. A. Un facteur bloquant (BF pour « blocking factor »), tel CTCF, serait produit en quantité limitée. B. Le BF s'associerait à l'un des 2 *Xic* de la cellule. Sa liaison déterminerait le chromosome qui demeurerait actif. Différents éléments, tels *Xce*, *Xite* et *DXPas34* influenceraient en *cis* la liaison du BF. C. Sur le futur chromosome X actif, la liaison du BF favoriserait la sur-régulation de *Tsix* (non illustré sur l'image), ce qui régulerait négativement *Xist*. Sur le futur chromosome inactif, l'absence du BF empêcherait la sur-régulation de *Tsix*, et ainsi promouvoirait l'expression de *Xist*. L'accumulation du transcrit *Xist* enclenche la cascade d'événements formant l'hétérochromatine du chromosome X inactif. Tiré de Plath et al., *Ann Rev Genet*, 2002⁸²

pour effet d'empêcher l'inactivation de ce chromosome. Au contraire, sur l'autre chromosome, l'absence de liaison du facteur bloquant empêcherait la sur-régulation de *Tsix*, et donc favoriserait l'expression de *Xist*. Les autres éléments, tels que *Xce*, *Xite* et *DXPas34* participeraient au choix du chromosome à inactiver en influençant en *cis* l'interaction du facteur bloquant au chromosome. Par exemple, chez une souris hétérozygote pour *Xce*, le facteur bloquant s'associerait avec plus d'affinité au chromosome porteur de l'allèle le plus fort, ce qui fait que ce chromosome serait plus souvent choisi pour demeurer actif.

Chez l'humain, il n'est pas connu comment se déroulent les différentes étapes de l'inactivation du chromosome X.

1.1.6 Caractéristiques du X inactif

Chromatine

L'ICX est accompagnée d'une série de modifications épigénétiques au chromosome inactif, qui le distinguent du chromosome actif. Ces modifications caractérisent le chromosome X inactif d'une hétérochromatine, i.e une chromatine non permissive à la transcription génique⁸⁴. Chez la cellule ES en culture, ces modifications surviennent de façon séquentielle après induction de la différenciation et donc, de l'inactivation. Suite au recouvrement du chromosome par le transcrit *Xist* (à environ 2 jours post-différenciation), il y a d'abord apparition de la méthylation de H3K9^{85,86} qui concorde avec l'hypoacétylation de H3K9 et l'hypométhylation de H3-K4⁸⁷. Le recouvrement par *Xist* est aussi suivi par l'accumulation du complexe protéique polycomb Eed-Ezh2 et la méthylation de H3K27^{88,89}. D'autres modifications épigénétiques apparaissent plus tardivement, comme l'hypoacétylation de H4³⁶, l'accumulation de macroH2A⁹⁰ et la méthylation des îlots CpG⁹¹. Par ailleurs, il a été récemment mis en évidence que le chromosome inactif était enrichi en H2A ubiquitylée⁹², contrairement au chromosome actif. Toutes ces modifications contribuent à l'établissement ou au maintien de la répression génique.

Par ailleurs, il a aussi été montré que ces mêmes modifications apparaissaient lors de la première inactivation imprégnée dans l'embryon de souris, mais sur le chromosome X paternel uniquement³⁴.

Puisque le chromosome est formé de chromatine condensée, il est visible à la périphérie du noyau et a été identifié initialement comme étant le corpuscule de Barr⁹³. De plus, sa réplication se fait plus tardivement que les autres chromosomes en phase S^{94,95}.

L'inactivation des gènes sur le chromosome X se ferait progressivement, en se dispersant graduellement du centre de l'inactivation du chromosome X (*XIC*). Au moment où l'embryon est formé de 16 cellules, les premiers gènes inactivés sont ceux situés de part et d'autre de *XIC*; alors que les gènes plus éloignés sont inactivés à un stade plus tardif^{35,96}.

Échappée à l'inactivation

Bien que l'ICX réprime la transcription génique, beaucoup de gènes échappent à l'inactivation et sont exprimés par le chromosome inactif, comme par exemple les gènes situés dans la région pseudo-autosomale (RPA, définie à la section 1.1.1)⁹⁷. Puisque les gènes de la RPA possèdent un homologue sur le chromosome Y, les mâles et les femelles expriment 2 copies de ces gènes et ont donc un dosage génique équivalent. Lors de la méiose chez le mâle, il peut y avoir recombinaison entre les RPA du chromosome X et Y.

Par contre, ce ne sont pas tous les gènes qui échappent à l'inactivation qui possèdent un homologue sur le chromosome Y. Certains gènes, situés en particulier sur le bras court du chromosome X, hors de la région pseudo-autosomale, montrent aussi une expression par le Xi⁹⁷. Curieusement, il a été démontré récemment que certains de ces gènes échappaient de façon variable à l'inactivation, puisque certaines femmes les expriment fortement, alors que d'autres les expriment faiblement⁹⁸. De plus, l'expression est parfois variable dans différents types cellulaires d'une même femme^{99,100}.

Le portrait semble différent entre la souris et l'homme. Dans une étude où plus de 600 gènes et ESTs (Expressed sequence tags) liés au X ont été testés chez l'humain, 15% ont montré une expression par le chromosome X inactif, et un 10% additionnel ont montré une expression variable⁹⁸. Chez la souris, par contre, de tous les gènes testés jusqu'à présent, seulement 7 ont montré une inactivation du X_i ¹⁹. Par contre, le nombre de gènes qui ont été testés est beaucoup moins élevé chez la souris que chez l'homme (respectivement une douzaine par rapport à 600), de telle sorte que nous ne pouvons comparer clairement les 2 espèces. Néanmoins, le fait qu'un nombre moins élevé de gènes échappe à l'inactivation chez l'humain pourrait expliquer les phénotypes différents de la souris 39,X (viable) et de l'humain 45,X (non-viable). Par ailleurs, ces gènes sont des candidats potentiels pour les phénotypes associés à une aneuploïdie du chromosome X⁹⁷

1.2 Mosaïcisme

À cause de l'inactivation d'un des 2 chromosomes X dans chacune de leurs cellules, les femmes sont formées de deux populations de cellules différentes, qui se distinguent par le chromosome X qui y est exprimé, soit le chromosome X d'origine paternelle ou celui d'origine maternelle. Dans cette section, nous verrons plus en détails les bases de cette dualité cellulaire, qu'on appelle couramment mosaïcisme, ainsi que les moyens que nous avons pour calculer en quelles proportions ces 2 populations de cellules se trouvent.

1.2.1 Définition

Les femelles sont hétérozygotes à de nombreux loci sur le chromosome X, étant donné le grand nombre de polymorphismes naturellement présents dans le génome. Par conséquent, l'inactivation d'un des 2 chromosomes X dans chacune des cellules conduit à la formation de 2 populations de cellules, qui se distinguent par les gènes exprimés : les gènes liés au X paternel ou ceux liés au X maternel¹. Puisque l'ICX se produit tôt dans le développement, que le chromosome inactif est transmis de façon stable lors des mitoses subséquentes, et que les cellules d'une même progénie s'agencent bien souvent ensembles (dans certains tissus comme

les épithéliaux par exemple), les femmes sont des mosaïques, dans lesquelles chaque tuile de la mosaïque représente un groupe de cellules possédant le même chromosome X actif¹⁰¹. La largeur des tuiles dépend par la suite de la migration des cellules précurseures, ainsi que de leur façon de se mélanger pour agencer les tissus^{102,103}.

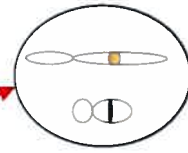
Cet effet de mosaïque est observable sur la fourrure des souris femelles hétérozygotes pour un déterminant de la couleur lié au X. L'hétérozygotie à ces loci donne lieu à des fourrures tâchetées ou rayées (« mottled », « brindled », « tortoise shell » ou « tabby »)¹⁰. Un autre exemple est la chatte Calico, qui présente des taches de couleur orange et noir sur sa fourrure, dépendant de l'allèle exprimé¹⁰⁴ (Figure 4A). Sur l'épiderme humain, il n'a été possible de visualiser l'effet de mosaïque que dans certaines situations cliniques, comme chez les femmes porteuses d'une mutation causant la dysplasie ectodermale anhidrotique (Figure 4B). Chez ces femmes, les cellules exprimant l'allèle muté montrent une diminution ou une absence de glandes sudoripares, de sorte que les tuiles formées de ces cellules sont reconnaissables par leur défaut de sudation¹⁰⁵ (Figure 4B). Sur d'autres tissus humains, il a été possible d'observer l'effet mosaïque, par exemple dans des biopsies d'intestins et de seins, en se servant de marqueurs immunohistochimiques qui permettent de distinguer les 2 populations de cellules via leurs isoenzymes^{102,106}.

1.2.2 Ratios d'inactivation

Le degré de mosaïcisme est exprimé par le ratio d'inactivation (aussi appelé le ratio de Lyonisation, en l'honneur de Mary Lyon). Ce ratio rapporte la distribution des 2 populations de cellules l'une par rapport à l'autre, en calculant le nombre de cellules exprimant le chromosome X maternel, par rapport au nombre de cellules exprimant le chromosome X paternel.

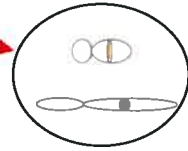
En déterminant le ratio d'inactivation, on estime à quel degré les gènes du X paternel sont exprimés, par rapport aux gènes du X maternel (ou vice-versa). Ce ratio, lorsqu'il est biaisé, signifie qu'un des 2 allèles de chaque gène est plus souvent transcrit que l'autre. Un ratio d'inactivation biaisé peut donc avoir un effet

A



X actif → fourrure orange

X inactif



X inactif

X actif → fourrure noire

B

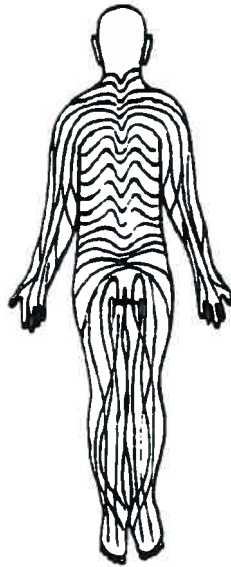


Figure 4 Mosaïcisme. Les femelles sont des mosaïques de cellules qui expriment le chromosome X paternel et de cellules qui expriment le chromosome X maternel. **A.** Fourrure de la chatte Calico. Ces chattes sont hétérozygotes pour un déterminant de la couleur (orange ou noire) lié au chromosome X. **B.** Lignes de Blaschko sur le dos d'une femme hétérozygote pour une mutation liée au chromosome X causant la dysplasie ectodermale hypohidrotique. Les cellules exprimant l'allèle muté ont un défaut de sudation, ce qui les distingue des cellules exprimant l'allèle normal parce qu'elles se colorent suite à un test de sudation utilisant de la fécula et de l'iode. La distribution des cellules suit des formes de V, de part et d'autre de la colonne vertébrale, nommées les lignes de Blaschko. Ces lignes reflètent la croissance dorsoventrale des 2 populations de cellules durant le développement. Image tirée Traupe, 1999¹⁰⁷.

sur le phénotype, dans le cas par exemple où un des 2 allèles d'un gène possède une mutation. Mais avant d'aborder plus en détails le mosaïcisme biaisé (chapitre 1.3), voyons quelles méthodes sont à notre disposition pour calculer le ratio d'inactivation d'un tissu, à partir d'un échantillon de ce tissu.

1.2.3 Méthodes pour déterminer les ratios d'inactivation

Pré-requis

Les méthodes pour déterminer le ratio d'inactivation d'un échantillon donné doivent remplir 2 conditions : d'une part permettre de distinguer le chromosome X actif du chromosome X inactif, et d'autre part, être capable de distinguer le chromosome X paternel du maternel. Pour différencier les chromosomes actifs et inactifs, les méthodes se basent soit sur l'expression (ARN ou protéine), car seulement les gènes du X actif sont exprimés, ou soit sur la méthylation différentielle entre les 2 chromosomes X (l'ADN du X inactif étant hyperméthylé, contrairement à l'ADN du X actif qui est hypométhylé). Pour différencier les X paternel et maternel, les méthodes tirent avantage des nombreux polymorphismes présents sur différents loci du chromosome.

Essais expression (protéine)

Les premières méthodes développées pour déterminer le ratio d'inactivation d'un tissu se servaient d'un variant présent dans l'exon du gène de la glucose-6-phosphate deshydrogenase (G6PD)^{108,109}, qui causait l'expression de l'une ou l'autre des 2 isoenzymes de cette protéine selon l'allèle qui était exprimé dans la cellule. Par immunohistochimie, il était possible de distinguer ces isoenzymes et de les quantifier¹¹⁰.

Essais méthylation (ADN)

Durant les années 80, l'identification sur l'ADN de polymorphismes liés à des sites différentiellement méthylés entre les chromosomes X actif et inactif a permis de développer de nouveaux essais. Ces essais sont basés sur le fait que l'ADN du chromosome X inactif est fortement méthylée, contrairement à l'ADN du chromosome X actif¹¹¹. Par exemple, il a été possible de calculer le ratio d'inactivation en analysant sur gel des polymorphismes de longueurs de fragments

de restriction (RFLP) digérés par une enzyme sensible à la méthylation. Le calcul se fait en quantifiant la proportion de fragments digérés (donc qui étaient sur le chromosome X actif), par rapport à la proportion de fragments non digérés (donc qui étaient sur le chromosome X inactif), et ce, grâce à l'utilisation de sondes pour identifier les loci (par exemple PGK, HPRT ou M27 β au locus DXS255)^{112,113}.

Un avancement considérable a été réalisé par Allen et ses collaborateurs¹¹⁴ lorsque ceux-ci ont développé l'essai HUMARA (pour « HUMAN Androgen Receptor Assay »). L'HUMARA est une méthode qui profite d'un polymorphisme d'une courte séquence répétée en tandem (STR) située dans le premier exon du gène de récepteur de l'androgène (AR)¹¹⁵. Ce STR est extrêmement polymorphique, puisque 90% des femmes de tous les groupes raciaux sont hétérozygotes à ce locus¹¹⁶, et il est lié à deux sites de restriction pour des enzymes sensibles à la méthylation, soit *HpaII* et *HhaI*¹¹⁴. Cette équipe a développé un essai encore plus facile à réaliser que l'analyse RFLP, simplement en procédant à une digestion suivie d'une amplification PCR. Ainsi, en comparant les profils d'amplification PCR d'un échantillon sans digestion *HpaII* préalable (tous les allèles sont amplifiés) avec le même échantillon préalablement digéré avec *HpaII* (seulement les allèles inactifs sont amplifiés), chez une femme hétérozygote, il est possible de calculer le ratio d'inactivation de l'échantillon. Pour une meilleure compréhension de cette méthode, une figure sera présentée au chapitre 2 (« Méthodes »).

Essais transcription (ARN)

Pour la majorité des gènes liés au chromosome X, leur expression est limitée au chromosome X actif. Les essais transcription reposent donc sur l'analyse de polymorphismes de nucléotide simples (SNPs) codants, au niveau de l'ARN de ces gènes (contrairement aux essais expression au niveau de la protéine). Des SNPs codants à divers gènes, tels G6PD¹¹⁷, iduronate-2-sulfatase (IDS)¹¹⁸ et p55¹¹⁹, ont été utilisés jusqu'à présent. Par RT-PCR quantitatif utilisant des amorces spécifiques à chaque allèle, il est possible de calculer la proportion d'un transcrit par rapport à l'autre (ce qui traduit le ratio d'inactivation).

Avantages et inconvénients de chaque méthode

L'essai d'expression de protéines est limité par le fait que peu de femmes soient hétérozygotes, donc informatives à ce locus (G6PD). De plus, la technique nécessite de grandes quantités d'extraits cellulaires. C'est pourquoi cette technique n'est plus fréquemment utilisée.

Les essais méthylation, pour leur part, sont beaucoup plus faciles à réaliser (digestion et amplification PCR), en plus de ne nécessiter qu'une petite quantité d'ADN (< 1µg d'ADN). En particulier, l'essai HUMARA, de par sa très grande informativité (90% des femmes sont hétérozygotes), s'est imposé comme une méthode de choix. Cependant, ces essais reposent sur les patrons de méthylation, qui doivent être stables et non-altérés, comme dans certains cancers où les résultats des essais méthylation peuvent être faussés^{120,121}.

Les essais transcription ont donc amené l'avantage de représenter réellement le niveau d'activité des chromosomes X, et non de compter sur les patrons de méthylation. Par contre, ils ont comme limite de n'être utiles que dans les tissus pour lesquels les gènes testés sont exprimés.

Quelques études ont comparé les méthodes basées sur l'ADN à celles basées sur l'ARN, afin de les valider¹²²⁻¹²⁴. Harrison, en testant les échantillons sanguins de 56 femmes, a démontré la bonne corrélation entre les méthodes HUMARA (ADN) et IDS (ARN) ($r=0,98$)¹²³. Par contre, El-Kassar, en testant les échantillons sanguins de 40 femmes nouveau-nées, a montré une discordance entre ces 2 méthodes, qu'elle a attribuée à une méthylation de l'ADN incomplète à la naissance¹²⁴. Il reste toujours à confirmer et expliquer cette discordance.

1.3 Mosaïcisme biaisé

Si l'ICX est aléatoire dans l'embryon, les femmes devraient en théorie présenter un ratio d'inactivation non-biaisé, où la proportion des cellules qui expriment le Xmat

est équivalente à la proportion des cellules qui expriment le Xpat. Une déviation importante de ce ratio 50:50 est appelée mosaïcisme biaisé ou ratio d'inactivation biaisé (traduction de « skewing of X-chromosome inactivation »). Le qualificatif biaisé s'attribue lorsqu'il y a 75% ou plus des cellules qui expriment le même chromosome X (Figure 5). Ce critère de 75%, choisi arbitrairement, est le plus fréquemment utilisé dans la littérature^{112,125-127}, bien que des critères plus stringents (comme 80%, 90% ou même 95%) soient aussi utilisés pour exprimer le mosaïcisme biaisé¹²⁸⁻¹³⁰.

1.3.1 Essais de clonalité

L'étude des ratios d'inactivation chez l'humain a débuté avec l'utilisation de l'ICX comme outil pour déterminer la clonalité d'une tumeur^{109,131,132}. Une tumeur est clonale lorsqu'elle se développe par la prolifération accrue d'une cellule ayant acquis une mutation somatique lui conférant un avantage par rapport aux cellules normales^{133,134}. Déterminer l'origine d'une tumeur fournit des indices quant à sa pathogénéicité et son agressivité¹³⁵. Ainsi, puisque toutes les cellules composant une tumeur d'origine clonale sont issues d'une même cellule, elles possèdent toutes le même chromosome X actif, qui se traduit par un ratio d'inactivation complètement biaisé. L'analyse de l'ICX, pour déterminer la clonalité d'une tumeur, apporte plusieurs avantages par rapport aux autres méthodes traditionnelles, telle que l'analyse cytogénétique¹³⁶. D'abord, elle n'utilise pas de marqueurs spécifiques à une tumeur donnée, ce qui fait qu'en théorie, elle peut servir à toutes les tumeurs. Ensuite, l'analyse peut se faire à partir d'un simple échantillon d'ADN, ce qui permet d'analyser toute population de cellules nucléées. Finalement, même si l'analyse est restreinte aux femmes informatives (i.e. hétérozygotes au locus utilisé pour la détermination du ratio d'inactivation), il est possible d'évaluer pratiquement toute femme, en ayant à sa disposition quelques tests à différents loci.

Cependant, si l'inactivation du chromosome X est effectivement aléatoire, la possibilité qu'une femme montre un ratio d'inactivation extrêmement biaisé (voir chapitre 3) serait rare, mais probable. Même rares, des ratios d'inactivations biaisés, dans lesquels l'une des 2 populations de cellules est surreprésentée par

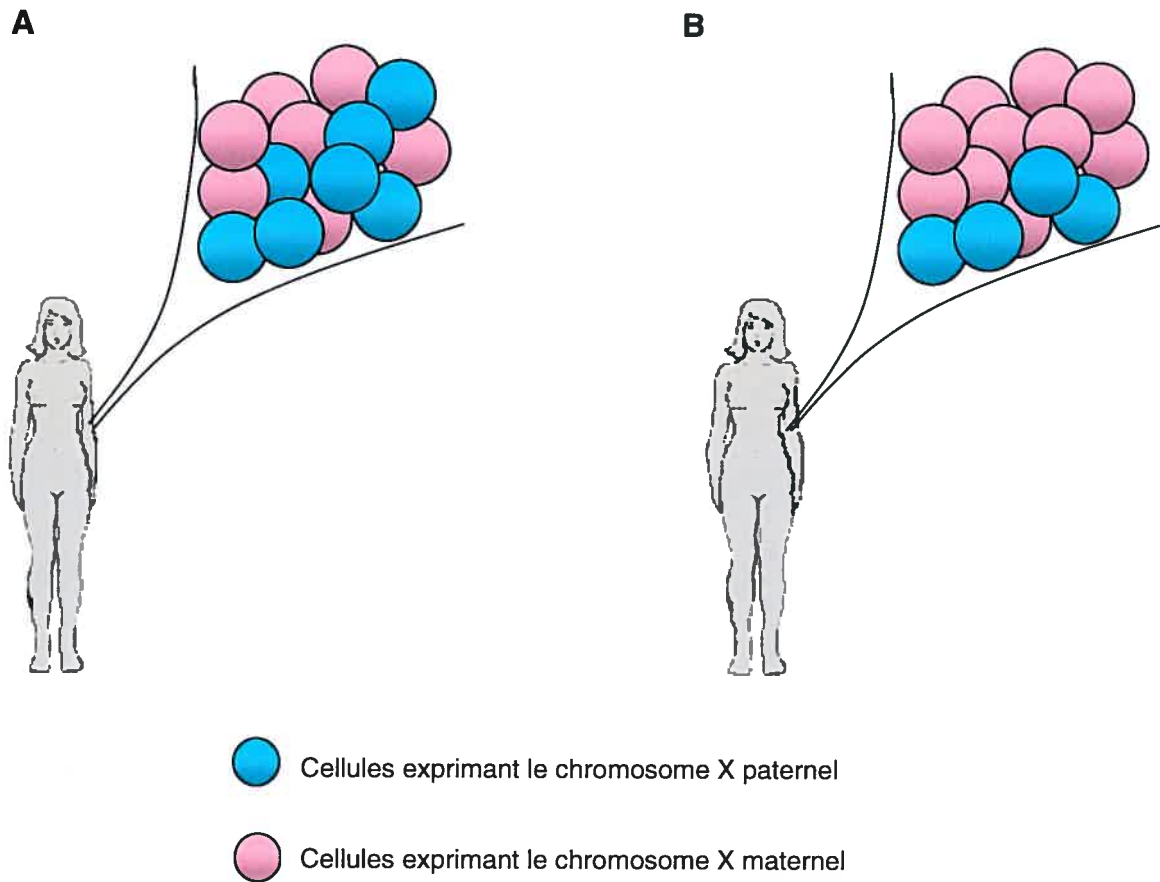


Figure 5 Mosaïcisme biaisé. **A.** En théorie, la moitié des cellules expriment un chromosome X et la moitié exprime l'autre (mosaïcisme non-biaisé). **B.** Le mosaïcisme est biaisé lorsque 75% ou plus des cellules expriment le même chromosome X.

rapport à l'autre, pourraient reproduire la dérivation clonale et fausser les résultats d'analyse tumorale^{125,137}. C'est pourquoi il est apparu important à ce moment-là de documenter ce phénomène dans une population de femmes normales.

Bien qu'elle ait d'abord servi à déterminer la clonalité des tumeurs, l'analyse des ratios d'inactivation chez des femmes normales a ouvert la voie à d'autres champs de recherche, qui sont aujourd'hui très actifs, comme l'étude de l'hématopoïèse en relation avec l'âge et le mécanisme de l'ICX chez l'humain.

1.3.2 Mosaïcisme biaisé et maladies

L'ICX n'est la cause d'aucune maladie. Elle peut néanmoins avoir une conséquence sur le phénotype de femmes porteuses d'une mutation récessive liée au X, via les patrons variables d'inactivation^{138,139}. Par exemple, un ratio d'inactivation défavorable, dans lequel la majorité des cellules expriment le chromosome X muté, augmente la pénétrance et la sévérité de certaines maladies et provoque même l'expression de traits récessifs, comme l'hémophilie¹⁴⁰, l'incontinentia pigmenti¹⁴¹, le syndrome du X fragile¹⁴² et la dystrophie musculaire de Duchenne¹⁴³. Ces maladies sont normalement plus fréquentes chez les hommes hémizygotés qui expriment la mutation dans toutes les cellules.

À l'inverse, un ratio d'inactivation favorable (dans lequel la majorité des cellules expriment l'allèle normal) prévient le développement de la pathologie chez la femme porteuse. En particulier, lorsque le gène en question s'exprime durant le développement, l'allèle muté peut causer un désavantage de prolifération aux cellules qui l'expriment, provoquant le peuplement de l'embryon (ou du moins ses tissus dans lesquels le gène est exprimé) par l'autre population de cellules. Un ratio d'inactivation extrêmement biaisé est alors observé dans un ou plusieurs tissus chez la femme adulte. C'est ce qui explique que quelques pathologies soient associées à des mosaïcismes biaisés chez des femmes porteuses, mais non-atteintes, de syndromes tels que Wiscott-Aldrich (causé par une mutation au gène WASP)¹⁴⁴ ou Lesch-Nyan (causé par une mutation au gène HPRT)¹⁴⁵. Dans ces cas, seul un mosaïcisme biaisé primaire (voir plus loin), causé par un autre

locus sur le X peut provoquer l'apparition des symptômes de la pathologie chez les femmes hétérozygotes^{146,147}.

Toutefois, ces cas de mosaïcisme biaisé sont rares, puisque l'incidence de ces mutations dans la population en général est très faible (de l'ordre de 1 homme/250 000).

1.3.3 Incidence du mosaïcisme biaisé chez des femmes normales

Les premières études concernant l'incidence du mosaïcisme biaisé dans des populations de femmes normales ont d'abord mené à des données contradictoires dans la littérature. Par exemple, Volgestein n'a identifié que 3 femmes présentant un mosaïcisme biaisé ($\geq 75\%$), sur un total de 81 ($3,7\%$)¹¹², alors que Gale en a identifié 15 sur un total de 65 échantillons sanguins (23%)¹²⁵. Utilisant un critère légèrement plus stringant ($\geq 80\%$), Harris a observé pour sa part que 4 femmes sur 42 ($9,5\%$) avaient un biais d'inactivation dans le sang¹⁴¹.

La discordance entre les études a d'abord été attribuée à la diversité des méthodes employées, ainsi qu'au nombre restreint de femmes testées par chacune. Cependant, des études subséquentes, rapportant les ratios d'inactivation en fonction des tissus étudiés ont clarifié une partie de la controverse. En effet, il a été identifié par plusieurs investigateurs que l'incidence du mosaïcisme biaisé ($\geq 75-80\%$) était relativement faible (de 10% à 30%) dans divers tissus comme la muqueuse intestinale, la glande thyroïde, le muscle et l'épithélium buccal^{129,148,149}, mais qu'il était plus élevé dans le tissu sanguin (de 20% à 56%) et ce, pour toutes les études^{129,148,150}.

Par la suite, l'étude des ratios d'inactivation en fonction de l'âge a jeté encore plus de lumière sur les discordances précédentes. En effet, 3 études importantes ont marqué un point tournant en rapportant une augmentation de l'incidence de mosaïcisme biaisé ($\geq 75\%$) dans le sang avec l'âge^{127,150,151}. Ces études, en utilisant différents essais de méthylation, ont observé que cette incidence passait de $8-22\%$ chez les femmes naissantes, à $16-22\%$ chez les jeunes adultes (autour de 30 ans), et à $38-56\%$ chez les femmes âgées ($\geq 60-75$ ans). Cette

augmentation du mosaïcisme biaisé dans le sang a été confirmée par d'autres investigateurs^{124,129,152-154}, démontrant que le mosaïcisme biaisé peut s'acquérir avec l'âge. Toutefois, aucune étude n'a rapporté une augmentation de mosaïcisme biaisé pour d'autres tissus jusqu'à présent. En fait, une seule étude a observé qu'il n'y avait pas d'augmentation de l'incidence de mosaïcisme biaisé entre 25 et 60 ans dans les tissus épithéliaux buccal et urinaire¹²⁹.

Le pourcentage relativement élevé de femmes âgées montrant un mosaïcisme biaisé dans le sang (environ 40%) en fait un trait commun. Les causes possibles de l'incidence croissante de mosaïcisme biaisé dans le sang seront abordées à la section 1.3.6. D'autre part, le mosaïcisme biaisé observé à une faible incidence dans les autres tissus pourrait être causé par un mécanisme commun à tous ces tissus et sera discuté à la section 1.3.7.

1.3.4 Corrélations inter-tissus des ratios d'inactivation

Lorsque les ratios d'inactivation de différents tissus d'une même femme ont été comparés, il est apparu que tous les tissus étudiés autres que le sang, comme le muscle, la peau, la thyroïde, la glande surrénale, l'épithélium buccal et l'épithélium urinaire, montraient des ratios d'inactivation relativement similaires entre eux (coefficients de corrélation r variant entre 0,26 et 0,99)^{129,148,149}. La même observation a été rapportée lorsque les ratios d'inactivation des différentes populations sanguines (lymphoïdes et myéloïdes) ont été comparés entre eux (r variant entre 0,57 et 0,97)^{148,151}. Par contre, lorsque le ratio d'inactivation du sang était comparé avec les ratios d'inactivation des autres tissus, les coefficients de corrélation les plus faibles ont été observés (r variant de 0,19 à 0,74)^{129,148,149,151}. De plus, la corrélation entre le sang et les autres tissus diminue avec l'âge^{129,151}.

1.3.5 Mosaïcisme biaisé à la naissance vs mosaïcisme biaisé associé à l'âge

Il est possible de rassembler toutes les observations qui ont été faites au sujet de l'incidence de mosaïcisme biaisé et de la corrélation inter-tissus et de les résumer en 4 points : (1) l'incidence de mosaïcisme biaisé est relativement faible et constante avec l'âge dans tous les tissus autres que le sang, (2) la corrélation des ratios d'inactivation entre ces tissus est bonne, (3) l'incidence de mosaïcisme

biaisé augmente avec l'âge dans le sang et (4) la corrélation des ratios d'inactivation entre le sang et les autres tissus est non seulement faible chez les femmes adultes, mais elle diminue avec l'âge. À partir de ces observations, Busque et ses collaborateurs¹²⁷ ont dégagé une hypothèse intéressante et ont suggéré (1) que les ratios d'inactivation soient identiques dans tous les tissus à la naissance et que l'incidence de mosaïcisme biaisé soit faible à cet âge et que (2) le mosaïcisme biaisé associé à l'âge, que l'on observe plus fréquemment dans le sang, soit spécifique à ce tissu. Cette hypothèse fait la distinction entre 2 formes de mosaïcisme biaisé : un de naissance (néonatal), qui origine de l'embryogenèse, et un associé à l'âge, dont l'incidence augmente avec l'âge. Par conséquent, ces 2 formes de mosaïcisme biaisé ont potentiellement des causes différentes.

1.3.6 Causes du mosaïcisme biaisé associé à l'âge (spécifique au sang)

Jusqu'à présent, les études semblent montrer que le mosaïcisme biaisé associé à l'âge se manifeste à un âge avancé, soit après 30 ans. En effet, dans les premières études, l'augmentation de l'incidence de mosaïcisme biaisé n'était statistiquement significative qu'entre les jeunes adultes (autour de 30 ans) et les femmes âgées ($\geq 60-75$ ans)^{127,150,151}. Au contraire, l'augmentation entre les nouveau-nées et les femmes adultes n'était pas significative. De plus, des études illustrant la dynamique du mosaïcisme biaisé avec l'âge, réalisées sur de larges cohortes, ont montré que l'augmentation n'était marquée qu'après 50 ans, et qu'elle se poursuivait sans cesse par la suite, allant jusqu'à affecter 67% des femmes âgées de plus de 100 ans^{153,154}. Toutefois, cette augmentation semble n'être visible qu'à long terme chez une femme donnée. En effet, une étude longitudinale, réalisée sur une cohorte de femmes prélevées 2 fois dans un intervalle d'environ vingt ans, a montré qu'il n'y avait aucune différence significative entre les ratios d'inactivation des premiers et deuxièmes prélèvements¹⁵⁵. Tout de même, une certaine augmentation a été observée dans les cas où les femmes avaient déjà plus de 60 ans lors du premier prélèvement¹⁵⁵.

Le mécanisme causant le mosaïcisme biaisé associé à l'âge n'est toujours pas résolu. Certaines théories avancent que ce mosaïcisme biaisé serait causé stochastiquement, soit par (1) divisions asymétriques ou déplétion clonale du

bassin de cellules souches hématopoiétiques avec l'âge^{150,155}, soit par (2) hématopoïèse clonale. Par contre, les théories les plus investiguées suggèrent plutôt qu'il ait des bases génétiques et soit le résultat (3) de sélections cellulaires hémizygotiques. D'ailleurs, plusieurs études ont tenté de déterminer l'héritabilité du trait pour en prouver les bases génétiques.

Sélection cellulaire hémizygote

Selon l'hypothèse de la sélection cellulaire hémizygote, une population de cellules souches, ayant un avantage de prolifération à cause des variants présents sur le chromosome X actif, aurait tendance, après plusieurs cycles de divisions cellulaires, à contribuer plus grandement au bassin de cellules différenciées. Par conséquent, le ratio d'inactivation se biaiserait avec le temps.

Cette hypothèse a reçu un fort appui lorsqu'il a été observé que chez des chattes Safari, provenant du croisement de chats domestique (d) et Geoffroy (G), un mosaïcisme biaisé associé à l'âge se manifestait systématiquement en faveur du chromosome X transmis par le parent G, tel qu'observé par la présence dominante de l'allèle G de la protéine G6PD dans le sang avec l'âge¹⁵⁶. Puisque leurs parents sont d'origines éloignées, les chattes Safari sont hétérozygotes à de nombreux loci. Ainsi, il est probable que des sélections cellulaires se seraient produites en faveur des cellules exprimant le chromosome X du parent G, si les variants sur un ou plusieurs gènes exprimés par ce chromosome soient plus favorables à l'hématopoïèse.

Héritabilité du mosaïcisme biaisé associé à l'âge

Il a été mis en évidence que le mosaïcisme biaisé pouvait être un trait héritable dans certaines familles^{130,157}, démontrant son aspect génétique. De plus, une étude qui a analysé le sang de plus de 250 femmes normales issues de 38 familles a mis en évidence que les ratios d'inactivation étaient concordants entre sœurs et que le mosaïcisme biaisé cartographiait au locus Xq25-q26¹²⁸.

Une autre évidence de l'héritabilité de ce trait est venue d'études sur les jumelles. En effet, il a été montré que les tissus sanguins de jumelles monozygotes âgées (> 73 ans) concordait pour leur ratio d'inactivation¹⁵², illustrant la tendance pour le

même chromosome X d'être actif dans ce tissu. Des études subséquentes ont confirmé cette corrélation^{154,158}.

Néanmoins, cette corrélation des ratios d'inactivation dans le sang des jumelles diminue avec l'âge¹⁵⁴. De plus, la dynamique du mosaïcisme biaisé associé à l'âge ne suit pas la tendance à une augmentation lente et constante comme il est prédit selon le modèle de sélection hémizygote^{153,155}. À cause ces faits, plusieurs auteurs concluent aujourd'hui que ce trait serait complexe, résultant d'une combinaison d'événements stochastiques et génétiques^{153,154,158}. Malgré tout, la recherche pour identifier les gènes causant le mosaïcisme biaisé avec l'âge se poursuit, puisque ces gènes pourraient être importants pour l'hématopoïèse. Éventuellement, ils pourraient être utiles lors de traitements thérapeutiques pour lesquels il est nécessaire de faire croître des cellules sanguines.

1.3.7 Causes du mosaïcisme biaisé néonatal

Contrairement au mosaïcisme biaisé associé à l'âge, le mosaïcisme biaisé néonatal a été beaucoup moins étudié. Tel que discuté précédemment, il affecte probablement tous les tissus de façon équivalente, bien qu'aucun autre tissu que le sang n'ait été étudié chez des nouveau-nés. Jusqu'à présent, il est estimé (à partir des données du sang) que l'incidence du mosaïcisme biaisé soit relativement faible dans ce groupe d'âge (environ 8 à 22%)^{127,150,151}.

S'il est effectivement un trait distinct du mosaïcisme biaisé associé à l'âge, et qu'il affecte tous les tissus de façon équivalente, le mosaïcisme biaisé néonatal pourrait être causé par un biais durant le processus d'inactivation. Ce biais pourrait être engendré par hasard, dû au petit nombre de cellules au moment de l'inactivation (stochastique), ou encore être influencé par des gènes qui contrôlent le choix du chromosome à inactiver (génétique). Par ailleurs, suite à l'ICX, des sélections cellulaires basées sur le chromosome X exprimé pourraient se produire et occasionner un mosaïcisme biaisé néonatal (secondaire). Des exemples de chacun de ces mécanismes sont décrits dans les paragraphes suivant et résumés au Tableau I.

Tableau I Causes du mosaïcisme biaisé néonatal

Biais dans le processus d'inactivation

Stochastique

Petit nombre de cellules au moment de l'ICX (Young)

Génétique

Xce murin⁷⁰

Mutations dans *XIST*¹⁵⁹

Mosaïcisme biaisé familial^{128,130,157,160}

Biais secondaire à l'ICX

Translocations X/autosomes¹⁶¹

Mosaïcisme spécifique au placenta¹⁶²

Petit nombre de cellules (stochastique)

Lorsque l'ICX a été décrit pour la première fois, il a été postulé en même temps que le choix du chromosome à inactiver soit aléatoire¹. Ainsi, dans cette éventualité où rien n'influencerait le choix du chromosome X à inactiver, il se pourrait tout de même que, par hasard, la majorité des cellules choisissent de façon indépendante d'inactiver le même chromosome X chez une femme donnée. L'incidence de ce mosaïcisme biaisé serait alors faible et dépendrait du nombre de cellules présentes dans l'embryon au moment de l'inactivation¹⁶³.

Xce chez la souris (génétique)

La première évidence d'un contrôle génétique sur le choix du chromosome à inactiver est venue de la découverte du locus *Xce*⁷⁰ chez la souris. Même si la localisation exacte de ce locus n'est pas encore définie, il a été reconnu que l'élément *Xce* biaisait en *cis* le choix du chromosome à inactiver (voir le chapitre 1.1.5). Une souris hétérozygote à ce locus présente donc des ratios d'inactivation biaisés, variant de 70% à 80% ou même plus¹⁶⁴, probablement en raison de son influence en *cis* sur la persistance de l'expression de *Xist*.

Un équivalent humain du locus *Xce* n'a pas encore été identifié, bien que plusieurs études aient suggéré son existence. En effet, l'identification de mutations dans le gène *XIST*, de même que la démonstration de l'hérédité du mosaïcisme biaisé dans certaines familles, sont autant d'indices que le choix du chromosome à inactiver chez l'humain puisse être, comme chez la souris, influencé par des gènes.

Mutations du gène XIST (génétique)

Une mutation dans la région promotrice de *XIST* (C(-43)G), affectant l'expression de *XIST* en *cis*, a été identifiée et associée à un mosaïcisme biaisé¹⁵⁹. Dans cette étude, toutes les femmes de 2 familles non apparentées ont montré une inactivation préférentielle du chromosome porteur de la mutation (donc de l'allèle G), alors que l'allèle C était par conséquent actif dans la majorité des cellules. Fait intéressant, une substitution à cette même position, mais cette fois-ci pour un autre acide aminé (C(-43)A) a été documentée sur le chromosome X en anneau (« ring-X chromosome ») d'une fille atteinte d'une stature réduite, de dimorphisme facial et de retard de croissance¹⁶⁵. Cette fois, la mutation a été associée à une perte d'expression de *XIST*, donc à une activation exclusive de ce chromosome muté. Il a par la suite été démontré que les mutations à cette position de la séquence d'ADN modifiaient *in vitro* et *in vivo* l'association du facteur CTCF au promoteur de *Xist*⁸¹. L'allèle G favorise l'association de CTCF, alors que l'allèle A l'empêche, suggérant que le mosaïcisme biaisé causé par ces mutations était une conséquence de l'association préférentielle de CTCF au chromosome muté (dans le cas d'une hétérozygote pour l'allèle G) ou au chromosome normal (dans le cas d'une hétérozygote pour l'allèle A). Cependant, la mutation s'est avérée être très rare dans la population¹⁶⁶ et ne peut donc expliquer la majorité des cas de mosaïcisme biaisé néonatal.

Hérédité du mosaïcisme biaisé néonatal

Quelques études se sont penchées sur l'hérédité du mosaïcisme biaisé néonatal, afin de déterminer si le choix du chromosome à inactiver puisse être contrôlé génétiquement.

Une de ces études a dénoté le cas de 3 femmes, issues de 2 générations d'une même famille, qui présentent toutes un ratio d'inactivation extrêmement biaisé¹⁶⁰. À cause de ce ratio biaisé, elles sont atteintes d'hémophilie, bien qu'elles possèdent aussi un allèle normal du gène du facteur VIII. Curieusement, ces trois femmes ont toutes héritées du même allèle *XIC*, ce qui laisse croire que la cause de leur mosaïcisme biaisé serait dû à un biais génétique primaire. Cependant, étant donné le très petit nombre de femmes incluses, les résultats de cette étude, bien qu'intéressants, ne peuvent être extrapolés à toutes les femmes. Par ailleurs, la mutation précédemment identifiée dans le gène *XIST* (Plenge) s'est révélée absente dans cette famille, excluant la possibilité que ces femmes aient un mosaïcisme biaisé dû à cette mutation.

D'autres études, comme celle décrite au point précédent, ont identifié quelques familles chez qui le mosaïcisme biaisé était familial^{130,157}. De plus, 3 loci ont été associés au mosaïcisme biaisé, soit Xq28, Xq13 et Xq25-q26^{128,130}. Bien que les auteurs de ces études aient conclu que leurs résultats soient en accord avec un modèle *XCE* humain, ils ont investigué le sang de femmes adultes. Ce modèle d'étude introduit un biais, puisque le phénotype n'est pas le mosaïcisme biaisé néonatal, mais le mosaïcisme biaisé associé à l'âge.

Un autre indice de l'hérédité du mosaïcisme biaisé est venu de l'étude de jumelles. Tel que décrit dans le chapitre 1.3.6, les jumelles monozygotes jeunes montrent des ratios d'inactivation similaires, contrairement aux jumelles dizygotes, ce qui serait en accord avec un modèle où un gène influencerait le choix du chromosome à inactiver¹⁵⁴. Seulement, les jumelles étudiées avaient déjà atteint l'âge adulte, ce qui, une fois de plus, peut potentiellement confondre les 2 traits (mosaïcisme biaisé associé à l'âge vs néonatal). Par ailleurs, il a été démontré il y a quelques années que chez les jumelles monozygotes monochorioniques, le clivage (« twinning ») se produit après l'engagement de l'ICX¹⁶⁷, ce qui expliquerait probablement que la concordance des ratios d'inactivation entre ces jumelles à la naissance soit très élevée. Les jumelles monochorioniques représentent environ le 2/3 des jumeaux monozygotes¹⁶⁸.

Sélections cellulaires secondaires à l'ICX durant l'embryogenèse

Le mosaïcisme biaisé néonatal a été attribué, dans de rares cas, à des sélections cellulaires secondaires à l'ICX, par exemple chez des femmes porteuses de translocations impliquant un chromosome X et un autosome¹⁶¹, ou de mutations liées au X et importantes pour la croissance/différenciation cellulaire¹⁶⁹ (voir le chapitre 1.3.2). Par ailleurs, un facteur qui favoriserait une réduction du bassin de cellules dans l'embryon en développement pourrait causer un mosaïcisme biaisé néonatal. En effet, plus le bassin de cellules est petit au moment de l'ICX, plus les chances sont statistiquement élevées de mener à un mosaïcisme. Ces conditions sont par contre rares et n'ont été rapportés que dans les cas de mosaïcisme spécifique au placenta¹⁶².

Néanmoins, étant donné le grand nombre de divisions cellulaires auxquelles sont sujettes les cellules durant l'embryogenèse, il peut se qu'elles soient sélectionnées en fonction du chromosome X qui est exprimé. Pour l'instant, il n'y a pas de documentation à ce sujet.

1.4 Projet de recherche

1.4.1 But du projet de recherche

Chez l'humain, les ratios d'ICX sont bien caractérisés chez la femme adulte. Nous savons que les ratios d'ICX démontrent des patrons spécifiques au tissu et à l'âge. Nous savons aussi que les biais d'ICX (aussi appelé mosaïcisme biaisé ou ratio d'inactivation biaisé) sont fréquents, dépendant encore une fois du tissu regardé et de l'âge de la femme, et qu'ils seraient causés par des sélections cellulaires basées sur le chromosome X. Cependant, les ratios d'ICX à la naissance n'ont jamais été caractérisés. Nous ne connaissons donc pas le niveau de corrélation des ratios d'inactivation de différents tissus, de même que nous ne connaissons ni la fréquence, ni la cause, des ratios d'inactivation biaisés de différents tissus à la naissance. De ce fait, puisque nous ne connaissons pas la cause du mosaïcisme biaisé néonatal, nous ne pouvons pour l'instant confirmer qu'il soit un trait distinct du mosaïcisme associé à l'âge.

Le but de ce présent projet de recherche est donc de mieux caractériser les ratios d'inactivation à la naissance et par conséquent, le mosaïcisme biaisé néonatal.

1.4.2 Hypothèses de recherche et objectifs spécifiques

D'après les connaissances actuelles, il nous est permis d'émettre les hypothèses que (1) les ratios d'ICX sont similaires dans tous les tissus à la naissance et que, par le fait même, le mosaïcisme biaisé néonatal n'est pas spécifique à un tissu à ce stade et que (2) le mosaïcisme biaisé néonatal est causé par des gènes situés sur le chromosome X qui agissent en *cis*.

Afin de tester ces hypothèses, les objectifs de ce projet de recherche sont de :

- (1) Valider les méthodes de phénotypage (essais méthylation vs transcription) dans une population de nouveau-nées.
- (2) Déterminer l'incidence de mosaïcisme biaisé dans différents tissus d'une cohorte de nouveau-nées.
- (3) Établir la concordance des ratios d'inactivation entre différents tissus à la naissance.
- (4) Tester l'hérédité du mosaïcisme biaisé néonatal en
 - a. Évaluant la transmission du trait.
 - b. Recherchant des polymorphismes associés au trait dans une région candidate (*XIST*).

1.4.3 Description

Afin de répondre aux objectifs, nous avons recruté une cohorte composée de nouveau-nées filles (NN) et leur mère. Les NN sont les meilleurs sujets pour étudier les mécanismes déterminant les ratios d'inactivation et le mosaïcisme biaisé néonatal, puisqu'ils représentent le modèle le plus rapproché de l'embryogenèse que nous puissions obtenir. D'autre part, de recruter la mère reliée à la fille nous permet d'étudier la transmission. De ces participantes, nous avons obtenu des échantillons de sang et d'épithélium buccal, 2 tissus provenant d'origine embryologique différente (le sang dérive du mésoderme et l'épithélium buccal, de l'ectoderme).

Les méthodes pour déterminer les ratios d'inactivation n'ayant jamais été validées dans une population de nouveau-nées, nous devons en premier lieu nous assurer de leur fiabilité. Par la suite, nous pourrions déterminer les ratios d'inactivation pour tous les spécimens reçus. À partir de ces données, les incidences de mosaïcisme biaisé seront déterminées pour chaque tissu et chaque groupe d'âge. Ces données seront utiles pour étudier l'évolution du mosaïcisme biaisé avec l'âge, et donc pour étudier si des biais se produisent dans les ratios d'inactivation avec l'âge. Un biaisement du ratio d'inactivation signifie un changement dans les proportions cellulaires en fonction du chromosome X exprimé et par conséquent, peut signifier qu'une sélection cellulaire basée sur le chromosome X se soit produite. Par ailleurs, les données sur les ratios d'inactivation nous permettront d'établir les corrélations inter-tissus, à savoir si différents tissus d'une même femme présente des ratios d'inactivation similaires. Une bonne concordance inter-tissus à la naissance témoignerait d'un mécanisme commun à tous les tissus, et par le fait même d'un processus d'ICX qui se produirait tôt dans l'embryogénèse, avant la différenciation tissulaire. En fait, puisqu'il est connu que la concordance entre les tissus diminue avec l'âge (particulièrement entre le sang et les autres tissus non-hématopoïétiques), les NN devraient montrer une meilleure corrélation inter-tissus que les autres groupes d'âge. Au contraire, une corrélation faible pourrait signifier que l'ICX est un processus tardif, se produisant après l'engagement entre les différents tissus, ou encore que des sélections cellulaires puissent agir différemment dans chaque tissu durant le développement, ce qui contribuerait à faire varier les ratios d'inactivation à la naissance.

Dans un deuxième lieu, d'étudier la transmission des ratios d'inactivation et du mosaïcisme biaisé, de même que des polymorphismes dans la région candidate *XIST*, permettra d'évaluer l'importance de la composante génétique dans la détermination du trait. Dans l'éventualité où un gène majeur en *cis* influencerait le choix du chromosome à inactiver, la transmission d'un allèle causal conférerait à la fille une prédisposition à exprimer le même phénotype que sa mère. Aussi, la présence d'un gène contrôlant le choix du chromosome à inactiver dans la région du gène *XIST* se traduirait par une association entre les polymorphismes et le trait. Chez la souris, les gènes impliqués dans la régulation du processus de l'ICX sont

situés dans la région maîtresse, le *Xic*. Chez l'humain, où le processus est peu connu, il est probable que les gènes qui régulent *XIST* se situent dans la même région

1.4.4 Pertinence

L'ICX est un phénomène extrêmement bien régulé et d'une importance capitale lors du développement. Ainsi, cette présente étude, visant à caractériser les ratios d'inactivation et le mosaïcisme biaisé à la naissance, trouve son importance à la fois dans l'aspect clinique que fondamental. D'une part, l'accumulation des données sur la fréquence et la distribution du mosaïcisme biaisé pour différents groupes d'âge sera utile à certains diagnostics (clonalité tumorale, entre autres), de même qu'elle sera utile pour distinguer et élucider les différentes formes de mosaïcisme biaisé (néonatal vs associé à l'âge, par exemple). D'autre part, l'identification des facteurs responsables de causer des biais d'inactivation à la naissance mènera éventuellement à l'identification de gènes importants pour le processus de l'ICX ou pour la croissance cellulaire et le renouvellement des tissus. Par ailleurs, cette étude pose le morceau de casse-tête qu'il manquait à l'étude de la dynamique du mosaïcisme biaisé à travers les âges chez l'humain.

Chapitre 2

MÉTHODES

2.1 Obtention des échantillons

2.1.1 Recrutement de la cohorte

Le recrutement s'est déroulé au département d'obstétrique et de gynécologie de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, de juillet 2003 jusqu'à août 2004, avec l'approbation du Comité d'éthique à la recherche de l'établissement. Toutes les mères qui ont accouché d'une fille durant cette période ont été informées de notre recherche via leur infirmière attitrée. Elles ont ensuite reçu, à condition qu'elles le permettent, la visite de l'agente de recrutement du laboratoire, qui leur a exposé les détails du projet et de ce que leur engagement envers notre projet représentait. Les mères qui ont accepté de participer à notre projet ont rempli un questionnaire médical et ont signé un consentement éclairé. De plus, le consentement de l'enfant a été signé par les 2 parents.

La signature des consentements nous donnait l'autorisation de récupérer, au département d'hématologie, le tube de sang périphérique prélevé de la mère le lendemain de l'accouchement, ainsi que le tube de sang de cordon prélevé de l'enfant au moment de sa naissance. De plus, elle donnait l'autorisation à une assistante du laboratoire de prélever un échantillon d'épithélium buccal de la mère et de l'enfant.

2.1.2 Traitement des spécimens

Extraction de l'ADN des échantillons d'épithélium buccal

Les échantillons d'épithélium buccal ont été prélevés au moyen d'un tampon Omniswab (Whatman). L'ADN a été isolé de ces échantillons selon le protocole du fabricant. Les protéines ont été digérées par l'incubation du tampon dans 250µL de NaCl 75mM/EDTA 25mM et 50µL de protéinase K 2mg/mL, pendant 2h à 55°C. Puis, le liquide contenant les protéines et l'ADN a été transféré dans un autre tube. Les protéines ont été précipitées en ajoutant 150µL de LiCl (7,5M), en

incubant à -80°C pendant au moins 10min, puis en centrifugeant 15min à 18 300RCF. Seul le surnageant a été conservé. L'ADN a été précipité du surnageant en ajoutant $500\mu\text{L}$ d'éthanol 95%, en incubant 30 min à la température de la pièce, puis en centrifugeant 15min à 14 000rpm. Le culot d'ADN a ensuite été lavé avec $300\mu\text{L}$ d'éthanol 70%, puis resuspendu en ajoutant $250\mu\text{L}$ de TE et en incubant à 50°C pendant 15min.

Extraction de l'ADN des échantillons sanguins

Les échantillons sanguins (périphérique et de cordon) ont été prélevés dans un tube de collection contenant l'EDTA comme anti-coagulant. Environ 5mL de volume sanguin ont été obtenus de chaque participante. Une fraction du volume sanguin a été conservée pour l'extraction de l'ARN (voir paragraphe suivant), alors que le volume restant a servi à l'extraction de l'ADN. La lyse des érythrocytes a été effectuée en ajoutant environ 10mL de Triton X au sang, en inversant plusieurs fois le tube, en centrifugeant 10min à 850RCF et en éliminant le surnageant. Le culot de cellules a subi une 2^e lyse dans les mêmes conditions. Au culot de leucocytes ont été ajoutés 2mL d'une solution de tampon NaCl 75mM/EDTA 25mM, puis $200\mu\text{L}$ de protéinase K 2mg/mL. Les échantillons ont été incubés à 37°C , jusqu'à digestion complète des culots, soit de 2 à 3 jours. Par la suite, 3mL (soit 1.5 volume) de phénol/chloroforme (1:1) ont été ajoutés aux échantillons et ceux-ci ont été doucement mélangés sur l'agitateur rotatif pendant 10min. Après 10min de centrifugation à 850RCF, la couche supérieure (environ 2mL) a été récupérée et transférée dans un nouveau tube. Une 2^e extraction, cette fois-ci avec 3mL de chloroforme, a été réalisée dans les mêmes conditions. L'ADN a été précipité en ajoutant 4mL (soit 2 volumes) d'éthanol 95% et $200\mu\text{L}$ de NaOAc 3M, pH 5.2 (soit 1/10 de volume). L'ADN précipité a été transféré dans un nouveau tube et lavé avec $500\mu\text{L}$ d'éthanol 75%. Le culot d'ADN a finalement été resuspendu dans 250 à $500\mu\text{L}$ de TE, selon sa grosseur. La concentration en ADN a été déterminée par spectrophotométrie à 260nm.

Extraction de l'ARN des échantillons sanguins

Avant de procéder à la lyse des érythrocytes, environ 1mL de sang a été transféré

dans un tube de Wintrobe à l'aide d'une pipette pasteur, puis centrifugé 10min à 850RCF afin de séparer les composantes du sang. Seule la couche leucocytaire a été transférée, incubée 10min avec une solution de lyse (150mM NH_4Cl , 10mM KHCO_3 , 100 μM EDTA), et centrifugée 4min à 7000RCF, afin d'éliminer l'excédent d'érythrocytes. Le culot de leucocytes a été resuspendu dans 1mL de Tripure Isolation Reagent (Boehringer Ingelheim) (i.e. 1 volume de Tripure pour 1 volume de sang au départ). Ce culot resuspendu a été incubé 10min, avant d'être conservé à -80°C , jusqu'au moment de l'extraction. L'ADN a ensuite été extrait en suivant les recommandations du fabricant (Boehringer Ingelheim). Après décongélation des échantillons, 200 μL de chloroforme (soit 1/5 de volume de Tripure utilisé) ont été ajoutés, puis les échantillons ont été mélangés vigoureusement avant de reposer 10min. Suite à une centrifugation de 15min à 12 000RCF à 4°C , la phase aqueuse a été transférée dans un nouveau tube. L'ARN a ensuite été précipité avec 500 μL d'isopropanol (soit 1/2 de volume de Tripure utilisé) et récupéré dans le culot après 10min d'incubation et 10min de centrifugation à 12 000rcf à 4°C . Le lavage du culot d'ARN a été fait en ajoutant 1mL d'éthanol 75%, et en centrifugeant 5min à 7 500RCF à 4°C . Le culot d'ARN a finalement été resuspendu dans 60 μL d' H_2O DEPC et incubé 10-15min à 60°C . La concentration en ARN a été évaluée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 260nm.

2.2 Phénotypage : détermination des ratios d'inactivation

Le lecteur est prié de se référer au chapitre 1.2.3 pour une description globale des méthodes de calcul des ratios d'inactivation.

2.2.1 Essai méthylation (HUMARA)

Les essais HUMARA ont été réalisés en ajoutant des modifications à une méthode décrite précédemment¹¹⁴. La représentation schématique du locus, ainsi que la description globale de la méthode sont illustrés à la figure 6A et 6B. Pour chaque échantillon, environ 250ng d'ADN a été digéré, d'une part, avec 8U de l'enzyme de restriction *RsaI* (fraction qui sera nommée plus tard fraction non-digérée) et,

parallèlement, avec 8 et 16U des enzymes RsaI et HpaII (fraction qui sera nommée la fraction digérée). Chacune des 2 digestions a par la suite été amplifiée séparément par PCR, en utilisant des amorces couplées avec des fluorochromes (la fraction non-digérée a été amplifiée avec des amorces couplées à HEX, alors que la fraction digérée a été amplifiée avec des amorces couplées à FAM). Les amorces utilisées étaient les suivantes : 5'-GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCCTCAT-3' (amorce sens) et 5'-TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC-3' (amorce anti-sens). Chaque PCR a été effectué à partir de 5µL (soit le 1/3 du total) de volume de digestion et en présence de 1pmol de chaque amorce et de 0,75U de la Taq polymérase Jump Start (Sigma), dans un volume total de réaction de 15µL contenant 4% de DMSO. Les conditions de PCR étaient les suivantes : première dénaturation à 94°C pendant 3 min; puis, 30 cycles d'amplification à 94°C pendant 45sec, 60°C pendant 30sec et 72°C pendant 30sec; finalisé avec une dernière période d'élongation de 15min à 72°C. Les produits de PCR provenant du même échantillon ont été regroupés et dilués (4µL du PCR HEX + 4µL du PCR FAM + 20µL d'H₂O), puis redilués dans la formamide (1,2µL du mélange + 10µL de formamide contenant le marqueur de poids moléculaire ROX 400) et dénaturés (95°C pendant 5min), avant d'être migrés sur l'analyseur génétique 3100 ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Deux exemples de produits PCR après migration sont représentés à la figure 6C.

Après la migration, l'analyse brute des données a été réalisée par le logiciel GeneScan v3.7 (Applied Biosystems). Puis, la détermination des allèles, ainsi que le calcul des aires sous les courbes, ont été effectués par le logiciel Genotyper v3.7 (Applied Biosystems). Toutes les analyses de Genotyper ont été revérifiées par 2 personnes différentes, afin d'éviter une erreur dans les données. Tous les pics dont la hauteur était supérieure à 6000 ont été éliminés, parce qu'à partir de ce niveau, la quantification de l'aire sous la courbe peut être erronée. Les données analysées ont par la suite été importées dans une banque de données Accès (Microsoft), qui a été programmée pour calculer automatiquement les ratios d'inactivation à partir des aires sous la courbe. Le calcul qui a mené à ces valeurs est détaillé à l'annexe I.

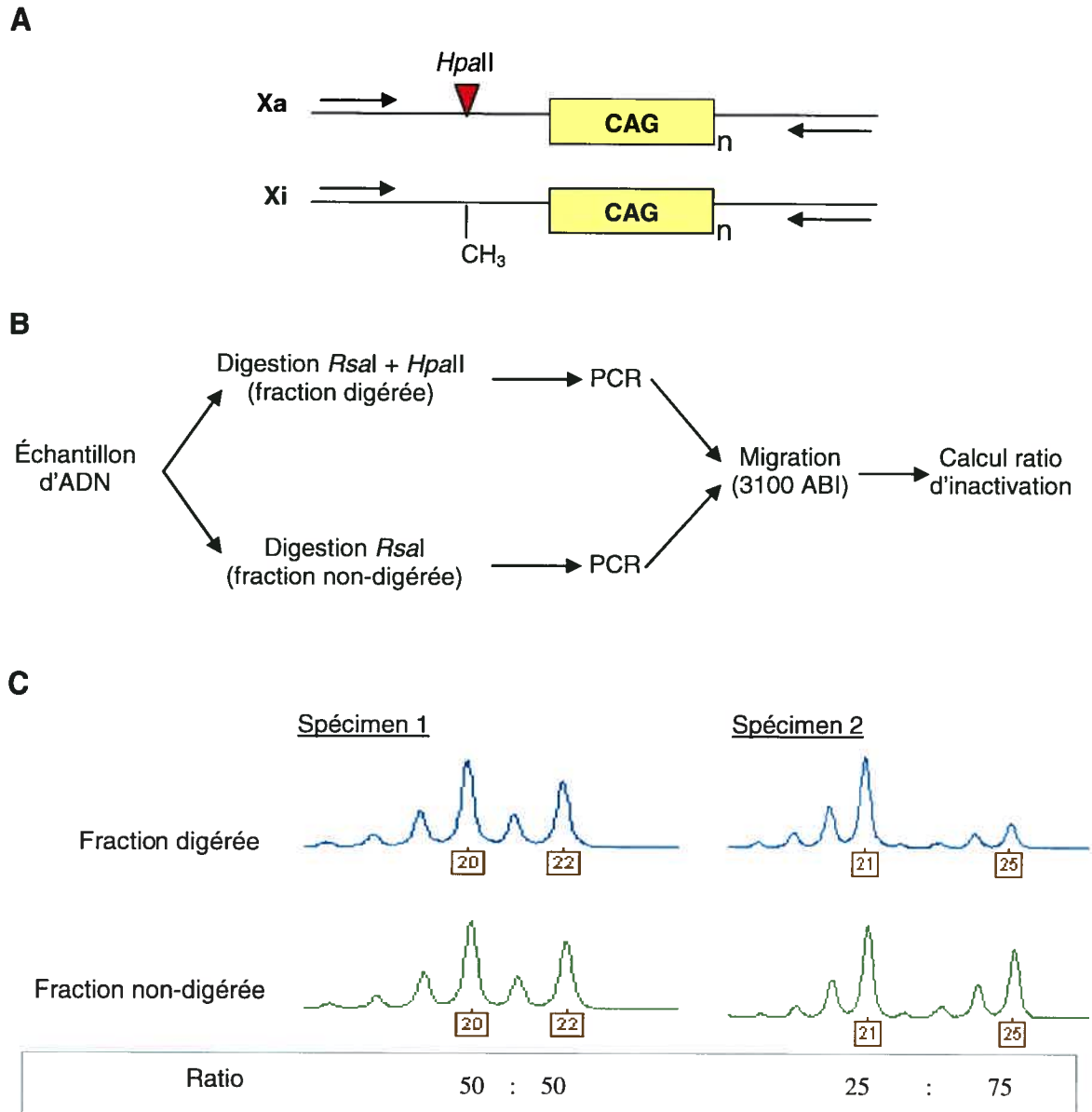


Figure 6 Détermination des ratios d'inactivation : HUMARA. **A.** Au locus HUMARA, une répétition de trinucleotides en tandem (STR) polymorphique est située près d'un site de restriction pour une enzyme sensible à la méthylation (*HpaII*). Sur le chromosome X inactif (Xi), le site est méthylé et l'enzyme ne peut digérer. Des amorces PCR ont été conçues de part et d'autre du locus polymorphique. **B.** Représentation schématique de la méthode. **C.** Deux exemples de produits PCR après migration. Le chiffre sous la courbe représente le nom de l'allèle (i.e. le nombre de répétitions CAG). Le ratio d'inactivation est déterminé en comparant les profils d'amplification des fractions digérées et non-digérées

Pour chaque échantillon, le ratio d'ICX a été exprimé de 3 façons différentes :

- 1- **DS**, pour « Degree of skewing »: valeur qui exprime la déviation par rapport au ratio 1 :1 (sans biais). Le DS peut varier de 0 (aucun biais) à 0,5 (biais complet).
- 2- **Psup**, pour « Proportion active de l'allèle supérieur » : valeur qui indique la proportion de cellules qui expriment le chromosome X possédant l'allèle supérieur d'HUMARA (c'est-à-dire le plus large en terme de nombre de répétitions). Les valeurs de Psup varient de 0 à 1, où 0 indique que toutes les cellules expriment l'allèle inférieur, 0,5 indique qu'il n'y a aucun biais et 1 indique que toutes les cellules expriment l'allèle supérieur.
- 3- **Pmat** et **Ptrans**, pour « Proportion active de l'allèle maternel » et « Proportion active de l'allèle transmis » : valeur qui indique la proportion de cellules qui expriment l'allèle maternel (Pmat) ou l'allèle transmis (Ptrans). Pmat est une valeur déterminée pour la NN (l'allèle maternel est donc l'allèle HUMARA qu'une NN a reçu de sa mère); tandis que Ptrans est une valeur déterminée pour la mère (l'allèle transmis est l'allèle HUMARA qu'une mère a transmis à sa fille).

Chaque échantillon a été fait en triplicata, et la moyenne du triplicata a été utilisée comme valeur de ratio d'inactivation. Dans les cas où la déviation standard était supérieure à 0,1 (soit plus de 10% de différence entre les 2 valeurs les plus éloignées), l'échantillon était repris 3 fois de plus.

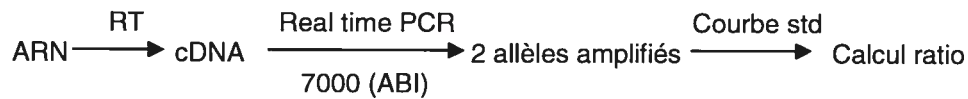
2.2.2 Essai transcription (IDS)

Pour valider l'essai méthylation HUMARA, le ratio d'inactivation de 94 NN a aussi été déterminé par l'essai transcription (IDS). L'essai IDS tire avantage d'un SNP (rs1141608) présent dans un exon du gène de l'iduronate 2-sulfatase, situé en Xq28, et qui est donc exprimé seulement par le chromosome X actif. 284 NN dont la valeur DS est connue par la méthode HUMARA (donc hétérozygotes à ce locus) ont été génotypées par discrimination allélique TaqMan (méthode décrite à la section 2.3.1). De ces NN, 94 qui étaient hétérozygotes pour le SNP ont été testées avec l'essai transcription.

Un aperçu de la méthode IDS est schématisé à la figure 7A. L'ARN des NN choisies a d'abord été traité à la DnaseI (1095ng d'ARN en présence de 2U de DnaseI, dans un volume total de 20 μ L), en suivant les instructions du manufacturier (Sigma, St-Louis, MO, USA). Puis, une transcription inverse (RT) a été réalisée à partir de 3 μ L de la solution ARN+Dnase (soit environ 165ng d'ARN), en présence de 2,5 μ M d'amorces « random hexamers » et de 18,75U de transcriptase inverse, dans un volume total de 15 μ L. L'essai transcription a par la suite été réalisé sur le même principe que la discrimination allélique (voir description de la méthode en 7.2), à la différence que l'amplification s'est faite en temps réel, donc que la fluorescence libérée a été quantifiée à chaque cycle du PCR. La réaction s'est faite en triplicata, à partir de 4 μ L d'ADNc, dans un volume total de 15 μ L, en présence des mélanges TaqMan (TaqMan Universal Master Mix), et amorces et sondes (TaqMan Genotyping assays) conçus par Applied Biosystems. Les conditions d'amplification étaient les mêmes que pour un essai de discrimination allélique. Des échantillons standards ont été ajoutés à chaque essai afin de construire une courbe standard. Celle-ci a été réalisée en mélangeant, en différentes proportions connues- 0 :100, 10 :90, 20 :80, 30 :70, 40 :60, 50 :50, 60 :40, 70 :30, 80 :20, 90 :10, 100 :0-, des cellules leucocytes d'individus homozygote ou hémizyote pour chaque allèle du SNP. L'ARN a été extrait de ces cellules tel que décrit à la section 2.1.2 et utilisé de la même façon que les échantillons pour faire l'essai de transcription.

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel SDS 7000 v1.2.3. Le seuil de détection de fluorescence utilisé a été choisi de façon à ce qu'il traverse, dans leur portion linéaire, toutes les courbes exprimant le ΔR_n (log de la quantité de fluorescence libérée) en fonction du cycle. Suite à cette analyse, le « Cycle threshold » (Ct), i.e. le numéro du cycle auquel la courbe traverse le seuil, a été déterminé pour chaque allèle de chacun des échantillons. La moyenne des Cts du triplicata a été utilisée pour la suite des calculs. Un ΔCt a été déterminé pour chaque échantillon, en soustrayant le Ct moyen d'un allèle au Ct moyen de l'autre allèle. L'équation de la courbe sinusoïdale, représentant le % d'allèle en fonction du ΔCt corrigé, a été déterminée à l'aide des échantillons standards (décrits au pa-

A



B

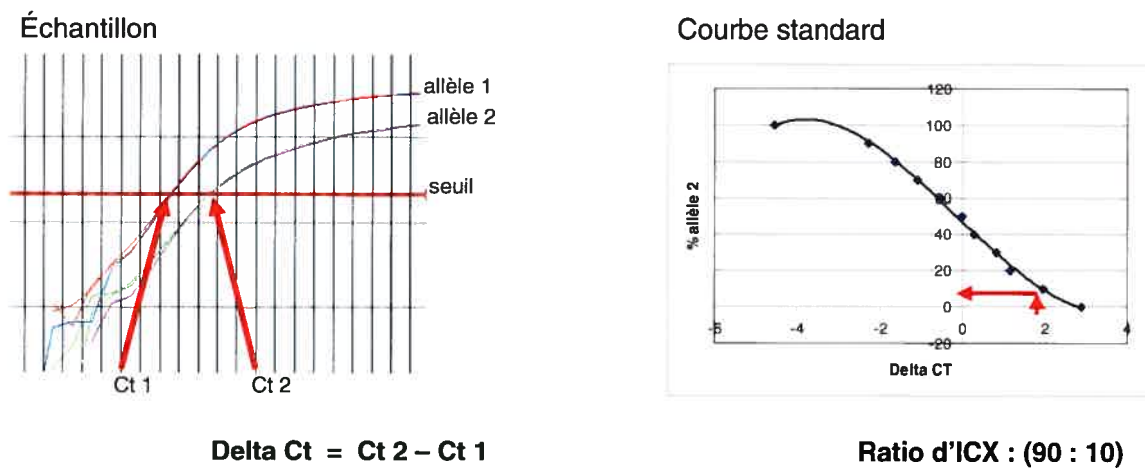


Figure 7 Détermination des ratios d'inactivation : IDS. Au gène IDS, un polymorphisme de nucléotide simple (SNP) codant peut être amplifié avec des amorces PCR spécifiques à chacun des 2 allèles. **A.** Représentation schématique de la méthode IDS. **B.** Exemple d'un spécimen après le PCR en temps réel. La différence entre les courbes d'amplification de chacun des allèles (ΔCt) est rapportée sur une courbe standard. La courbe standard est réalisée à partir d'un mélange de cellules, en diverses proportions connues, de 2 individus homozygotes pour chaque allèle. Elle représente le ΔCt en fonction du pourcentage de cellules exprimant un allèle.

ragraphe précédent) et utilisée sur les échantillons inconnus pour déterminer leur ratio d'inactivation.

2.3 Génotypage

2.3.1 Polymorphismes de la région *XIST*

Au total, 5 SNPs situés dans la région entourant le gène *XIST* ont été sélectionnés sur la base de leur fréquence dans une population caucasienne (des SNPs de différentes fréquences ont été choisis) et de la distance qui les séparait les uns des autres, afin qu'ils couvrent à intervalle régulier environ 40kB de séquence. Trois de ces SNPs (reference IDs: rs1620574, rs1794213, rs1082089) ont été génotypés par discrimination allélique TaqMan (Applied Biosystems). Les 2 autres SNPs (reference IDs: rs1009948, rs1894271) ont été génotypés par un PCR-RFLP.

Les femmes à génotyper ont été choisies selon les 2 critères suivants : (1) que leur DS soit connu (i.e. qu'elles ne soient pas homozygotes au locus HUMARA) et (2) que le DS de leur mère ou de leur fille soit connu aussi. En tout, 814 femmes (407 couples mères-NN) correspondaient à ces critères et ont été génotypées.

Discrimination allélique TaqMan®

La discrimination allélique TaqMan® est une technologie qui est commercialisée par Applied Biosystems pour détecter un polymorphisme de nucléotide simple choisi. Cette technologie exploite l'activité 5' nucléase de la polymérase AmpliTaq Gold®, qui est capable de dégrader une sonde liée à l'ADN durant le PCR. La sonde Taqman est couplée, en 3', à un fluorochrome et en 5', à un quencher. Durant le PCR, la liaison de la sonde à l'ADN est clivée par la polymérase, libérant le fluorochrome du quencher. Ce clivage résulte en une accumulation de fluorescence dans l'échantillon. Au contraire, si la sonde demeure intacte, la proximité du quencher et du fluorochrome empêche la libération de fluorescence. Lors d'un essai de discrimination allélique, des amorces PCR sont conçues pour amplifier une portion de séquence de part et d'autre du SNP, et deux sondes sont utilisées, chacune se liant spécifiquement à un allèle. Ces 2 sondes sont couplées

à des fluorochromes différents, ce qui permet, après le PCR, de distinguer la présence de l'un ou des 2 allèles. Pour un individu homozygote, uniquement une des 2 sondes s'hybridera et libérera de la fluorescence, alors que pour un individu hétérozygote, les 2 sondes libéreront de la fluorescence.

Les essais TaqMan (amorces et sondes) sont conçus et validés par Applied Biosystems. La compagnie fournit aussi le mélange contenant la polymérase et les dNTPs (TaqMan Mix). Le protocole de PCR, ainsi que les conditions d'amplification, étaient fournis par la compagnie. Environ 50 ng d'ADN de chaque échantillon a été utilisé pour l'amplification, en présence de 1X de TaqMan Mix et de 1X de sonde, dans un volume total de 10µL. Le programme PCR était de 95°C pendant 10min, puis 40 cycles de 92°C pendant 15sec et 60°C pendant 1min. Le PCR terminé, la quantification de la fluorescence libérée a été faite sur l'appareil PCR en temps réel 7000 ABI PRISM (Applied biosystems).

PCR-RFLP

Pour réaliser le PCR-RFLP, les SNPs à tester ont été choisis pour leur caractéristique d'être la cible ou non d'une enzyme de restriction, selon le nucléotide présent. Une amplification PCR a été réalisée à partir d'environ 50 ng d'ADN génomique, en présence de 25ng de chaque amorce, de 0,3U de Taq polymérase et de 1,5mM de MgCl₂, dans un volume final de 12,5µL. Les amorces utilisées étaient les suivantes pour le 1^{er} SNP (rs1009948) : 5'-TTGACATAAAGG-TTTCCTCATG-3' (amorce sens), 5'-GCTAATGGTCATCCTGTTGCT-3' (amorce anti-sens); et pour le 2^e SNP (rs1894271) : 5'-TGAAGGACAGCATGGTTGGT-3' (amorce sens), 5'-ACATGGAATGAGCAGTGTGC-3' (amorce anti-sens). Pour le 1^{er} SNP, la digestion a été réalisée à partir de 5µL de produit de PCR, en présence de 0,5U de RsaI; tandis que pour le 2^e SNP, la digestion a été faite à partir de 2µL de produit de PCR, en présence de 1,1U de MfeI. Chaque réaction de digestion a été réalisée à 37°C O/N, dans un volume total de 15µL, puis la totalité de la réaction a été chargée et migrée sur un gel d'agarose 2%. Le patron des bandes après digestion a servi à génotyper chaque individu. Pour le 1^{er} SNP, un contrôle interne de digestion était présent, vu la présence d'un 2^e site, non-polymorphique,

de digestion pour la RsaI. Néanmoins, un individu contrôle (hétérozygote) a été inclus dans chaque plaque de digestion pour les 2 SNPs.

2.3.2 Profil génétique – zygosité des jumelles

Les 7 paires de jumelles recrutées ont été testées afin de discriminer entre les paires monozygotes et dizygotes. Un premier groupe de 7 marqueurs de répétition courte en tandem (« short tandem repeat » ou STR) a été testé sur les 2 membres de chaque couple de jumelles, par le laboratoire de biologie moléculaire de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont. Dans le cas où les 2 membres d'un couple de jumelles ont montré un génotype identique pour tous ces 7 marqueurs, 3 marqueurs additionnels ont été testés.

2.4 Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques (corrélations de Pearson, tests de normalité Kolmogorov-Smirnov (KS), régressions linéaires et graphiques) ont été réalisées à l'aide des logiciels SPSS v10.0 et NCSS 2002 (PASS), sauf pour les tests de Chi-carré et de Fisher's exact test, qui ont été calculés grâce à des programmes accessibles sur des sites web (<http://www.matforsk.no/ola/fisher.htm>, <http://www.unc.edu/~preacher/chisq/chisq.htm>).

Chapitre 3

RÉSULTATS (MANUSCRIT)

Dans ce chapitre vous sont présentés les principaux résultats du projet de recherche sous forme d'un article qui sera soumis sous peu à The European Journal of Human Genetics.

3.1

ACCORD DES COAUTEURS

Véronique Bolduc,
Programme 2-466-1-0, M.Sc. Biologie moléculaire

Description de l'article :

Analysis of X-inactivation ratios in mother-neonate pairs demonstrate evidences for a stochastic body-wide etiology and a selection bias during development

Véronique Bolduc, Pierre Chagnon, Sylvie Provost, Marie-Pierre Dubé, Claude Belisle, Marianne Gingras et Lambert Busque

Sera soumis à The American Journal of Human Genetics

Déclaration des co-auteurs:

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Véronique Bolduc inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Caractérisation de l'inactivation du chromosome X chez l'humain à la naissance : distribution et transmission des ratios d'inactivation

Pierre Chagnon

28 octobre 2005
Date

Sylvie Provost

8 sept 2005

Marie-Pierre Dubé

7 sept 05

Claude Belisle

9 sept. 2005

Marianne Gingras

28 oct 2005

Lambert Busque

28/10/05

3.2 Apport de chacun des co-auteurs à l'article

Véronique Bolduc Cet article résumant ses travaux de maîtrise, Mme Bolduc a eu une contribution majeure. Elle a participé à toutes les analyses, produit les figures et tableaux, rédigé le premier jet et travaillé sur les corrections.

Pierre Chagnon M. Chagnon est le co-directeur de Mme Bolduc. Il a supervisé les travaux et participé à toutes les discussions à propos de l'article.

Sylvie Provost Mme Provost est responsable des analyses statistiques dans le laboratoire. Elle a assisté et conseillé Mme Bolduc pour réaliser les analyses statistiques.

Marie-Pierre Dubé Mme Dubé est la consultante du laboratoire en matière de biostatistiques. Elle a révisé les analyses.

Claude Belisle Mme Belisle est assistante de recherche au laboratoire. Elle a mis au point la méthode de phénotypage par l'essai de transcription, qu'elle a enseignée à Mme Bolduc.

Marianne Gingras Mme Gingras est assistante de recherche au laboratoire. Elle a assisté Mme Bolduc lors du recrutement.

Lambert Busque M. Busque est le directeur du laboratoire et instigateur du projet. Il est le directeur de recherche principal de Mme Bolduc, dont il a supervisé les travaux.

**ANALYSIS OF X-INACTIVATION RATIOS IN MOTHER-NEONATE PAIRS
DEMONSTRATES A STOCHASTIC BODY-WIDE ORIGIN
FOLLOWED BY A SELECTION BIAS DURING DEVELOPMENT**

Running title: X-inactivation ratios across ages

**Véronique Bolduc¹, [¶]Pierre Chagnon^{1,2}, Sylvie Provost¹, Marie-Pierre Dubé³,
Claude Belisle¹, Marianne Gingras¹, *[¶]Lambert Busque^{1,4}**

¹ Research Centre, Maisonneuve-Rosemont Hospital, University of Montreal, Canada. ² Institute for Research in Immunology and Cancer, University of Montreal, Canada. ³ Montreal Heart Institute Research Centre, University of Montreal, Canada. ⁴ Department of Hematology, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Canada

Category of submission: Article

Key words: X-inactivation, skewing, HUMARA, heritability, *XIST*

[¶] Co-thesis director of VB

*Corresponding author and guarantor of the manuscript:

Lambert Busque MD FRCPC

Department of Hematology, Hôpital Maisonneuve-Rosemont

5415 boulevard de l'Assomption, Montreal, Québec, Canada H1T 2M4

Telephone: (514) 252-3404, Fax (514) 254-5094



Abstract

Adult females exhibit tissue- and age-specific X-chromosome inactivation (XCI) ratios, probably due to cell selections in favour of the expressed X-chromosome. However, the tissue specificity and etiology of XCI ratios at birth are still unknown. To address these issues, we investigated a cohort of more than 500 neonates and their mothers from whom we collected blood and buccal epithelium samples. XCI ratios, calculated for every specimen using the HUMARA assay, were significantly correlated between two tissues of neonates ($r=.715$, $P<.001$) and mothers ($r=.778$, $P<.001$), despite the fact that blood cells showed increased skewing compared to buccal cells ($P=.002$ for neonates, $P<.001$ for mothers). In addition, mothers showed increased incidences of skewing compared to neonates ($P=.004$ for buccal cells, $P<.001$ for blood). Correlation of XCI ratios between mothers and neonates was null ($r=.074$, $P=.172$ in buccal cells, $r=.058$, $P=.272$ in blood); and skewed mothers gave birth to skewed neonates at the same frequency than non-skewed mothers ($P=.777$ for buccal cells, $P=.800$ for blood). These analyses demonstrate that XCI ratios in tissues result from a common stochastic process, which contrasts with the murine XCI process where *cis*-acting genes cause skewing. These analyses also offer evidence that a selection bias, affecting buccal and more particularly blood cells, occurs from development through adult age. Thus, X-linked genes, important for cell proliferation or renewal may be involved in this form of age-associated skewing (AAS).

Introduction

In mammals, dosage compensation of X-linked genes in females is achieved by the transcriptional silencing of one of the two X-chromosomes during early development, a process known as X-chromosome inactivation (XCI)¹. Once XCI has occurred, the heterochromatin-formed inactive X is stably transmitted to each daughter cell through subsequent mitoses^{2,3}. In humans, as in mouse embryos, either of the two X chromosomes (paternal or maternal) can be inactivated. As a consequence, females present a mosaic pattern of two cell lines: cells expressing maternal X-linked genes and cells expressing paternal X-linked genes.

The XCI ratio (or XCI pattern) of a female is defined as the relative proportion of each cell line and can be determined by the analysis of expression⁴, transcription⁵, or differential methylation⁶ of polymorphic X-linked genes, such as the human androgen receptor gene (HUMARA)⁷. Skewed patterns of XCI, generally defined as $\geq 75\%$ of cells expressing the same X-chromosome, were at first associated with X-linked mutations^{8,9}, balanced X/autosome translocations¹⁰, and clonal tumors^{11,12}; while it is now established that normal females may also show skewing of XCI¹³. The incidence of skewing in normal females varies according to tissue and age: relatively low in non-hematopoietic tissues ($\sim 10\text{-}30\%$) and increasing with age in blood cells¹⁴⁻¹⁶. The incidence of this age-associated skewing (AAS) in blood cells is greater than 40% in 60-year-old women and has been reported as high as 67% in centenarian¹⁷. The AAS may explain why, apart from the different blood lineages which show a significant correlation between each other (correlation ratios ranging from 0.57 to 0.97)^{16,18}, less significant concordance is observed when blood cells are compared to other somatic tissues such as intestinal mucosa or urinary epithelia (correlation ratios ranging from 0.19 to 0.74)¹⁸⁻²⁰. If that is true, one should observe a greater concordance of skewing between tissues in neonates, not subjected to AAS, than at any other age group.

The etiology of X-inactivation skewing is a matter of debate. Until the discovery of the X-controlling element (Xce) in mice, the choice of the X-chromosome to inactivate was hypothesized to be random in mammals¹, and skewing was believed to be the result of the small number of cells present in the embryo at the time of XCI.

The discovery of *Xce*, which strongly biases the choice of the X-chromosome to be inactivated, has supported the idea that skewing occurring during embryogenesis is genetically controlled²¹. Some studies have supported the possibility of such an *in-cis* element controlling skewing in humans: (i) a rare mutation in the *XIST* minimal promoter was found to favour primary skewing^{22,23}; (ii) an alteration in *X-inactivation Center (XIC)* was suggested to be responsible for the non-random X-inactivation observed in 3 related females, as these females inherited the same *XIC*²⁴; (iii) twin studies have reported a good concordance of XCI patterns between monozygote (MZ) co-twins^{17,25,26}; and (iv) some studies have documented the heritability of the skewing trait²⁷⁻²⁹. Unfortunately, most of these studies may present biased results, as they used blood samples of adult females, which are now known to be affected by AAS¹⁷. We believe that a human neonate cohort constitutes the population of choice to study the etiology of primary skewing of X-inactivation ratios.

This study was aimed at further characterizing X-inactivation occurring in humans by investigating concordance of skewing in different tissues of neonates to determine whether X-inactivation is a tissue-specific or a body-wide phenomenon; and by studying the transmission of skewing and X-inactivation ratios in mother-neonate pairs to evaluate whether primary skewing of X-inactivation is stochastic or under the influence of a strong genetic element *in cis*, such as the murine *Xce*.

Subjects and methods

Subjects

This research protocol has been reviewed and approved by the Ethical Research Committee of the Maisonneuve-Rosemont Hospital. Female neonates (NN) and their mother have been prospectively recruited at the Obstetric and Gynecology department of Maisonneuve-Rosemont hospital, after written informed consent was obtained from both parents (for the neonates) and from the mother. Mothers answered a medical and obstetrical questionnaire.

Specimens

We obtained from every participant a buccal epithelium sample using an Omniswab for buccal scraps (Whatman, Middlesex, UK). DNA was extracted from swabs with a lithium chloride method, according to the manufacturer's instructions. EDTA blood collection tubes were obtained for cord blood (neonates) or peripheral blood (mothers). DNA and RNA were isolated from total blood extracts using a standard Triton X-100, proteinase K and phenol-chloroform extraction protocol (DNA) and TriPure isolation reagent (RNA) (Roche Applied Science, Bazel, Switzerland) according to manufacturer's protocol.

Phenotypic determination of XCI ratios - methylation assay

HUMARA (human androgen receptor) assays were performed with modifications of the previously described approach⁷. Briefly, each specimen was pre-digested before a PCR amplification of the first exon of the HUMARA locus, containing a CAG repeat, using primers coupled with a fluorochrome. Specimens were pre-digested either with *RsaI* alone (later termed undigested fraction), or with *RsaI* and *HpaII* (digested fraction). PCR reactions were migrated on an ABI PRISM 3100 automatic genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA) and allele calling was performed using Genescan software (v.3.7 NT) (Applied Biosystems). Quantification of the areas under the curves was done using Genotyper software (v.3.7 NT) (Applied Biosystems) and was used to calculate the XCI ratio. The XCI ratio of the digested fraction was corrected with the undigested fraction for preferential amplification of the smallest allele⁷. Moreover, when the two alleles of an individual

were separated by only one or two repetitions, the ratio was corrected for the shadow banding³⁰. All results were mean of triplicates.

XCI ratios were reported using three different scores, employed depending on the requirement of the analyses:

1. **DS**: degree of skewing. This score expresses the deviation from the theoretical 50% pattern (cells expressing X_m : cells expressing X_p) and ranges from 0 (no skewing) to 0.5 (complete skewing). As it does not take into account the direction of skewing (towards X_m or X_p), it is used to categorize females qualitatively (skewed, non-skewed). It is useful to determine skewing incidences and to qualitatively analyze transmission.

$$DS = |P_{sup} - 0.5|$$

2. **P_{sup}**: proportion of cells presenting the superior HUMARA allele on the active X-chromosome. The superior allele is defined as having the higher number of CAG repetitions. This score directly specifies the direction of skewing: when the score is below 0.5, it indicates that most cells express the X-chromosome bearing the inferior allele, while a score higher than 0.5 indicates the opposite (most cells express the X-chromosome bearing the superior allele). Scores of 0 and 1 mean complete skewing, while 0.5 mean non-skewing. It is used for intra-individual correlations, since every female has the same superior allele in every cell of its body.

$$P_{sup} = 1 - \left[\frac{\frac{(A/A+a)}{(A'/A'+a')}}{\frac{(A/A+a)}{(A'/A'+a')} + \frac{(a/A+a)}{(a'/A'+a')}} \right]$$

(Where A represents area under the curve of the superior HUMARA allele from the HpaII digested sample, as analyzed by Genotyper. A' is the same as A, but for the undigested sample. a and a' represent digested and undigested samples for the inferior allele.)

3. **P_{mat} and P_{trans}**: proportion of cells having the maternal or transmitted allele on the active X-chromosome, giving scores for neonates and mothers, respectively. This score is similar to P_{sup}, but rather than considering the superior

HUMARA allele, it considers the HUMARA allele that the mother transmitted to her daughter. A score of 1 indicates that all cells express the X-chromosome bearing the shared allele, while a score of 0, that all cells express the other X-chromosome. P_{mat} and P_{trans} are useful for the quantitative study of XCI ratios transmission from a mother to her neonate at the humara locus.

P_{mat} and **P_{trans}** are calculated the same way as P_{sup} , with A representing the shared humara allele between a mother and her neonate.

Phenotypic determination of XCI ratios – transcriptional assay

Transcriptional-based assays using the iduronate sulfatase (IDS) locus have been realized³¹ on blood RNA extracts of 94 neonates. These neonates were chosen because of their heterozygosity at both the IDS and the HUMARA loci. In brief, a Taqman® SNP assay (Applied Biosystems) was designed to detect a single nucleotide polymorphism (SNP) (reference ID: rs1141608) present within an exon of IDS. Specific probes were created to distinguish each allele of the SNP on cDNA: cDNA was synthesized from RNA samples with random hexamers using Taqman® Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems) after a DNase treatment. The SNP amplification assay was carried out on a real-time ABI Prism 7000 (Applied Biosystems).

SNP allele frequencies were measured using a standard curve. Cells from 2 individuals, homozygote for a different allele, were mixed in various proportions, and RNA extracted from these samples was used as standard. A standard curve was constructed by plotting allele frequency against ΔC_t s (C_t allele1- C_t allele2). All samples were measured in triplicate and the mean ΔC_t value was used to calculate allele frequencies. A standard curve was run along with each independent assay.

XIST polymorphisms

A total of 5 single nucleotide polymorphisms (SNPs) were chosen, covering approximately 40Kb of the region surrounding the *XIST* gene. Three of them (reference IDs: rs1620574, rs1794213, rs1082089) were genotyped using the Taqman® assay-by-design technology provided by Applied Biosystems. The two others (reference IDs: rs1009948, rs1894271) were genotyped using a PCR-RFLP assay de-

veloped in our laboratory. Briefly, genomic DNA was amplified using PCR primers flanking the polymorphic restriction site. The following oligonucleotides were used: for the first SNP: 5'-TTGACATAAAGG-TTTCCTCATG-3' (forward primer), 5'-GCTAATGGTCATCCTGTTGCT-3' (reverse primer); and for the second SNP: 5'-TGAAGGACAGCATGGTTGGT-3' (forward primer), 5'-ACATGGAATGAGCAGTGTGC-3' (reverse primer). The PCR product was then digested O/N with the appropriate restriction enzyme (*RsaI* for the first SNP, *MfeI* for the second), before being separated on an agarose gel and genotyped according to the band patterns.

Statistical analyses

Pearson correlations, Kolmogorov-Smirnov (KS) normality tests, graphs and linear regression analyses were conducted using SPSS software version 10.1 for Microsoft Windows and NCSS 2004. Frequencies were compared by Fisher's exact test or Chi square (X^2) test. Agreement between methylation and transcription assays was assessed using the Bland-Altman method³². A power study was conducted by a linear regression analysis using PASS 2002. Hardy-Weinberg equilibrium was assessed for each SNP using PEDSTATS³³. Haplotype association tests were conducted by using UNPHASED QTPHASE v 2.402³⁴. As DS scores are not normally distributed, a box-cox transformation was performed to normalize the data, using SAS 9.1.3.

Genetic profiling for twin zygosity determination

Seven different STR markers were used to assess the zygosity of twin pairs. If one pair of twins had identical alleles at these 7 markers, an additional set of 3 markers was tested.

Results

Cohort

A total of 502 pairs of neonate (NN)-mother were recruited for this study from July 2003 to October 2004 at the Maisonneuve-Rosemont Hospital (Montreal, Canada). The majority of the neonates (72%) had both parents of French Canadian origin, while respectively 13% and 15 % had only one or no parents of French Canadian origin. Mothers were aged from 18 years old (y.o.) to 43 y.o. (mean=28.9 \pm 5.3 y.o.). Seven pairs of twins were recruited (6 dizygotes and 1 monozygote, based on genetic profiles obtained at several STR polymorphic loci). Only one randomly chosen twin for each pair was kept for the analyses.

Validation of XCI ratio determination assays

To validate the HUMARA assay for the analysis of specimen from neonates, we compared the XCI ratios results of HUMARA (methylation) and IDS (transcription) in a total of 94 neonates heterozygous for both assays. The mean difference between the two assays was 5.82%. The agreement coefficient between both methods, defined by Bland and Altman³² as $\pm 2s$ (where s is the standard deviation), was of $\pm 13.5\%$. The Pearson correlation to compare the X-inactivation ratios from both methods was 0.92, confirming the validity of the HUMARA assay for XCI ratios determination in neonates.

Incidences of skewing

Of the 996 women assayed, 454 NN (91.2%) and 448 mothers (90.0%) were heterozygous at the HUMARA locus, rendering possible the assessment of XCI ratios for these individuals only. XCI ratios were determined for both specimens (blood and buccal epithelial cells) obtained from every participant. Degree of skewing (DS) was the measure used to evaluate the deviation from a 1:1 XCI ratio, going from 0 (no skewing) to 0.5 (complete skewing). The median values of DS for all neonates were of 0.095 in buccal cells and of 0.122 in blood. For mothers, the median values were of 0.109 in buccal cells and 0.157 in blood. The qualitative value to delineate skewing of XCI was a DS ≥ 0.25 (or a $\geq 75\%$ pattern), as previously used in the literature^{14,35-37}. Considering this criterion, 7.6% (33/436) and 14.2% (64/450) of neonates showed skewed patterns of XCI in buccal cells and blood, re-

spectively (table 1). The mothers exhibited a higher proportion of skewing, with 13.5% (60/445) and 27.9% (124/444) of them being skewed in buccal and blood cells, respectively (table 1). Extremely skewed XCI ratios (i.e. a DS ≥ 0.4 ; or a $\geq 90\%$ pattern) were uncommon in both groups, as 0.5% (2/436) and 2.7% (12/450) of neonates, and 1.3% (6/445) and 4.5% (20/444) of mothers showed such a pattern of skewing in buccal cells and in blood, respectively. Mothers showed a significantly higher degree of skewing ($\geq 75\%$ pattern) as compared to neonates for buccal cells ($P=.004$), and for blood XCI ratios ($P<.001$), as assessed by a Chi-Square Test. Moreover, blood cells were more skewed than buccal cells in both neonates ($P=.002$) and mothers ($P<.001$).

Concordance of XCI ratios between buccal cells and blood

To evaluate the tissue specificity of XCI ratios, we tested for concordance between blood and buccal epithelial cells for each subject. For this analysis, we took advantage of the P_{sup} score, as it indicates the proportion of cells expressing the X-chromosome bearing the superior (largest) HUMARA allele. It is thus possible to evaluate if skewing is in favor of the same allele in both tissues of an individual. We performed a linear regression analysis and tested for Pearson correlation. The normality of the distributions was tested with the KS test. The inactivation ratios of 433 NN and 441 mothers are depicted in figure 1. There was a positive and significant correlation between the XCI ratios (P_{sup}) of NN blood and buccal cells (Pearson $r=.715$, $P<.01$), as well as for mothers (Pearson $r=.779$, $P<.01$). These similar skewing patterns in two tissues of different embryologic origin, in both neonates and adult women, might reflect a body-wide origin of skewing.

Transmission of skewing in mother-neonate pairs

To test for a genetic contribution to skewing, in particular for the possibility of a cis-acting gene such as the mouse *Xce*, we evaluated the transmission of XCI ratios between the mothers and their neonates. In a first analysis, we utilized DS scores to qualitatively study transmission of skewing. We verified whether skewed mothers have more chances to give birth to skewed neonates, compared to non-skewed mothers. A DS score ≥ 0.25 (or XCI pattern $\geq 75\%$) was used as the criterion for skewing, while a DS score < 0.15 (or XCI pattern $< 65\%$) defined non-skewing,

thus leaving a gray zone between the categories. There was no significant enrichment of skewed neonates in a group of skewed mothers compared to a group of non-skewed mothers (table 2a). In fact, of the 53 mothers showing skewing in buccal cells, only 3 gave birth to a skewed neonate (5.7%), whereas of the 242 non-skewed mothers, 20 gave birth to a skewed neonate (8.3%). The Fisher's exact test showed no significant difference between both groups ($P=.5784$), and similarly in blood (14.7% versus 13.6%, $P=.800$). Those results indicate that neonate skewing is not directly determined by the skewing status of her mother. Moreover, the incidence of skewing in neonates of skewed or non-skewed mothers was similar to that found in the whole neonate population (refer to table 1). The same conclusion can be reached by analyzing the data in the other direction, which is to ask if a skewed neonate has more chances to have a skewed mother (table 2b). In addition, using a more stringent criterion for skewing (i.e. a $DS \geq 0.4$; or a $\geq 90\%$ pattern), we performed the same qualitative analysis. Again, no significant differences were observed in the rates of skewing between the groups of NN from skewed and non-skewed mothers, neither in both tissues nor in the other direction (data not shown).

To quantitatively study the transmission of XCI ratios, we tested the correlation between mothers and neonates using P_{mat} and P_{trans} results. P_{mat} and P_{trans} scores were similar to P_{sup} scores, but their values from 0 to 1 indicated the proportion of cells having the shared HUMARA allele on the active X-chromosome. These scores are suitable for transmission studies, as the XCI ratio calculations are based on the X-chromosome shared by a mother and a daughter. Here, the linear regression analysis (figure 2) showed no correlation between the XCI ratios of mother and daughter pairs, neither in buccal cells ($r=.074$, $n=347$, $P=.172$), nor in blood ($r=.058$, $n=357$, $P=.272$), corroborating the qualitative analyses. From these linear regression analyses, we could estimate the empiric heritability, which is described as $2 \times B$ (slope of the regression)³⁸. Although the values of the regression slopes were of .064 for buccal cells and .047 for blood, and gave estimated heritability values of 12.8% and 9.3%, this was not considered significant as the slopes were not significantly different from 0.

Moreover, the correlation of XCI ratios between mothers and neonates, using normalized DS scores, which do not take into account the direction of skewing but only the degree of deviation from a 50% pattern, was null and non-significant (data not shown).

Statistical power of the study

To assess the power of our cohort, and thus validate the transmission tests described above, we conducted a power study, using PASS 2002. The power study was based on a linear regression analysis of Pmat and Ptrans scores. The analysis showed that our cohort is powerful enough to detect heritabilities of 26% (buccal cells) and 24% (blood) or more.

Association between XIST SNPs and skewing

The search for *Xce*-like *cis*-acting genes in humans can be approached by using DNA markers, such as SNPs, to test for an association with the trait. Here, five SNPs in the region surrounding the *XIST* gene were tested. The Hardy-Weinberg equilibrium of each genotyped SNP was validated by using PEDSTATS before performing the analyses. The association was tested using UNPHASED QTPHASE, by comparing unrelated individuals. We took advantage of the DS scores, as this score expresses the magnitude of the degree of skewing, without taking into account the direction of skewing towards one X-chromosome or the other. However, UNPHASED uses a parametric test and requires normalized data. We thus used the box-cox normalized DS scores of neonates. Analyzed separately, none of the SNPs showed a significant association with skewing, neither in buccal epithelium nor in blood tissue (data not shown). The SNPs were also analyzed by haplotypes of 2, 3, 4 and 5 markers. None of the analyses revealed an association with the degree of skewing as well, as ascertained by the non-significant *P* values (data shown for the 5-marker haplotypes analysis in table 3).

Discussion

In the past 45 years, from the simple hypothesis stating that one of the two X-chromosomes is randomly inactivated during embryogenesis in each female cells¹, and further stably transmitted in the cell progeny^{2,3}, our comprehension of X-inactivation has evolved to the notion of a complex trait characterized by non-random inactivation (skewing) in a significant number of normal females^{14,39}, and by tissue specificity and age-dependency of X-inactivation ratios^{18,20}. Study of the cause of skewing has shown in mice the influence of *Xic*-linked genes (*Xce*) potentially biasing the choice of the X-chromosome to be inactivated in a cell²¹, while data from human population cohorts rather support an hemizygous cell selection as the principal cause of skewing³⁹. In fact, these two theories are not mutually exclusive as they describe mechanisms operating at different life periods. *Cis*-acting genetic elements of the XIC should be associated with skewing at the time of XCI establishment, and could thus potentially explain primary skewing documented in human neonates¹⁴⁻¹⁶; while hemizygous cell selections are time-dependent and should manifest progressively during life. To investigate further the cause(s) of skewing of X-inactivation in human females, we have used an epidemiogenetic approach focusing on X-inactivation ratios from a cohort of neonates and their mothers. We evaluated the tissue concordance of X-inactivation ratios at birth, as a high correlation would support an early and common, as opposed to a tissue-specific, etiology for primary skewing during embryogenesis. In addition, we looked at the transmission of the trait from mothers to neonates and tested for polymorphisms association, to evaluate the genetic component in this form of primary skewing. Moreover, we looked at the dynamics of skewing over time using data from the cohort of neonates and mothers from this study, and also data from previous work on elderly females.

We showed that, although the incidence of skewing (qualitative, $DS \geq .25$) in female neonates was statistically different between epithelial and blood cells (respectively 7.6% vs 14.2%, $P = .002$), the tissue concordance analysis looking quantitatively at the direction of skewing (towards the maternal versus the paternal allele) revealed a significant correlation ($r = .715$, $P < .001$), demonstrating that those neonates skewed in buccal cells are mostly skewed in the same direction in blood cells.

Such a strong correlation indicates that these two different tissues must be closely related regarding X-inactivation, and supports an early XCI process occurring prior to inermass splitting (thus prior to tissue specification), as is observed in mice⁴⁰.

In mothers, similar data were obtained. The incidence of skewing was statistically different between epithelial and blood cells (respectively 13.9% vs 27.9%, $P < .001$), but a high concordance of the X-inactivation ratios between the two tissues was still observed ($r = .779$, $P < .001$). Nevertheless, the most striking observation was that the incidence of skewing had almost exactly doubled in each tissue in comparison with data reported from neonates (from 7.6% to 13.9% in epithelial tissue, from 14.2% to 27.9% in blood tissue). This similar increase not only reveals that an age-associated skewing occurs at this period of life (from birth to 28 y.o.), but also suggests that the mechanism in cause is acting in a very similarly way on both tissues. Assuming that age-associated skewing is caused by hemizygous cell selections over time, the genes responsible for these selections must give a similar growth advantage to epithelial cells and blood cells, eventhough these tissues exhibit different cell cycle and dividing potentials.

These results complemented the results of our previous work, where we have reported, in a cohort of elderly females (60 y.o. and over), different incidences of skewing in epithelial versus blood cells (respectively 13% and 40%), and lower concordance between the two tissues ($r = .31$)⁴¹. To summarize the data we and others obtained^{39,41}: from birth to 30 y.o., skewing incidences increase in epithelial and blood tissues, while tissue concordances stay relatively equivalent; and from 30 y.o. to 60 y.o., skewing incidences are constant in epithelial cells and increasing in blood cells, while tissue concordances decrease. To unify these observations, we propose that from birth (and potentially from XCI establishment) up to 30 years old, both epithelial and blood tissues are subjected to a form of age-associated skewing under the influence of the same gene(s); while an additional selection pressure, effective from 30 years old and beyond, is affecting strictly the blood lineage. Therefore, we hypothesize that the hemizygous cell selection, effective probably from XCI establishment, and surely from birth, to adulthood, is conferred by genes responsible for the expansion of cell mass. Genes such as homeotic

genes play an important role during childhood to increase by an almost 10 fold factor the total mass of an individual, and the same genes act during the embryonic and fetal development to assure the growth of the foetus. After adulthood, there is no such cell mass expansion, and stable tissues, like epithelials, can thus no longer be subjected to a likely selection pressure. However, blood cells can still be affected by an hemizygous cell selection after 30 y.o., as this tissue is characterized by important autorenewals and expansion all life long. This may also explain the fact that blood cells constantly show increased incidences of skewing than other tissues, whatever the age group observed, as their higher division rate renders them more sensitive to selective pressures. Still, the question of which genes are responsible for this second phase of the age-associated skewing remains open, as this cell selection can either be the continuation of the first phase of age-associated skewing, or be under the influence of other hematopoietic-specific genes.

As a consequence of the early timing of X-inactivation process, primary skewing during development is first caused by a mechanism affecting all tissues equally, thus possibly implicating XIC-linked genetic variants affecting X-chromosome inactivation choice. To test the latter hypothesis, we studied if skewed patterns of XCI can be transmitted from mothers to neonates. Assuming that the choice of the X chromosome to inactivate is truly influenced by a genetic locus, we would expect the transmission of a causal allele from mother to daughter to lead to a predisposition of the daughter to present skewed patterns of XCI. Using a qualitative analysis (i.e. by categorizing females as skewed, if $DS \geq .25$, or non-skewed, if $DS < .15$), we did not observed an enrichment of the proportion of skewed neonates from a group of skewed mothers compared to a group of non-skewed mothers (respectively 5.7% versus 8,3% for epithelial tissue, $P(\text{fisher})=.59$; and 29.3% versus 31.1% for blood, $P(X^2)=.79$). Similarly, using a quantitative analysis (i.e. by comparing mother and neonate degrees of skewing towards the shared X-chromosome), we demonstrated the lack of correlation between both groups ($r=.074$ for epithelial tissue, $P=.172$; $r=.058$ for blood tissue, $P=.272$). These results demonstrate that skewed XCI ratios are not a heritable phenotype, and consequently, support that the choice of the X-chromosome to inactivate may be simply stochastic, as was first hypothesized by Lyon (61 et 62). While a number of previous studies suggested the

heritability of skewing^{22,27,29}, they did not exactly show inconsistency with our results, as they involved adult females, and as we now know that X-inactivation skewing at adulthood is the addition of two resultants: primary skewing and age-associated skewing.

Obviously, the degree of skewing of a mother does not exactly reflect her degree of skewing at birth, thus potentially affecting transmission analyses. Therefore, we looked at another approach to test for the genetic etiology of primary skewing, by evaluating the association between the degree of skewing and the genotypes at five polymorphic loci covering one candidate region, the *XIST* gene. The drawback of testing a small number of polymorphisms was overcome by the fact that this study was performed on a founder population where the haplotype blocks are generally large⁴², and that the size of the candidate region is believed to be relatively small⁴³. Our results showed no correlation (see Table 3), excluding the implication of the region surrounding the *XIST* gene in primary skewing, and corroborating with the results of our transmission study.

Certainly, we cannot exclude the possibility that primary skewing might be a complex trait, and if so, the possibility that our cohort failed to uncover a genetic component, if the effect of this component is drowned by a combination of other factors. Indeed, we cannot rule out the possibility of an imprinted gene expressed on the paternal X that would influence transmission of the trait. Nevertheless, our results clearly excluded a major-gene effect, as is *Xce* in mice, in the etiology of primary skewing, which is in sharp contrast with the mouse model⁴³. The loss of this feature in humans may reflect the evolution of this dosage-compensating mechanism, as well as the different evolution of mice and human sex chromosomes^{44,45}.

In conclusion, by the statistical study of XCI ratios from 500 neonates and their mother, we have confirmed that primary skewing, observed in a percentage of neonates, and age-associated skewing are distinct traits, the former being mostly stochastically determined, while the latter being conceivably the result of X-chromosome-based cell selections. Moreover, we have showed that age-associated skewing is subdivided in two phases: the first one, from XCI establishe-

ment to adulthood, representing the growing mass cell expansion, and the second one, from adulthood to elderly ages, reflecting the hematological cells turnover. Future studies are needed to attest the genetic basis of these hemizygous selections and eventually identify the genes implicated.

Acknowledgements

We gratefully thank Rolande Ste-Marie for coordinating recruitment, Eve Pomerleau and Myriam Beaupré for technical assistance, the employees of the Obstetric and Gynecology department of Maisonneuve-Rosemont Hospital for their collaboration, and all the study participants. This study was funded by FRSQ and an unrestricted grant from Hemax Genome inc.

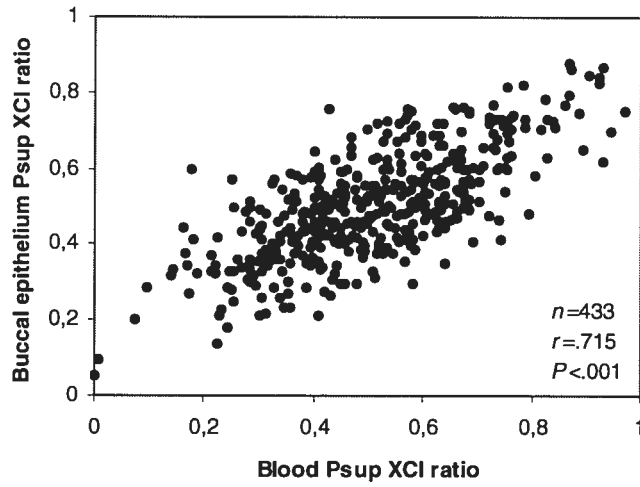
Figures and Tables

Table 1

Incidences of skewing ($\geq 75\%$ and $\geq 90\%$) for two tissues of a cohort of mothers and neonates

	$\geq 75\%$		$\geq 90\%$	
	Buccal cells	Blood	Buccal cells	Blood
Neonates	7.6% (33/436)	14.2% (64/450)	0.5% (2/436)	2.7% (12/450)
Mothers	13.5% (60/445)	27.9% (124/444)	1.3% (6/445)	4.5% (20/444)

A



B

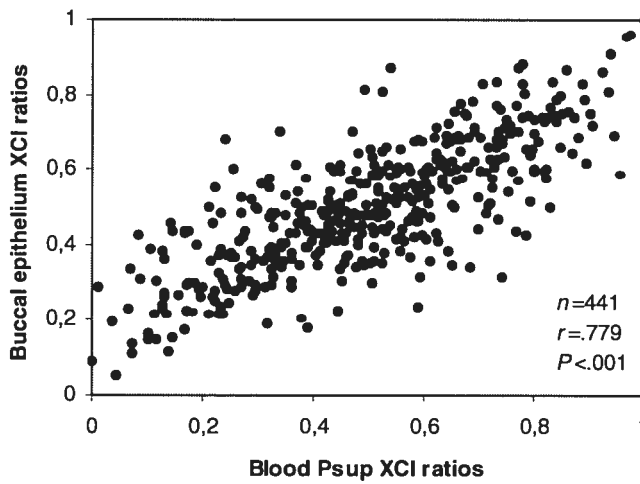


Figure 1 Scatter plots and correlations of blood vs buccal epithelial tissue XCI ratios. Psup scores were used to correlate the XCI ratios of the 2 tissues for A, neonates. B, mothers.

Table 2

A, Incidences of skewing in neonates of skewed mothers vs non-skewed mothers.
 B, Incidences of skewing in mothers of skewed neonates vs non-skewed neonates.

A

	Skewed neonates	<i>P</i>
Buccal cells		
Skewed mothers (n=53)	3 (5.7%)	.777 ^a
Non-skewed mothers (n=242)	20 (8.3%)	
Blood		
Skewed mothers (n=116)	17 (14.7%)	.800 ^b
Non-skewed mothers (n=191)	26 (13.6%)	

B

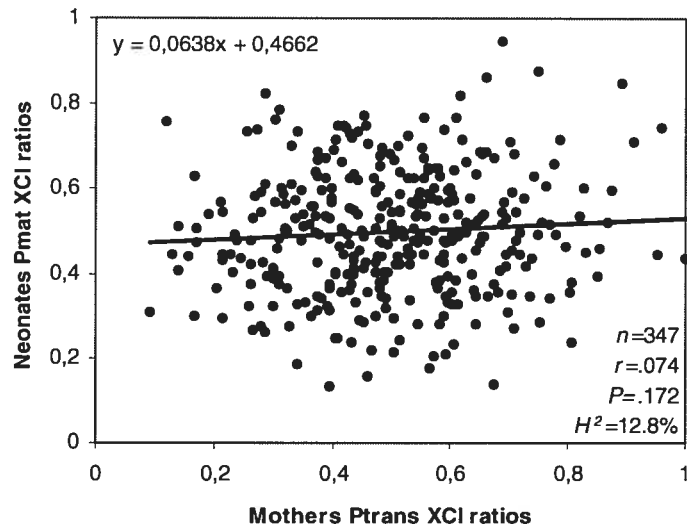
	Skewed mothers	<i>P</i>
Buccal cells		
Skewed neonates (n=32)	3 (9.4%)	.592 ^a
Non-skewed neonates (n=266)	38 (14.3%)	
Blood		
Skewed neonates (n=58)	17 (29.3%)	.790 ^b
Non-skewed neonates (n=241)	75 (31.1%)	

NOTE – XCI patterns of $\geq 75\%$ and $< 65\%$ were used as criteria for skewing and no skewing, respectively.

^a *P* values were calculated using Fisher's Exact Test

^b *P* values were calculated using Chi-Square

A



B

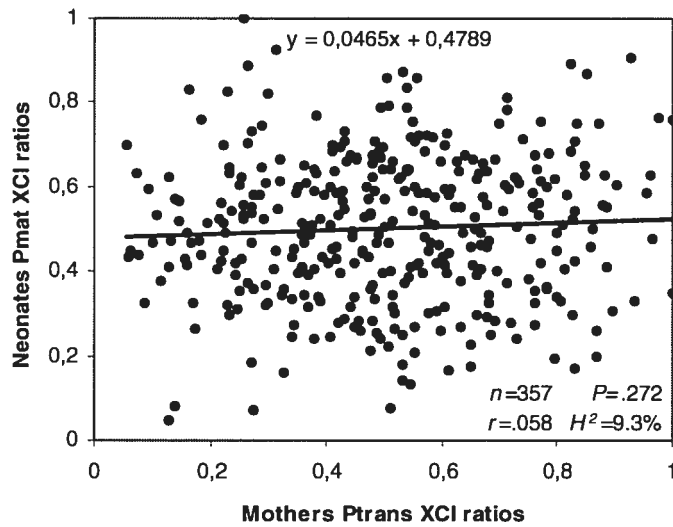


Figure 2 Linear regressions and correlations of mothers vs neonates XCI ratios. Ptrans and Pmat scores were used to show the proportion of cells having the transmitted (mothers) or maternal (neonates) allele active in mother-neonate duos. A, Buccal epithelium. B, blood.

Table 3

UNPHASED analysis of five-marker haplotypes vs degree of skewing for 154 neonates

Markers	1	2	3	4	5	Frequency	<i>P</i> values	
							buccal epithelium	blood
Haplotypes	1	1	1	1	1	0.01	0.292	0.998
	1	1	1	1	2	0.89	0.204	0.120
	2	1	1	1	1	0.03	0.361	0.403
	2	1	1	2	1	0.03	0.780	0.431
	2	1	2	1	1	0.02	0.760	0.654
	2	2	1	1	1	0.03	0.306	0.342
Global <i>P</i> values							0.653	0.756

Table 4
Phylogenic view of X-chromosome inactivation

	Type of inactivation	
	Embryo	Trophoectoderm (placenta)
Marsupial	Imprint (Xp)	Imprint (Xp)
Mouse	Random (<i>Xce</i> effect)	Imprint (Xp)
Human	Random	Random

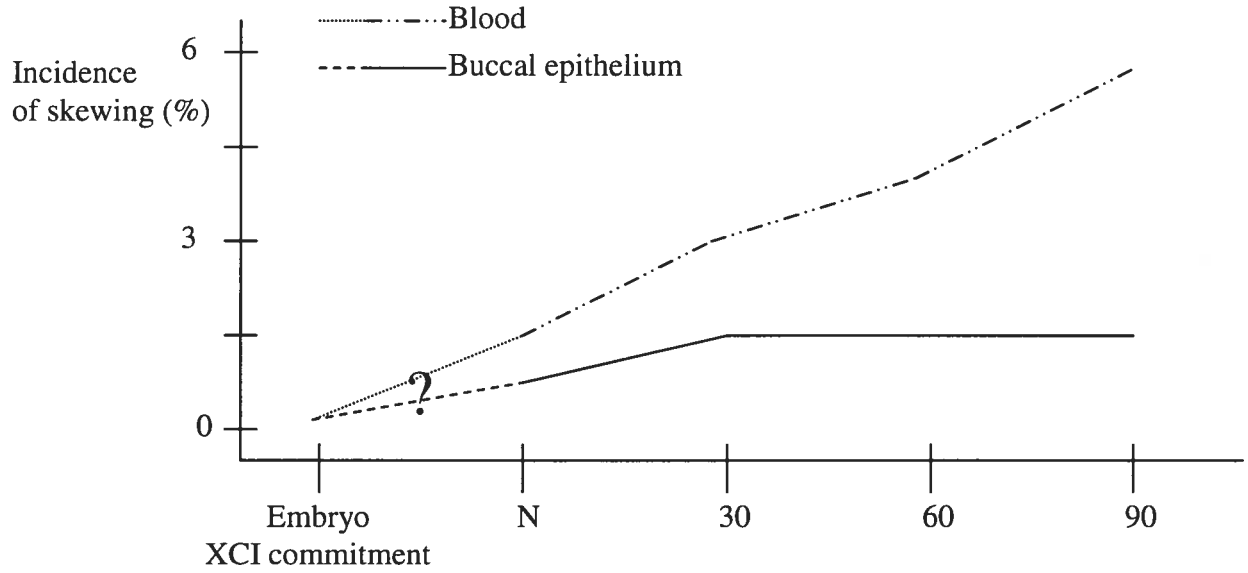


Figure 3 Model showing changes in skewing of XCI incidences over age (criterion for skewing $\geq 75\%$ pattern)

Reference List

- (1) Lyon MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse [*Mus musculus* L.]. *Nature*. 1961;190:372.
- (2) Davidson RG, Nithowsky HM, Childs B. Demonstration of two populations of cells in the human female heterozygous for glucose-6-phosphate dehydrogenase variant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1963;50:481.
- (3) McMahon A, Fosten M, Monk M. X-chromosome inactivation mosaicism in the three germ layers and the germ line of the mouse embryo. *J Embryol Exp Morphol*. 1983;74:207-220.
- (4) Beutler E, Yeh M, Fairbanks VF. The normal human female as a mosaic of X-chromosome activity: Studies using the gene for G-6-PD deficiency as a marker. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1962;48:9.
- (5) Beutler E, Kuhl W. The NT 1311 polymorphism of G6PD: G6PD Mediterranean mutation may have originated independently in Europe and Asia. *Am J Hum Genet*. 1990;47:1008-1012.
- (6) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Feinberg AP. Use of restriction fragment length polymorphisms to determine the clonal origin of human tumors. *Science*. 1985;227:642-645.
- (7) Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet*. 1992;51:1229-1239.
- (8) Puck JM, Nussbaum RL, Conley ME. Carrier detection in X-linked severe combined immunodeficiency based on patterns of X chromosome inactivation. *J Clin Invest*. 1987;79:1395-1400.
- (9) Conley ME, Brown P, Pickard AR et al. Expression of the gene defect in X-linked agammaglobulinemia. *N Engl J Med*. 1986;315:564-567.
- (10) Zabel BU, Baumann WA, Pirntke W, Gerhard-Ratschow K. X-inactivation pattern in three cases of X/autosome translocation. *Am J Med Genet*. 1978;1:309-317.
- (11) Linder D, Gartler SM. Glucose-6-phosphate dehydrogenase mosaicism: utilization as a cell marker in the study of leiomyomas. *Science*. 1965;150:67-69.
- (12) Beutler E, Collins Z, Irwin LE. Value of genetic variants of glucose-6-phosphate dehydrogenase in tracing the origin of malignant tumors. *N Engl J Med*. 1967;276:389-391.

- (13) Gale RE, Wheadon H, Linch DC. Assessment of X-chromosome inactivation patterns using the hypervariable probe M27 beta in normal hemopoietic cells and acute myeloid leukemic blasts. *Leukemia*. 1992;6:649-655.
- (14) Busque L, Mio R, Mattioli J et al. Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: lyonization ratios vary with age. *Blood*. 1996;88:59-65.
- (15) Gale RE, Fielding AK, Harrison CN, Linch DC. Acquired skewing of X-chromosome inactivation patterns in myeloid cells of the elderly suggests stochastic clonal loss with age. *Br J Haematol*. 1997;98:512-519.
- (16) Tonon L, Bergamaschi G, Dellavecchia C et al. Unbalanced X-chromosome inactivation in haemopoietic cells from normal women. *Br J Haematol*. 1998;102:996-1003.
- (17) Kristiansen M, Knudsen GP, Bathum L et al. Twin study of genetic and aging effects on X chromosome inactivation. *Eur J Hum Genet*. 2005;13:599-606.
- (18) Gale RE, Wheadon H, Boulos P, Linch DC. Tissue specificity of X-chromosome inactivation patterns. *Blood*. 1994;83:2899-2905.
- (19) Azofeifa J, Waldherr R, Cremer M. X-chromosome methylation ratios as indicators of chromosomal activity: evidence of intraindividual divergencies among tissues of different embryonal origin. *Hum Genet*. 1996;97:330-333.
- (20) Sharp A, Robinson D, Jacobs P. Age- and tissue-specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women. *Hum Genet*. 2000;107:343-349.
- (21) Cattanach BM, Isaacson JH. Controlling elements in the mouse X chromosome. *Genetics*. 1967;57:331-346.
- (22) Plenge RM, Hendrich BD, Schwartz C et al. A promoter mutation in the XIST gene in two unrelated families with skewed X-chromosome inactivation. *Nat Genet*. 1997;17:353-356.
- (23) Pereira LV, Zatz M. Screening of the C43G mutation in the promoter region of the XIST gene in females with highly skewed X-chromosome inactivation. *Am J Med Genet*. 1999;87:86-87.
- (24) Biccocchi MP, Migeon BR, Pasino M et al. Familial nonrandom inactivation linked to the X inactivation centre in heterozygotes manifesting haemophilia A. *Eur J Hum Genet*. 2005;13:635-640.
- (25) Christensen K, Kristiansen M, Hagen-Larsen H et al. X-linked genetic factors regulate hematopoietic stem-cell kinetics in females. *Blood*. 2000;95:2449-2451.

- (26) Vickers MA, McLeod E, Spector TD, Wilson IJ. Assessment of mechanism of acquired skewed X inactivation by analysis of twins. *Blood*. 2001;97:1274-1281.
- (27) Naumova AK, Plenge RM, Bird LM et al. Heritability of X chromosome--inactivation phenotype in a large family. *Am J Hum Genet*. 1996;58:1111-1119.
- (28) Pegoraro E, Whitaker J, Mowery-Rushton P et al. Familial skewed X inactivation: a molecular trait associated with high spontaneous-abortion rate maps to Xq28. *Am J Hum Genet*. 1997;61:160-170.
- (29) Naumova AK, Olien L, Bird LM et al. Genetic mapping of X-linked loci involved in skewing of X chromosome inactivation in the human. *Eur J Hum Genet*. 1998;6:552-562.
- (30) Shinde D, Lai Y, Sun F, Arnheim N. Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)_n and (A/T)_n microsatellites. *Nucleic Acids Res*. 2003;31:974-980.
- (31) el-Kassar N, Hetet G, Briere J, Grandchamp B. Clonality analysis of hematopoiesis in essential thrombocythemia: advantages of studying T lymphocytes and platelets. *Blood*. 1997;89:128-134.
- (32) Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. 1986;1:307-310.
- (33) Abecasis GR, Cherny SS, Cookson WO, Cardon LR. Merlin--rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat Genet*. 2002;30:97-101.
- (34) Dudbridge F. Pedigree disequilibrium tests for multilocus haplotypes. *Genet Epidemiol*. 2003;25:115-121.
- (35) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR et al. Clonal analysis using recombinant DNA probes from the X-chromosome. *Cancer Res*. 1987;47:4806-4813.
- (36) Gale RE, Wheadon H, Linch DC. X-chromosome inactivation patterns using *HPRT* and *PGK* polymorphisms in haematologically normal and post-chemotherapy females. *Br J Haematol*. 1991;79:193-197.
- (37) Allen RC, Nachtman RG, Rosenblatt HM, Belmont JW. Application of carrier testing to genetic counseling for X-linked agammaglobulinemia. *Am J Hum Genet*. 1994;54:25-35.
- (38) Hedrick PW. Quantitative traits and evolution. *Genetics of population*. Jones and Barlett; 2000:463-480.

- (39) Hatakeyama C, Anderson CL, Beever CL et al. The dynamics of X-inactivation skewing as women age. *Clin Genet.* 2004;66:327-332.
- (40) Okamoto I, Otte AP, Allis CD, Reinberg D, Heard E. Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science.* 2004;303:644-649.
- (41) Busque L, Mio R, Provost S et al. The age-associated skewing of X-inactivation ratios of blood cells: an heritable trait acting at the stem cell level. [abstract]. *Blood.* 2003;102:568a.
- (42) Arcos-Burgos M, Muenke M. Genetics of population isolates. *Clin Genet.* 2002;61:233-247.
- (43) Chadwick LH, Pertz L, Broman KW, Bartolomei MS, Willard HF. Genetic control of X chromosome inactivation in mice: definition of the Xce candidate interval. *Genetics.* 2006.
- (44) Huynh KD, Lee JT. X-chromosome inactivation: a hypothesis linking ontogeny and phylogeny. *Nat Rev Genet.* 2005;6:410-418.
- (45) Reik W, Lewis A. Co-evolution of X-chromosome inactivation and imprinting in mammals. *Nat Rev Genet.* 2005;6:403-410.

Chapitre 4

DISCUSSION

Les ratios d'inactivation chez les femmes adultes et âgées, ainsi que le mosaïcisme biaisé associé à l'âge, ont été amplement étudiés durant la dernière décennie, comme en font foi les nombreuses publications à ce sujet^{127,129,153,154,157}. Ces études ont mis en évidence la dynamique des ratios d'inactivation avec l'âge, qui tendent à se biaiser de plus en plus dans le sang, tout en demeurant relativement stables dans les autres tissus. Cette augmentation des biais dans le sang pourrait être causée sur la base d'une sélection hémizygote des cellules sanguines. L'identification du ou des gènes impliqués dans cette sélection pourra être utilisée à d'éventuelles fins thérapeutiques.

Au contraire, les ratios d'inactivation à la naissance n'ont pas encore été bien caractérisés. Il est supposé qu'ils soient identiques dans tous les tissus d'une même femme à la naissance, et qu'ils se modifient par la suite de façon spécifique au sang. Par ailleurs, si le mosaïcisme biaisé néonatal est effectivement commun à tous les tissus à ce stade, il serait distinct du mosaïcisme biaisé associé à l'âge et pourrait être causé, comme chez la souris, par des gènes qui agissent en *cis* lors du processus de l'ICX.

Cette présente étude, de par son approche et son envergure, est la première qui puisse répondre à ces questions.

4.1 Mesure du ratio d'inactivation (phénotype)

Puisque le phénotype (i.e. le ratio d'inactivation) est à la base de toutes les analyses, il est primordial de le mesurer précisément en utilisant les meilleurs outils. Nous avons utilisé 2 méthodes différentes de détermination des ratios d'inactivation : un essai méthylation, qui est réalisé en amplifiant spécifiquement les allèles inactifs, suite à une digestion spécifique des allèles liés aux

chromosomes X actifs; et un essai transcription, qui amplifie l'ADNc d'un échantillon avec des amorces spécifiques à chaque allèle. Ces 2 essais sont réalisés à des loci polymorphiques permettant de distinguer les allèles maternel et paternel, soit respectivement au gène du récepteur de l'androgène (HUMARA) et au gène de l'iduronate-2-sulfatase (IDS). Pour 94 NN qui étaient hétérozygotes (donc informatives) pour les 2 loci (HUMARA et IDS), les ratios d'inactivation déterminés par les 2 méthodes ont été rapportés sur un graphique. La pente de la régression s'est avérée positive et proche de la valeur 1 ($m=0,846$), démontrant la bonne concordance entre les méthodes. De plus, le test de Pearson a évalué un coefficient de corrélation élevé ($r=0,92$). Une façon encore plus adéquate comparer 2 méthodes quantitatives s'agit de rapporter sur un graphique la moyenne entre les 2 méthodes (sur l'axe des x) contre la différence entre celles-ci (sur l'axe des y)¹⁷⁰. Cette façon de comparer permet de déterminer rapidement, par le calcul de la différence moyenne, s'il y a un biais envers une des 2 méthodes. Nos données ont montré une différence moyenne (i.e. moyenne de la différence « HUMARA » - « IDS ») de 0.085. Puisque cette valeur est près de 0, nous pouvons affirmer que les 2 méthodes concordent et qu'il n'y a aucun biais. Par ailleurs, nous avons calculé la moyenne des différences (i.e. moyenne des valeurs absolues de la différence « HUMARA » - « IDS ») pour s'assurer que les écarts n'étaient pas trop grands entre les résultats. Nous avons obtenu un écart moyen de 5,03 et un écart-type de 6,74. Compte tenu du fait que les méthodes a une variation de reproductibilité de plus ou moins 10%¹⁶⁷, ces résultats sont convaincants pour affirmer qu'il y a une bonne concordance entre les 2 méthodes.

L'essai méthylation au locus HUMARA est la méthode la plus facile à réaliser (une simple digestion suivie d'une amplification PCR) et la plus accessible, puisque approximativement 90% des femmes sont hétérozygotes à ce locus. Cependant, son succès repose sur le fait que la méthylation ne soit pas altérée au locus étudié. Si la méthylation de l'ADN pouvait, par exemple, ne pas être complétée à la naissance, comme il l'a déjà été suggéré¹²⁴, l'utilisation de cette méthode de détermination du ratio d'inactivation serait injustifiée. Nos résultats montrent que cette source potentielle de biais est éliminée, puisque cet essai de méthylation a montré des résultats très similaires lorsqu'elle a été comparée avec un essai

transcription au locus IDS et ce, pour une cohorte de NN. Nous concluons donc à la fiabilité de la méthode HUMARA pour une population de NN. Cette conclusion contraste avec celle de El-Kassar et ses collaborateurs¹²⁴, qui avait obtenu des résultats différents en déterminant les ratios d'inactivation de 40 NN avec les essais méthylation HUMARA et transcription IDS. L'équipe d'El-Kassar était arrivée à la conclusion que l'essai méthylation n'était pas une méthode fiable pour déterminer les ratios d'inactivation chez des NN. Comment expliquer cette divergence entre leur étude et nos résultats ? D'abord, la comparaison essai méthylation-essai transcription réalisée par cette équipe n'a été que qualitative, puisqu'elle n'a comparé que les incidences de mosaïcisme biaisé détectées par chacune des 2 méthodes, plutôt que de comparer quantitativement les données entre elles. Il est donc possible que l'écart entre les données ne soit pas si élevé, malgré qu'elles soient catégorisées différemment (biaisé vs non-biaisé). Ensuite, le nombre d'échantillons que cette équipe a comparé (40) est légèrement inférieur au nombre que nous avons testé (94), ce qui est peut-être expliquer une différence. Finalement, un fait est intéressant à noter : dans cette même publication d'El-Kassar, l'incidence de mosaïcisme biaisé rapportée sur une cohorte de 50 à 80 ans (soit 21%)¹²⁴ est nettement inférieur à tout ce qui était, et est depuis ce temps, rapporté dans la littérature pour ce groupe d'âge (soit de 38% à 60%)^{127,150,151,153}. Cet important écart laisse planer un doute soit sur le type de population qu'ils ont recruté, à savoir par exemple si les individus inclus ont réellement été rassemblés sur la base du hasard, soit de leur façon de manipuler les échantillons et de calculer les ratios d'inactivation, à savoir s'ils ont bien contrôlé toutes les étapes (par exemple lors des digestions pré-PCR ou des PCR).

4.2 Description de la cohorte

Il s'agit de la première cohorte de cette envergure (plus de 500 NN). De même, c'est la première fois que la mère reliée à la fille soit incluse dans une même étude. Ces qualités nous procurent la puissance statistique nécessaire à l'étude de la transmission des ratios d'inactivation. Par ailleurs, cette étude innove en incluant un tissu autre que le sang chez les NN, soit l'épithélium buccal. Le sang

et l'épithélium buccal provenant de tissus embryonnaires différents, la corrélation de leurs ratios d'inactivation permet de spéculer sur l'origine des ratios d'inactivation et du mosaïcisme biaisé néonatal.

Dans la cohorte que nous avons recrutée, 7,6% (33/436) et 14,2% (64/450) des NN présentaient un ratio d'inactivation biaisé ($\geq 75\%$), respectivement dans l'épithélium buccal et dans le sang. La donnée du sang est comparable à ce qui avait déjà été trouvé dans la littérature, soit qu'environ 8 à 22% des NN présentent un mosaïcisme biaisé^{127,150,151}. Cependant, la donnée de l'épithélium buccal ne peut être comparé avec la littérature. Deux fois plus de NN présentent un mosaïcisme biaisé dans le sang que dans l'épithélium buccal. Une hypothèse pour expliquer l'augmentation de mosaïcisme biaisé du sang par rapport à l'épithélium buccal sera discutée au chapitre 4.5.

L'âge moyen des mères était de 28 ans, avec un minimum de 18 ans et un maximum de 43 ans. L'incidence de mosaïcisme biaisé chez les mères était de 13,5% (60/445) et de 27,9% (124/444), respectivement pour l'épithélium buccal et le sang. Pour ce même groupe d'âge, les incidences de mosaïcisme biaisé rapportées dans la littérature étaient comparables pour le sang (environ 16% à 40%)^{127,129,150,151,153} et pour l'épithélium buccal (11% avec un critère $\geq 80\%$)¹²⁹. Encore une fois, l'incidence de mosaïcisme biaisé est presque doublées dans le sang comparativement à l'épithélium buccal, ce qui sera discuté au chapitre 4.5.

4.3 Hérité

Une façon de vérifier si un trait, ici la détermination des ratios d'inactivation, est influencé par un gène, c'est d'évaluer s'il y a une transmission du trait. Nous avons d'abord vérifié si les mères qui présentaient un mosaïcisme biaisé avaient plus de chances que les femmes qui ne présentent pas de mosaïcisme biaisé de donner naissance à une fille qui présente aussi le trait. Les données du sang et de l'épithélium buccal ont montré qu'il n'y avait aucune augmentation de l'incidence de mosaïcisme biaisé chez les filles de mères biaisées, comparativement aux filles

de mères non-biaisées ($P=0,800$ pour le sang, $P=0,777$ pour l'épithélium buccal). De même, les filles biaisées n'ont pas plus de chances d'avoir une mère biaisée que les filles non-biaisées ($P=0,790$ sang, $P=0,592$ épithélium buccal). Ces données ne démontrent aucune transmission du trait. Afin d'éviter des erreurs dans le classement des femmes (mosaïcisme biaisé ou non-biaisé), les femmes ont été catégorisées biaisées lorsque leur degré de skewing (DS) était égal ou plus élevé que 0,25, et non-biaisées lorsque le DS était plus petit que 0,15, laissant une zone grise ($DS \geq 0,15$ à $< 0,25$).

Dans un autre espoir de démontrer la transmission du trait, nous avons vérifié s'il y avait une relation entre le ratio d'inactivation de la mère et celui de sa fille. À cette fin, nous avons utilisé comme valeurs de ratios d'inactivation le P_{mat} (pour les NN) et le P_{trans} (pour les mères). Le P_{mat} exprime la proportion de cellules qui possèdent comme chromosome actif le chromosome X maternel (donc reçu de la mère), alors que le P_{trans} exprime la proportion de cellules qui possèdent comme chromosome actif le chromosome X transmis (donc transmis à la fille). Ces valeurs nous permettent de comparer les ratios d'inactivation en faveur du chromosome partagé entre la mère et la fille. Les régressions linéaires ont montré qu'il n'y avait aucune relation entre la mère et la fille : les pentes sont pratiquement à 0 ($m=0,047$ pour le sang, $m=0,064$ pour l'épithélium buccal) et les corrélations de Pearson ont donné des coefficients de corrélation faibles et non-significatifs ($r=0,058$ et $P=0,272$ pour le sang, $r=0,074$ et $P=0,172$ pour l'épithélium buccal). Ces données démontrent qu'il n'y a pas de transmission du trait. Par contre, on pourrait penser que les pentes ne sont pas significativement positives entre une mère et sa fille à cause de la contribution du père qui ne peut être évaluée. Afin d'éliminer cette possibilité, nous avons réalisé une étude de puissance.

Une étude de puissance est un calcul qui, en se basant sur des paramètres comme le nombre d'échantillons et la déviation standard du trait, détermine quel niveau de pente serait considéré significativement différent de 0. Puisque dans une étude de transmission, l'hérédité (h^2) est évaluée à 2 fois la pente ($2b$)¹⁷¹, l'étude de puissance dans notre cas revient à déterminer quel niveau d'hérédité il est possible de détecter avec notre cohorte. Ainsi, avec nos données, il a été

déterminé que nous pourrions considérer significative une pente d'au minimum 0,13 (soit 26% d'hérédité). Cette valeur montre que la cohorte est suffisamment puissante pour détecter un trait entièrement génétique. Donc, nos résultats démontrent qu'il n'y a pas de transmission du mosaïcisme biaisé, ni du ratio d'inactivation, d'une mère à sa NN.

Pour cette analyse, il aurait été intéressant, quoique irréalisable, d'obtenir des échantillons de la mère alors qu'elle-même était naissante. Étant donné l'augmentation de mosaïcisme biaisé, le ratio d'inactivation d'une femme adulte ne représente pas exactement son ratio à la naissance. Néanmoins, l'étude longitudinale qu'a réalisée l'équipe de Sapienza a montré que les changements de ratio d'inactivation avec l'âge sont présents, mais ne sont pas drastiques chez une femme donnée¹⁵⁵. Dans ce contexte, l'augmentation de l'incidence de mosaïcisme biaisé est explicable en considérant que même un léger changement du ratio d'inactivation peut faire changer celui-ci de catégorie (de non-biaisé à biaisé), si la femme présentait au départ un ratio à la limite d'être biaisé. Ainsi, le ratio d'inactivation à l'âge adulte est assurément semblable, du moins dans la majorité des cas, à celui de la naissance. Donc, même si nous n'avons pas accès aux spécimens des mères lorsque celles-ci étaient naissantes, la corrélation mère-fille n'en demeure pas moins valide.

Dans un deuxième volet, nous avons cherché à déterminer s'il y avait, dans une région candidate, des polymorphismes situés suffisamment près du gène responsable du mosaïcisme biaisé néonatal pour y être en déséquilibre de liaison et donc, y être associés. Notre région candidate est évidemment la région du centre de l'inactivation du chromosome X (*XIC*). Le domaine *XIC* humain contient le gène *XIST*, effecteur de l'inactivation (résumé par ¹⁹). Nous avons choisi 5 polymorphismes de nucléotide simple (SNPs) situés de part et d'autre du gène *XIST*. Nous avons génotypé 154 NN pour ces SNPs. Lorsque analysés séparément, aucun de ces SNPs n'a montré d'association avec le mosaïcisme biaisé néonatal, tel que confirmé par les valeurs *P* non-significatives (résultats non-montrés). Néanmoins, afin d'augmenter la puissance de cette étude, nous avons testé l'association entre les haplotypes et le mosaïcisme biaisé néonatal. Les

haplotypes des NN ont été déterminés suite au génotypage de leur mère. L'haplotype évalue la combinaison des polymorphismes transmis ensembles, elle permet donc de suivre la transmission des blocs de recombinaison et par le fait même, d'évaluer une plus grande région d'ADN. Des 6 haplotypes qui ont été identifiés chez les NN, aucun n'a montré d'association avec le mosaïcisme biaisé, ni dans le sang, ni dans l'épithélium buccal. Cette analyse démontre qu'aucun des haplotypes communs de la région *XIST* n'est associé au trait. Il pourrait quand même exister d'autres haplotypes, plus rares, qui eux seraient impliqués dans la détermination du trait. Du moins, nous pouvons conclure qu'il n'y a pas de variation génétique dans la région de *XIST* contribuant à l'incidence élevée du mosaïcisme biaisé néonatal chez l'humain et donc que, fort probablement, il est possible de rejeter le gène *XIST* comme régulateur du choix du chromosome à inactiver. Cette analyse contraste avec celle de Plenge qui avait identifié un polymorphisme dans le promoteur du gène *XIST* favorisant de choix du chromosome à inactiver¹⁵⁹. L'explication la plus probable est que ce polymorphisme est rare¹⁶⁶ et qu'il n'explique pas la majorité des cas de mosaïcisme biaisé.

Chez la souris, les processus de comptage et de choix dans l'ICX ne sont pas encore très bien compris; par contre, il est connu qu'ils font intervenir en *cis* les gènes situés dans la région maîtresse *Xic*⁸³. En particulier, le locus *Xce* influence le choix du chromosome et provoque des ratios d'inactivation biaisés chez les souris hétérozygotes⁷⁰. L'hypothèse qu'un gène similaire puisse agir chez l'humain a été soulevée de nombreuses fois^{128,130,157}, sans jamais n'avoir été vérifiée dans le modèle le plus rapproché du mosaïcisme biaisé primaire murin, soit chez les NN. Chez l'humain, contrairement à la souris, les gènes de la région *XIC* potentiellement impliqués dans la régulation de *XIST* ne sont pas connus. Nos résultats ont démontré qu'il y avait une dissociation entre les ratios d'inactivation et le mosaïcisme biaisé d'une mère et ceux de sa fille, signifiant que ces traits ne seraient pas héréditaires. Également, aucun des polymorphismes de la région du gène *XIST* n'était associé au mosaïcisme biaisé néonatal, signifiant qu'il n'y aurait pas d'élément dans cette région influençant le choix du chromosome à inactiver. Il se pourrait donc que le choix du chromosome à inactiver se fasse

aléatoirement, comme on le croyait au départ¹, quoique nous ne puissions rejeter l'hypothèse d'une génétique complexe. Si plusieurs gènes agissent pour modifier le choix, il est possible que des recombinaisons nous empêchent de détecter une transmission. Néanmoins, ces résultats montrent le contraste entre l'humain et la souris, chez qui un ou quelques gènes importants en *cis* biaisent le choix du chromosome à inactiver^{70,172}.

4.4 Corrélations inter-tissus chez les NN

Nous avons mis en évidence dans cette étude que les ratios d'inactivation de 2 tissus différents (sang et épithélium buccal) concordaient à la naissance ($r=0,715$, $n=433$, $P<0,001$). Cette bonne concordance est illustrée par le fait que les tissus d'une même NN montrent toujours des ratios d'inactivation biaisés en faveur du même chromosome : si le biais est en faveur du chromosome X paternel dans le sang, il l'est aussi en faveur du chromosome X paternel dans l'épithélium buccal et vice-versa. Cette concordance sang vs épithélium buccal est plus élevée que ce qu'il a déjà été rapporté chez 2 groupes de femmes de 25 et 60 ans¹²⁹, supportant que les ratios d'inactivation à la naissance émergent d'un processus commun à tous les tissus, et non spécifiques à chaque tissu.

En tenant compte du fait que la détermination du chromosome à inactiver n'est pas contrôlée par un gène majeur chez l'humain (section 4.3), et que l'incidence de mosaïcisme biaisé n'est pas nulle à la naissance (entre 8 et 14%, section 4.2), la bonne concordance entre les tissus à la naissance signifie aussi que l'inactivation doit se produire tôt, avant l'engagement vers les différentes lignées cellulaires. En effet, si l'ICX se produisait plus tardivement, par exemple après le début de la différenciation cellulaire, il n'y aurait aucun argument pour expliquer que les ratios d'inactivation soient biaisés en faveur du même chromosome entre différents tissus, sachant que l'ICX est aléatoire. Puisque le sang et l'épithélium buccal proviennent de 2 couches embryonnaires différentes (du mésoderme pour le sang et de l'ectoderme pour l'épithélium buccal), ce résultat signifierait que l'ICX doit se

produire avant la ségrégation de ces tissus, soit avant la gastrulation, comme chez la souris.

D'autre part, plus l'inactivation se produirait tardivement, plus les chances de produire du mosaïcisme biaisé par hasard seraient nulles, si bien que compte tenu de l'incidence de mosaïcisme biaisé, l'ICX doit se produire relativement tôt. En se basant sur la méthode de simulation Monte Carlo, Monteiro et ses collaborateurs ont développé un calcul permettant d'estimer, à partir de l'incidence de mosaïcisme biaisé, le nombre de cellules présentes dans la masse de cellules internes (ICM) au moment où la décision du chromosome à inactiver est prise¹⁶⁷. En utilisant leurs résultats de simulation et nos incidences de mosaïcisme biaisé, nous estimons qu'il y aurait entre 6 et 24 cellules précurseurs dans l'ICM lors de l'engagement de l'ICX. Ainsi, l'ICX se produirait probablement chez l'humain aussi tôt, sinon plus tôt, que chez la souris. Dans cet organisme modèle, l'inactivation aléatoire est initiée tôt durant le développement, dans la masse de cellules internes (ICM) du blastocyste, à un stade où les tissus ne sont pas encore différenciés³⁴. Il est logique de penser que l'ICX doive se produire tôt, étant donné le rôle de ce mécanisme qui est de diminuer l'expression génique provenant des chromosomes X chez les femmes. Si l'ICX se produisait tardivement, les cellules de l'embryon femelle devraient supporter un dosage génique plus élevé que dans les cellules mâles pour une plus longue période de temps. Cependant, peut-être existe-t-il chez l'humain, comme chez la souris, une première inactivation qui est imprégnée et qui se produit peu de temps après la fécondation, soit environ au stade 4-cellules. Pour l'instant, n'ayant pas accès à des embryons humains, nous ne pouvons répondre à cette question.

Pour ajouter du poids aux corrélations inter-tissus chez les NN, il aurait été intéressant d'avoir accès à une multitude d'échantillons de tissus des NN, desquels nous aurions pu déterminer les ratios d'inactivation. Ces données auraient permis de confirmer que les ratios d'inactivation sont similaires à la naissance. Par contre, ces manipulations auraient exigé beaucoup de temps de laboratoire et des coûts plus élevés. De plus, nous avons considéré que cette initiative aurait été délicate pour les parents, qui auraient dû conserver d'autres

échantillons, comme un échantillon urinaire par exemple, à l'attention de notre recherche.

4.5 Évolution du mosaïcisme biaisé, de la fécondation à la vieillesse

Jusqu'à ce jour, il était connu que l'incidence de mosaïcisme biaisé augmentait avec l'âge dans le sang^{127,150,151}, mais que cet incidence ne semblait pas varier dans l'épithélium buccal entre 25 et 60 ans¹²⁹. Dans cette présente étude, nous avons une fois de plus montré que l'incidence de mosaïcisme biaisé augmentait dans le sang entre 0 et 28 ans, âge moyen des mères, (64/450 ou 14,2%, vs 124/444 ou 27,9%, $P < 0,001$); cependant, nous avons aussi montré, et ce pour la première fois, que cet incidence augmentait dans l'épithélium buccal entre ces mêmes groupes d'âge (33/436 ou 7,6%, vs 60/445 ou 13,5%, $P = 0,004$). Ce résultat est une première, puisque aucune autre étude n'a déjà évalué un autre tissu que le sang chez des NN. Le mosaïcisme biaisé augmente, pour les 2 tissus, d'un facteur de 2 entre la naissance et l'âge adulte, ce qui signifie qu'il est possible que ces 2 tissus puissent être sujets à une forme de mosaïcisme biaisé associé à l'âge durant cette période de vie.

Malgré l'augmentation de mosaïcisme biaisé, la corrélation inter-tissus chez les mères (moyenne d'âge 28 ans) demeure élevée ($r = 0,779$, $P < 0,001$, $n = 441$), ce qui nous laisse croire que cette forme de mosaïcisme biaisé associé à l'âge pourrait être commune à tous les tissus. Si les 2 tissus subissaient des pressions sélectives différentes, i.e. spécifiques à chaque tissu, rien ne justifierait une corrélation inter-tissus élevée à 28 ans. Afin de vérifier que ce mosaïcisme biaisé associé à l'âge est bien commun à tous les tissus de la naissance à 28 ans, il aurait été bien pour cette analyse aussi d'avoir des données pour d'autres tissus. Elles nous auraient permis de confirmer si l'incidence de mosaïcisme biaisé augmentait du même facteur, ainsi que de vérifier si la corrélation entre ces autres tissus est aussi élevée à 28 ans. Par contre, le taux de participation à notre étude

aurait risqué d'être beaucoup moins élevé si on avait demandé la permission d'obtenir d'autres spécimens des NN et des mères.

Pour expliquer ces données (augmentation de l'incidence de mosaïcisme biaisé entre la naissance et l'âge adulte pour les 2 tissus, mais corrélations inter-tissus élevées pour les 2 groupes d'âge), nous suggérons que tous les tissus durant le développement et l'enfance soient sujets à des sélections cellulaires sur la base du chromosome X exprimé, et que les gènes impliqués soient responsables de l'augmentation de la masse cellulaire et de la croissance cellulaire. En effet, il apparaît clair que la sélection doit être génétique, en ce sens où elle dépendrait des allèles portés par les 2 chromosomes X, et donc qu'un allèle favorable, ou au contraire défavorable, la dirige, ce qui expliquerait que les ratios d'inactivation soient biaisés en faveur du même chromosome dans 2 tissus d'une même femme. Par ailleurs, étant donné les corrélations inter-tissus élevées jusqu'à l'âge de 30 ans, il est essentiel que cette sélection puisse affecter tous les tissus également. Qu'ont en commun deux tissus dont les potentiels de division et les cycles cellulaires sont différents, tels le sang et l'épithélium buccal ? De la naissance à l'âge adulte, ils doivent augmenter en masse, en volume. Durant cette période, énormément de divisions cellulaires se produisent pour permettre à un individu d'acquérir près de 10 fois son volume. À cet effet, nous pensons que des gènes situés sur le chromosome X affectent la croissance cellulaire. Ainsi, dans tous les tissus, les cellules exprimant le chromosome X porteur des variants les plus favorables à cette croissance auraient un potentiel de division plus élevé, ce qui expliquerait le fait qu'elles deviennent de plus en plus importantes en proportion, par rapport à l'autre groupe de cellules qui expriment l'autre chromosome X.

Après avoir atteint l'âge adulte, un individu conserve généralement une masse stable. Ainsi, les sélections responsables du mosaïcisme biaisé avec l'âge (apparent jusqu'à l'âge adulte) devraient en théorie cesser d'avoir un effet aussi marqué. En réalité, c'est effectivement ce qui a été observé : dans l'épithélium buccal, l'incidence de mosaïcisme biaisé demeure stable entre 30 et 60 ans¹⁷³. Par contre, le tissu sanguin répond différemment. De l'âge de 30 ans jusqu'à la vieillesse, l'incidence de mosaïcisme biaisé continue son ascension^{127,153}.

Seulement, le sang est un des seuls tissus qui demeure, tout au long de la vie d'un individu, très actif mitotiquement. Le bassin des cellules sanguines circulant est constamment renouvelé, ce qui fait de ce tissu un bon sujet aux sélections cellulaires. À savoir si les sélections qui se poursuivent dans le sang après l'âge de 30 ans ne sont que la continuité de celles qui se sont produites avant ou si elles sont plutôt basées sur des gènes liés au chromosome X demeure pour l'instant une question sans réponse.

Une observation intéressante qui se dégage de nos données est que peu importe le groupe d'âge étudié, il est apparu évident que le sang était plus susceptible aux ratios d'inactivation biaisés : l'incidence de mosaïcisme biaisé est toujours plus élevée dans ce tissu que dans les autres tissus étudiés (nos données, et ¹²⁹). Possiblement que ce tissu, parce qu'il fait justement parti des tissus les plus actifs mitotiquement, soit plus susceptible aux sélections cellulaires.

Grâce à notre étude, nous pouvons tenter de répondre à une autre question : que se produit-il de la fécondation à la naissance ? Puisque nous sommes les premiers à étudier 2 tissus différents d'une cohorte de NN, nous pouvons tirer les premières conclusions à ce propos. Nous avons montré que même si les ratios d'inactivation de 2 tissus concordaient à la naissance ($r=0,715$, $n=433$, $P<0,001$), cette concordance n'était pas parfaite ($r<0,800$). De plus, nous avons mis en évidence que l'incidence de mosaïcisme biaisé augmentait significativement dans le sang des NN comparativement à l'épithélium buccal de ceux-ci ($P=0,002$). Nous suggérons, pour expliquer ce phénomène, que les pressions de sélection qui agissent après la naissance (discuté aux paragraphes précédents) soient effectives en fait avant la naissance, ce qui est logique étant donné l'importante croissance en masse d'un embryon avant qu'il ne devienne un fœtus prêt à naître.

Une question demeure : si ce mosaïcisme biaisé associé à l'âge, qui est observé entre de la fécondation et 28 ans, est causé par une sélection génétique, n'y aurait-il pas dû y avoir une influence de ce trait sur la transmission ? En effet, lors de l'étude de la transmission, nous avons, entre autres, comparé le ratio d'inactivation d'une mère à celui de sa fille et nous avons montré qu'il n'y avait

aucune corrélation à ce niveau. Cependant, un mosaïcisme biaisé secondaire et génétique aurait dû favoriser une corrélation mère-fille. Une explication à ce litige réside dans le fait qu'il est possible que la sélection soit multigénique. De ce point de vue, ce serait donc la combinaison des variants portés par un chromosome qui lui donneraient sa force, ou au contraire sa faiblesse, et qui dirigeraient la sélection. Cette hypothèse expliquerait que la sélection puisse être en faveur du même chromosome (le chromosome « fort »), mais qu'on ne détecte pas de transmission. Les gènes en question sont potentiellement dispersés à travers le chromosome X, ce qui augmente les chances de recombinaisons entre ces gènes. Les mères n'exprimeraient donc pas nécessairement la même combinaison de variants sur les chromosomes X qu'elles possèdent, comparativement au chromosome X qu'elles pourraient transmettre à leur fille.

Chapitre 5

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Vers le milieu des années 70, on croyait que seulement les femmes ayant un cancer monoclonal actif pouvait présenter un mosaïcisme biaisé de l'inactivation du chromosome X (ICX) dans le tissu en question, ou encore, seulement les femmes porteuses de mutations létales et liées au chromosome X pouvaient présenter un mosaïcisme biaisé dans tous leurs tissus. Par la suite, vers la fin des années 80, les méthodes d'analyse des ratios d'inactivation se sont améliorées, le nombre de femmes testées a été augmenté et le constat a changé : une grande proportion de femmes normales présente un mosaïcisme biaisé, particulièrement les femmes de plus de 60 ans, dans leur tissu sanguin.

Par quel mécanisme est produit ce mosaïcisme biaisé chez des femmes normales, ne présentant donc aucun cancer actif et ne possédant pas de mutations létales sur un de leurs chromosomes X ? Se pourrait-il que des gènes présents sur le chromosome X possèdent des variants qui favorisent (ou au contraire défavorisent) la croissance des cellules souches, ce qui au bout de plusieurs cycles de division, contribuerait à la dominance d'une population de cellules (qui expriment le chromosome X favorable) par rapport à l'autre ? Si tel est le cas, serait-il possible, éventuellement, de stimuler l'expression de ces gènes pour favoriser la croissance de cellules humaines en culture, lors de la greffe de moëlle osseuse, par exemple ?

C'est autour de ces questions que s'est bâtie, au cours des dernières années, l'étude de la dynamique des ratios d'inactivation du chromosome X avec l'âge chez les femmes normales. On a cherché à établir précisément comment évoluent les ratios d'inactivation (et par le fait même, les ratios d'inactivations biaisés) avec le temps chez une femme donnée, et quels mécanismes font évoluer ces ratios d'ICX, pour quelles raisons se biaisent-ils. L'hypothèse d'une sélection génétique pour expliquer les ratios d'inactivation qui tendent à se biaiser avec l'âge dans le

sang des femmes de plus de 30 ans a reçu beaucoup d'appuis (par les études réalisées sur des jumelles, les études d'héritabilité réalisées sur des grandes familles, etc.). Par contre, aucune étude n'a encore identifié le/les gène(s) en cause.

Seulement, il faut comprendre que le ratio d'inactivation d'une femme à un temps donné est la résultante de 2 influences : le mécanisme qui a déterminé son ratio d'inactivation au départ (i.e. ce qui a influencé le choix du chromosome à inactiver dans chacune des cellules de l'embryon), puis le mécanisme qui a fait fluctuer son ratio d'inactivation avec l'âge (i.e. ce qui a influencé la croissance relative des 2 populations de cellules). Ainsi, afin de bien poursuivre les études au sujet du mosaïcisme biaisé avec l'âge, il importe de connaître ce qui se passe au départ, au moment de l'inactivation du chromosome X durant le développement de l'embryon. Aucune étude, jusqu'à maintenant, ne s'était intéressée aux ratios d'inactivation à la naissance dans le but d'identifier le mécanisme qui détermine le ratio d'inactivation à cette période. Chez la souris, il est connu qu'un gène influence le choix du chromosome à inactiver. Si c'était le cas chez l'humain, d'identifier ce gène permettrait non seulement de mieux comprendre le processus de l'ICX, mais aussi de connaître ce qui cause des biais d'inactivation au départ. Par la suite, identifier les variants génétiques responsables permettrait d'épurer les données chez les femmes âgées et faciliter la recherche des gènes importants pour le mosaïcisme biaisé avec l'âge.

Nous avons donc conduit une étude épidémiogénétique, en procédant au recrutement de plus de 500 nouveau-nées filles et leur mère, pour lesquelles nous avons déterminé les ratios d'inactivation dans deux tissus, soit le sang et l'épithélium buccal.

Nous avons démontré que les ratios d'inactivation de deux tissus étaient très similaires chez une même nouveau-née, militant en faveur d'un mécanisme général déterminant les ratios d'inactivation du chromosome X durant le développement. Cependant, nous avons aussi démontré que les ratios d'inactivation n'étaient pas héréditaires, de même qu'aucune liaison n'existait entre

la région chromosomique du centre de l'ICX et le mosaïcisme biaisé, suggérant que le choix du chromosome à inactiver est plutôt aléatoire, ou du moins, n'est pas régulé par un gène ayant un pouvoir majeur, contrairement au modèle de la souris. Pour poursuivre ces études d'hérédité, il serait intéressant de prolonger les études de transmission et d'association, afin de solidifier encore plus les conclusions. Par exemple, il serait possible de déterminer les phénotypes à l'aide d'essais méthylation à différents loci, puis de répéter l'analyse de la transmission. De cette façon, une plus grande région du chromosome X pourrait être couverte et testée pour une liaison potentielle avec un gène causant un mosaïcisme biaisé primaire. Par ailleurs, d'autres marqueurs microsatellites pourraient être testés afin de couvrir une plus grande région du *XIC*.

Néanmoins, cette incapacité à trouver des variants génétiques impliqués dans la détermination du ration d'ICX à l'embryogénèse nous empêche donc de distinguer les deux traits, soit le mosaïcisme biaisé primaire (à l'embryogénèse) du mosaïcisme associé à l'âge (qui s'est produit avec le temps, suite à des changements de proportion des deux populations de cellules l'une par rapport à l'autre). Autrement dit, nous ne pouvons sonder une femme qui présente un mosaïcisme à l'âge de 60 ans pour des variants causant du mosaïcisme biaisé primaire et ainsi savoir si elle présentait un mosaïcisme biaisé dès la naissance, ou si elle l'a acquis avec l'âge.

Du moins, ce résultat permet de comparer les processus de l'ICX humain et murin et de constater une fois de plus la différence qui existe entre les 2 espèces. La régulation du gène *Xist* chez la souris se fait via des gènes qui ne semblent pas agir chez l'humain (*Tsix*, *Xite*, *Xce*). D'un point de vue évolutif, il semble y avoir une perte des contrôles de l'ICX chez l'humain : perte de l'inactivation imprégnée, plus grande échappée à l'ICX (15% contre peu de gènes chez la souris) et perte du choix du chromosome à inactiver. L'ICX est un processus qui aurait évolué des marsupiaux, chez qui le contrôle était beaucoup plus strict (le chromosome X paternel est toujours le chromosome choisi pour l'inactivation). Peut-être le besoin de contrôler le choix du X est-il moins grand chez les mammifères supérieurs ?

Le constat intéressant de cette étude demeure le suivant : de la naissance (et probablement depuis l'embryogénèse) à l'âge adulte, le degré de mosaïcisme biaisé augmente dans les deux tissus testés, mais la corrélation des ratios d'inactivation entre ces deux même tissus demeure élevée, suggérant qu'une pression de sélection agisse au niveau de tous les tissus, pour faire fluctuer les ratios d'inactivation. Cette pression est possiblement réalisée grâce à des gènes qui favorisent l'expansion tissulaire, puisqu'elle agirait au niveau de tous les tissus, mais qu'elle cesserait vers l'âge adulte, au moment où un individu cesse de grandir. Quels sont ces variants génétiques sur le chromosome X qui exercent une pression de sélection sur les cellules ? Dans quelle voie cellulaire agissent-ils ? Serait-il possible de stimuler l'expression de ces gènes pour permettre la reproduction d'organes humains en culture, avant une transplantation ?

Afin d'identifier les gènes qui causent ces biais de sélection, il serait intéressant de recruter des familles de jeunes sœurs (<30 ans). Cette cohorte permettrait de tester différents marqueurs microsatellites dispersés sur le chromosome X et de réaliser une étude de liaison (« linkage »).

En terminant, cette étude a fait un premier pas en observant comment évoluent les ratios d'inactivation de la naissance à l'âge adulte et en quelle proportion les femmes présentent du mosaïcisme biaisé à la naissance. Les prochaines étapes consistent maintenant à expliquer exactement comment ces phénomènes se produisent, en déterminant quels gènes et quelles voies cellulaires ils impliquent.

Bibliographie

- (1) Lyon MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse [*Mus musculus* L.]. *Nature* 190:372. *Nature*. 1961;190:372-373.
- (2) Migeon BR, Luo S, Stasiowski BA et al. Deficient transcription of XIST from tiny ring X chromosomes in females with severe phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:12025-12029.
- (3) Takagi N, Abe K. Detrimental effects of two active X chromosomes on early mouse development. *Development*. 1990;109:189-201.
- (4) Ohno S. Sex chromosomes and sex-linked genes. Berlin: Springer-Verlag; 1967.
- (5) Lahn BT, Pearson NM, Jegalian K. The human Y chromosome, in the light of evolution. *Nat Rev Genet*. 2001;2:207-216.
- (6) Burgoyne PS. Genetic homology and crossing over in the X and Y chromosomes of Mammals. *Hum Genet*. 1982;61:85-90.
- (7) Lahn BT, Page DC. Functional coherence of the human Y chromosome. *Science*. 1997;278:675-680.
- (8) Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ et al. The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature*. 2005;434:325-337.
- (9) Marin I, Siegal ML, Baker BS. The evolution of dosage-compensation mechanisms. *Bioessays*. 2000;22:1106-1114.
- (10) Lyon MF. Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome. *Am J Hum Genet*. 1962;14:135-148.
- (11) Ohno S, HAUSCHKA TS. Allocycly of the X-chromosome in tumors and normal tissues. *Cancer Res*. 1960;20:541-545.
- (12) Ohno S, MAKINO S. The single-X nature of sex chromatin in man. *Lancet*. 1961;1:78-79.
- (13) Lee JT, Jaenisch R. The (epi)genetic control of mammalian X-chromosome inactivation. *Curr Opin Genet Dev*. 1997;7:274-280.
- (14) Solter D, Wei G. Ends Xist, but where are the beginnings? *Genes Dev*. 1997;11:153-155.
- (15) Takagi N, Sasaki M. Preferential inactivation of the paternally derived X chromosome in the extraembryonic membranes of the mouse. *Nature*. 1975;256:640-642.

- (16) Latham KE. X chromosome imprinting and inactivation in the early mammalian embryo. *Trends Genet.* 1996;12:134-138.
- (17) Graves JA. Mammals that break the rules: genetics of marsupials and monotremes. *Annu Rev Genet.* 1996;30:233-260.
- (18) Takagi N, Wake N, Sasaki M. Cytologic evidence for preferential inactivation of the paternally derived X chromosome in XX mouse blastocysts. *Cytogenet Cell Genet.* 1978;20:240-248.
- (19) Chow JC, Yen Z, Ziesche SM, Brown CJ. Silencing of the Mammalian X Chromosome. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2005.
- (20) Harrison KB. X-chromosome inactivation in the human cytotrophoblast. *Cytogenet Cell Genet.* 1989;52:37-41.
- (21) Harrison KB, Warburton D. Preferential X-chromosome activity in human female placental tissues. *Cytogenet Cell Genet.* 1986;41:163-168.
- (22) Goto T, Wright E, Monk M. Paternal X-chromosome inactivation in human trophoblastic cells. *Mol Hum Reprod.* 1997;3:77-80.
- (23) Migeon BR, Do TT. In search of non-random X inactivation: studies of fetal membranes heterozygous for glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Am J Hum Genet.* 1979;31:581-585.
- (24) Bamforth F, Machin G, Innes M. X-chromosome inactivation is mostly random in placental tissues of female monozygotic twins and triplets. *Am J Med Genet.* 1996;61:209-215.
- (25) Uehara S, Tamura M, Nata M et al. X-chromosome inactivation in the human trophoblast of early pregnancy. *J Hum Genet.* 2000;45:119-126.
- (26) Zeng SM, Yankowitz J. X-inactivation patterns in human embryonic and extra-embryonic tissues. *Placenta.* 2003;24:270-275.
- (27) Avner P, Heard E. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet.* 2001;2:59-67.
- (28) Epstein CJ, Smith S, Travis B, Tucker G. Both X chromosomes function before visible X-chromosome inactivation in female mouse embryos. *Nature.* 1978;274:500-503.
- (29) Tan SS, Williams EA, Tam PP. X-chromosome inactivation occurs at different times in different tissues of the post-implantation mouse embryo [published erratum appears in *Nat Genet* 1993 Jul;4(3):320]. *Nat Genet.* 1993;3:170-174.
- (30) Cheng MK, Disteché CM. Silence of the fathers: early X inactivation. *Bioessays.* 2004;26:821-824.

- (31) Heard E, Clerc P, Avner P. X-chromosome inactivation in mammals. *Annu Rev Genet.* 1997;31:571-610.
- (32) Monesi V, Geremia R, D'Agostino A, Boitani C. Biochemistry of male germ cell differentiation in mammals: RNA synthesis in meiotic and postmeiotic cells. *Curr Top Dev Biol.* 1978;12:11-36.
- (33) Huynh KD, Lee JT. Inheritance of a pre-inactivated paternal X chromosome in early mouse embryos. *Nature.* 2003;426:857-862.
- (34) Okamoto I, Otte AP, Allis CD, Reinberg D, Heard E. Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science.* 2004;303:644-649.
- (35) Mak W, Nesterova TB, de Napoles M et al. Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos. *Science.* 2004;303:666-669.
- (36) Keohane AM, O'Neill LP, Belyaev ND, Lavender JS, Turner BM. X-Inactivation and histone H4 acetylation in embryonic stem cells. *Dev Biol.* 1996;180:618-630.
- (37) Rastan S, Brown SD. The search for the mouse X-chromosome inactivation centre. *Genet Res.* 1990;56:99-106.
- (38) Rastan S, Robertson EJ. X-chromosome deletions in embryo-derived (EK) cell lines associated with lack of X-chromosome inactivation. *J Embryol Exp Morphol.* 1985;90:379-388.
- (39) Latham KE. X chromosome imprinting and inactivation in preimplantation mammalian embryos. *Trends Genet.* 2005;21:120-127.
- (40) Brockdorff N, Ashworth A, Kay GF et al. Conservation of position and exclusive expression of mouse *Xist* from the inactive X chromosome. *Nature.* 1991;351:329-331.
- (41) Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL et al. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature.* 1991;349:38-44.
- (42) Lee JT, Davidow LS, Warshawsky D. Tsix, a gene antisense to *Xist* at the X-inactivation centre [see comments]. *Nat Genet.* 1999;21:400-404.
- (43) Borsani G, Tonlrenzi R, Simmler MC et al. Characterization of a murine gene expressed from the inactive X chromosome. *Nature.* 1991;351:325-329.
- (44) Brockdorff N, Ashworth A, Kay GF et al. The product of the mouse *Xist* gene is a 15 kb inactive X-specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus. *Cell.* 1992;71:515-526.

- (45) Nesterova TB, Slobodyanyuk SY, Elisaphenko EA et al. Characterization of the genomic *Xist* locus in rodents reveals conservation of overall gene structure and tandem repeats but rapid evolution of unique sequence. *Genome Res.* 2001;11:833-849.
- (46) Clemson CM, McNeil JA, Willard HF, Lawrence JB. XIST RNA paints the inactive X chromosome at interphase: evidence for a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure. *J Cell Biol.* 1996;132:259-275.
- (47) Wutz A, Jaenisch R. A shift from reversible to irreversible X inactivation is triggered during ES cell differentiation. *Mol Cell.* 2000;5:695-705.
- (48) Penny GD, Kay GF, Sheardown SA, Rastan S, Brockdorff N. Requirement for *Xist* in X chromosome inactivation. *Nature.* 1996;379:131-137.
- (49) Marahrens Y, Panning B, Dausman J, Strauss W, Jaenisch R. *Xist*-deficient mice are defective in dosage compensation but not spermatogenesis. *Genes Dev.* 1997;11:156-166.
- (50) Panning B, Dausman J, Jaenisch R. X chromosome inactivation is mediated by *Xist* RNA stabilization. *Cell.* 1997;90:907-916.
- (51) Sheardown SA, Duthie SM, Johnston CM et al. Stabilization of *Xist* RNA mediates initiation of X chromosome inactivation [see comments]. *Cell.* 1997;91:99-107.
- (52) Brockdorff N. X-chromosome inactivation: closing in on proteins that bind *Xist* RNA. *Trends Genet.* 2002;18:352-358.
- (53) Kay GF, Penny GD, Patel D et al. Expression of *Xist* during mouse development suggests a role in the initiation of X chromosome inactivation. *Cell.* 1993;72:171-182.
- (54) Lee JT, Lu N, Han Y. Genetic analysis of the mouse X inactivation center defines an 80-kb multifunction domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:3836-3841.
- (55) Clerc P, Avner P. Role of the region 3' to *Xist* exon 6 in the counting process of X- chromosome inactivation [see comments]. *Nat Genet.* 1998;19:249-253.
- (56) Sado T, Wang Z, Sasaki H, Li E. Regulation of imprinted X-chromosome inactivation in mice by *Tsix*. *Development.* 2001;128:1275-1286.
- (57) Shibata S, Lee JT. Characterization and quantitation of differential *Tsix* transcripts: implications for *Tsix* function. *Hum Mol Genet.* 2003;12:125-136.
- (58) Mise N, Goto Y, Nakajima N, Takagi N. Molecular cloning of antisense transcripts of the mouse *Xist* gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;258:537-541.

- (59) Lee JT, Lu N. Targeted mutagenesis of Tsix leads to nonrandom X inactivation. *Cell*. 1999;99:47-57.
- (60) Lee JT. Disruption of imprinted X inactivation by parent-of-origin effects at Tsix [In Process Citation]. *Cell*. 2000;103:17-27.
- (61) Luikenhuis S, Wutz A, Jaenisch R. Antisense transcription through the Xist locus mediates Tsix function in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*. 2001;21:8512-8520.
- (62) Shibata S, Lee JT. Tsix transcription- versus RNA-based mechanisms in Xist repression and epigenetic choice. *Curr Biol*. 2004;14:1747-1754.
- (63) Navarro P, Pichard S, Ciaudo C, Avner P, Rougeulle C. Tsix transcription across the Xist gene alters chromatin conformation without affecting Xist transcription: implications for X-chromosome inactivation. *Genes Dev*. 2005;19:1474-1484.
- (64) Migeon BR, Chowdhury AK, Dunston JA, McIntosh I. Identification of TSIX, Encoding an RNA Antisense to Human XIST, Reveals Differences from its Murine Counterpart: Implications for X Inactivation. *Am J Hum Genet*. 2001;69:951-960.
- (65) Migeon BR, Lee CH, Chowdhury AK, Carpenter H. Species Differences in TSIX/Tsix Genes Reveal the Roles of These Genes in X-Chromosome Inactivation. *Am J Hum Genet*. 2002;71.
- (66) Migeon BR, Wolf SF, Axelman J, Kaslow DC, Schmidt M. Incomplete X chromosome dosage compensation in chorionic villi of human placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82:3390-3394.
- (67) Cattanach BM, Williams CE. Evidence of non-random X chromosome activity in the mouse. *Genet Res*. 1972;19:229-240.
- (68) Johnston PG, Cattanach BM. Controlling elements in the mouse. IV. Evidence of non-random X- inactivation. *Genet Res*. 1981;37:151-160.
- (69) Rastan S. Primary non-random X-inactivation caused by controlling elements in the mouse demonstrated at the cellular level. *Genet Res*. 1982;40:139-147.
- (70) Cattanach BM, Isaacson JH. Controlling elements in the mouse X chromosome. *Genetics*. 1967;57:331-346.
- (71) West JD, Chapman VM. Variation for X chromosome expression in mice detected by electrophoresis of phosphoglycerate kinase. *Genet Res*. 1978;32:91-102.
- (72) Simmler MC, Cattanach BM, Rasberry C, Rougeulle C, Avner P. Mapping the murine *Xce* locus with (CA)_n repeats. *Mamm Genome*. 1993;4:523-530.

- (73) Courtier B, Heard E, Avner P. Xce haplotypes show modified methylation in a region of the active X chromosome lying 3' to Xist. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:3531-3535.
- (74) Ogawa Y, Lee JT. Xite, X-Inactivation Intergenic Transcription Elements that Regulate the Probability of Choice. *Mol Cell*. 2003;11:731-743.
- (75) Lee JT. Functional intergenic transcription: a case study of the X-inactivation centre. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2003;358:1417-1423.
- (76) Prissette M, El Maarri O, Arnaud D, Walter J, Avner P. Methylation profiles of DXPas34 during the onset of X-inactivation. *Hum Mol Genet*. 2001;10:31-38.
- (77) Debrand E, Chureau C, Arnaud D, Avner P, Heard E. Functional analysis of the DXPas34 locus, a 3' regulator of Xist expression. *Mol Cell Biol*. 1999;19:8513-8525.
- (78) Chao W, Huynh KD, Spencer RJ, Davidow LS, Lee JT. CTCF, a candidate trans-acting factor for X-inactivation choice. *Science*. 2002;295:345-347.
- (79) Bell AC, West AG, Felsenfeld G. The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell*. 1999;98:387-396.
- (80) Hark AT, Schoenherr CJ, Katz DJ et al. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature*. 2000;405:486-489.
- (81) Pugacheva EM, Tiwari VK, Abdullaev Z et al. Familial cases of point mutations in the XIST promoter reveal a correlation between CTCF binding and pre-emptive choices of X chromosome inactivation. *Hum Mol Genet*. 2005;14:953-965.
- (82) Plath K, Mlynarczyk-Evans S, Nusinow DA, Panning B. Xist RNA and the mechanism of x chromosome inactivation. *Annu Rev Genet*. 2002;36:233-278.
- (83) Heard E. Recent advances in X-chromosome inactivation. *Curr Opin Cell Biol*. 2004;16:247-255.
- (84) Lee TI, Young RA. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet*. 2000;34:77-137.
- (85) Heard E, Rougeulle C, Arnaud D et al. Methylation of histone H3 at Lys-9 is an early mark on the X chromosome during X inactivation. *Cell*. 2001;107:727-738.
- (86) Mermoud JE, Popova B, Peters AH, Jenuwein T, Brockdorff N. Histone H3 lysine 9 methylation occurs rapidly at the onset of random X chromosome inactivation. *Curr Biol*. 2002;12:247-251.

- (87) Chaumeil J, Okamoto I, Guggiari M, Heard E. Integrated kinetics of X chromosome inactivation in differentiating embryonic stem cells. *Cytogenet Genome Res.* 2002;99:75-84.
- (88) Silva J, Mak W, Zvetkova I et al. Establishment of histone h3 methylation on the inactive x chromosome requires transient recruitment of eed-enx1 polycomb group complexes. *Dev Cell.* 2003;4:481-495.
- (89) Plath K, Fang J, Mlynarczyk-Evans SK et al. Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science.* 2003;300:131-135.
- (90) Mermoud JE, Costanzi C, Pehrson JR, Brockdorff N. Histone macroH2A1.2 relocates to the inactive X chromosome after initiation and propagation of X-inactivation. *J Cell Biol.* 1999;147:1399-1408.
- (91) Lock LF, Takagi N, Martin GR. Methylation of the Hprt gene on the inactive X occurs after chromosome inactivation. *Cell.* 1987;48:39-46.
- (92) de Napoles M, Mermoud JE, Wakao R et al. Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev Cell.* 2004;7:663-676.
- (93) Barr ML, Bertram EG. A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behavior of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature.* 1949;163:676.
- (94) Takagi N. Differentiation of X chromosomes in early female mouse embryos. *Exp Cell Res.* 1974;86:127-135.
- (95) Robinson ES, Samollow PB, VandeBerg JL, Johnston PG. X-chromosome replication patterns in adult, newborn and prenatal opossums. *Reprod Fertil Dev.* 1994;6:533-540.
- (96) Huynh KD, Lee JT. A continuity of X-chromosome silence from gamete to zygote. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2004;69:103-112.
- (97) Carrel L, Cottle AA, Goglin KC, Willard HF. A first-generation X-inactivation profile of the human X chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:14440-14444.
- (98) Carrel L, Willard HF. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature.* 2005;434:400-404.
- (99) Carrel L, Willard HF. Heterogeneous gene expression from the inactive X chromosome: an X-linked gene that escapes X inactivation in some human cell lines but is inactivated in others. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:7364-7369.
- (100) Anderson CL, Brown CJ. Polymorphic X-chromosome inactivation of the human TIMP1 gene. *Am J Hum Genet.* 1999;65:699-708.

- (101) Nesbitt MN. X-chromosome inactivation mosaicism in the mouse. *Dev Biol.* 1971;26:252-263.
- (102) Novelli M, Cossu A, Oukrif D et al. X-inactivation patch size in human female tissue confounds the assessment of tumor clonality. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:3311-3314.
- (103) Nesbitt MN. Chimeras vs X inactivation mosaics: significance of differences in pigment distribution. *Dev Biol.* 1974;38:202-207.
- (104) Gunter C. Genome biology: she moves in mysterious ways. *Nature.* 2005;434:279-280.
- (105) Happle R, Frosch PJ. Manifestation of the lines of Blaschko in women heterozygous for X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Clin Genet.* 1985;27:468-471.
- (106) Chung IM, Schwartz SM, Murry CE. Clonal architecture of normal and atherosclerotic aorta: implications for atherogenesis and vascular development. *Am J Pathol.* 1998;152:913-923.
- (107) Traupe H. Functional X-chromosomal mosaicism of the skin: Rudolf Happle and the lines of Alfred Blaschko. *Am J Med Genet.* 1999;85:324-329.
- (108) Beutler E, Yeh M, Fairbanks VF. The normal human female as a mosaic of X-chromosome activity: Studies using the gene for G-6-PD deficiency as a marker. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1962;48:9.
- (109) Linder D, Gartler SM. Glucose-6-phosphate dehydrogenase mosaicism: utilization as a cell marker in the study of leiomyomas. *Science.* 1965;150:67-69.
- (110) Fialkow PJ, Klein E, Klein G, Clifford P, Singh S. Immunoglobulin and glucose-6-phosphate dehydrogenase as markers of cellular origin in Burkitt lymphoma. *J Exp Med.* 1973;138:89-102.
- (111) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Feinberg AP. Use of restriction fragment length polymorphisms to determine the clonal origin of human tumors. *Science.* 1985;227:642-645.
- (112) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR et al. Clonal analysis using recombinant DNA probes from the X-chromosome. *Cancer Res.* 1987;47:4806-4813.
- (113) Abrahamson G, Fraser NJ, Boyd J, Craig I, Wainscoat JS. A highly informative X-chromosome probe, M27 beta, can be used for the determination of tumour clonality. *Br J Haematol.* 1990;74:371-372.
- (114) Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human

androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet.* 1992;51:1229-1239.

- (115) La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck KH. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature.* 1991;352:77-79.
- (116) Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics.* 1992;12:241-253.
- (117) Beutler E, Kuhl W. The NT 1311 polymorphism of G6PD: G6PD Mediterranean mutation may have originated independently in Europe and Asia. *Am J Hum Genet.* 1990;47:1008-1012.
- (118) Bunge S, Steglich C, Zuther C et al. Iduronate-2-sulfatase gene mutations in 16 patients with mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). *Hum Mol Genet.* 1993;2:1871-1875.
- (119) Luhovy M, Liu Y, Belickova M, Prchal JF, Prchal JT. A novel clonality assay based on transcriptional polymorphism of X chromosome gene p55. *Biol Blood Marrow Transplant.* 1995;1:81-87.
- (120) Gale RE, Wheadon H, Linch DC. Assessment of X-chromosome inactivation patterns using the hypervariable probe M27 beta in normal hemopoietic cells and acute myeloid leukemic blasts. *Leukemia.* 1992;6:649-655.
- (121) Hodges E, Howell WM, Boyd Y, Smith JL. Variable X-chromosome DNA methylation patterns detected with probe M27 beta in a series of lymphoid and myeloid malignancies. *Br J Haematol.* 1991;77:315-322.
- (122) Busque L, Zhu J, DeHart D et al. An expression based clonality assay at the human androgen receptor locus (HUMARA) on chromosome X. *Nucleic Acids Res.* 1994;22:697-698.
- (123) Harrison CN, Gale RE, Linch DC. Quantification of X-chromosome inactivation patterns using RT-PCR of the polymorphic iduronate-2-sulphatase gene and correlation of the results obtained with DNA-based techniques. *Leukemia.* 1998;12:1834-1839.
- (124) el Kassir N, Hetet G, Briere J, Grandchamp B. X-chromosome inactivation in healthy females: incidence of excessive lyonization with age and comparison of assays involving DNA methylation and transcript polymorphisms. *Clin Chem.* 1998;44:61-67.
- (125) Gale RE, Wheadon H, Linch DC. X-chromosome inactivation patterns using *HPRT* and *PGK* polymorphisms in haematologically normal and post-chemotherapy females. *Br J Haematol.* 1991;79:193-197.

- (126) Allen RC, Nachtman RG, Rosenblatt HM, Belmont JW. Application of carrier testing to genetic counseling for X-linked agammaglobulinemia. *Am J Hum Genet.* 1994;54:25-35.
- (127) Busque L, Mio R, Mattioli J et al. Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: lyonization ratios vary with age. *Blood.* 1996;88:59-65.
- (128) Naumova AK, Olien L, Bird LM et al. Genetic mapping of X-linked loci involved in skewing of X chromosome inactivation in the human. *Eur J Hum Genet.* 1998;6:552-562.
- (129) Sharp A, Robinson D, Jacobs P. Age- and tissue-specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women. *Hum Genet.* 2000;107:343-349.
- (130) Pegoraro E, Whitaker J, Mowery-Rushton P et al. Familial skewed X inactivation: a molecular trait associated with high spontaneous-abortion rate maps to Xq28. *Am J Hum Genet.* 1997;61:160-170.
- (131) Fialkow PJ, Gartler SM, Yoshida A. Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1967;58:1468-1471.
- (132) Beutler E, Collins Z, Irwin LE. Value of genetic variants of glucose-6-phosphate dehydrogenase in tracing the origin of malignant tumors. *N Engl J Med.* 1967;276:389-391.
- (133) Knudson AG, Jr. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res.* 1985;45:1437-1443.
- (134) Fialkow PJ. Human tumors studied with genetic markers. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1976;12:123-132.
- (135) Wainscoat JS, Fey MF. Assessment of clonality in human tumors: a review. *Cancer Res.* 1990;50:1355-1360.
- (136) Busque L, Gilliland DG. X-inactivation analysis in the 1990s: promise and potential problems. *Leukemia.* 1998;12:128-135.
- (137) Fey MF, Peter HJ, Hinds HL et al. Clonal analysis of human tumors with M27 beta, a highly informative polymorphic X chromosomal probe. *J Clin Invest.* 1992;89:1438-1444.
- (138) Puck JM, Willard HF. X inactivation in females with X-linked disease. *N Engl J Med.* 1998;338:325-328.
- (139) Lyon MF. X-chromosome inactivation and human genetic disease. *Acta Paediatr Suppl.* 2002;91:107-112.
- (140) Valleix S, Vinciguerra C, Lavergne JM et al. Skewed X-chromosome inactivation in monozygotic diamniotic twin sisters results in severe and mild hemophilia A. *Blood.* 2002;100:3034-3036.

- (141) Harris A, Collins J, Vetrie D, Cole C, Bobrow M. X inactivation as a mechanism of selection against lethal alleles: further investigation of incontinentia pigmenti and X linked lymphoproliferative disease. *J Med Genet.* 1992;29:608-614.
- (142) Kirchgessner CU, Warren ST, Willard HF. X inactivation of the FMR1 fragile X mental retardation gene. *J Med Genet.* 1995;32:925-929.
- (143) Azofeifa J, Voit T, Hubner C, Cremer M. X-chromosome methylation in manifesting and healthy carriers of dystrophinopathies: concordance of activation ratios among first degree female relatives and skewed inactivation as cause of the affected phenotypes. *Hum Genet.* 1995;96:167-176.
- (144) Fearon ER, Kohn DB, Winkelstein JA, Vogelstein B, Blaese RM. Carrier detection in the Wiskott Aldrich syndrome. *Blood.* 1988;72:1735-1739.
- (145) Hakoda M, Hirai Y, Akiyama M et al. Selection against blood cells deficient in hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) in Lesch-Nyhan heterozygotes occurs at the level of multipotent stem cells. *Hum Genet.* 1995;96:674-680.
- (146) Parolini O, Ressmann G, Haas OA et al. X-linked Wiskott-Aldrich syndrome in a girl. *N Engl J Med.* 1998;338:291-295.
- (147) De Gregorio L, Nyhan WL, Serafin E, Chamoles NA. An unexpected affected female patient in a classical Lesch-Nyhan family. *Mol Genet Metab.* 2000;69:263-268.
- (148) Gale RE, Wheadon H, Boulos P, Linch DC. Tissue specificity of X-chromosome inactivation patterns. *Blood.* 1994;83:2899-2905.
- (149) Azofeifa J, Waldherr R, Cremer M. X-chromosome methylation ratios as indicators of chromosomal activity: evidence of intraindividual divergencies among tissues of different embryonal origin. *Hum Genet.* 1996;97:330-333.
- (150) Gale RE, Fielding AK, Harrison CN, Linch DC. Acquired skewing of X-chromosome inactivation patterns in myeloid cells of the elderly suggests stochastic clonal loss with age. *Br J Haematol.* 1997;98:512-519.
- (151) Tonon L, Bergamaschi G, Dellavecchia C et al. Unbalanced X-chromosome inactivation in haemopoietic cells from normal women. *Br J Haematol.* 1998;102:996-1003.
- (152) Christensen K, Kristiansen M, Hagen-Larsen H et al. X-linked genetic factors regulate hematopoietic stem-cell kinetics in females. *Blood.* 2000;95:2449-2451.
- (153) Hatakeyama C, Anderson CL, Beever CL et al. The dynamics of X-inactivation skewing as women age. *Clin Genet.* 2004;66:327-332.

- (154) Kristiansen M, Knudsen GP, Bathum L et al. Twin study of genetic and aging effects on X chromosome inactivation. *Eur J Hum Genet.* 2005;13:599-606.
- (155) Sandovici I, Naumova AK, Leppert M, Linares Y, Sapienza C. A longitudinal study of X-inactivation ratio in human females. *Hum Genet.* 2004;115:387-392.
- (156) Abkowitz JL, Taboada M, Shelton GH et al. An X chromosome gene regulates hematopoietic stem cell kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:3862-3866.
- (157) Naumova AK, Plenge RM, Bird LM et al. Heritability of X chromosome--inactivation phenotype in a large family. *Am J Hum Genet.* 1996;58:1111-1119.
- (158) Vickers MA, McLeod E, Spector TD, Wilson IJ. Assessment of mechanism of acquired skewed X inactivation by analysis of twins. *Blood.* 2001;97:1274-1281.
- (159) Plenge RM, Hendrich BD, Schwartz C et al. A promoter mutation in the XIST gene in two unrelated families with skewed X-chromosome inactivation. *Nat Genet.* 1997;17:353-356.
- (160) Bicocchi MP, Migeon BR, Pasino M et al. Familial nonrandom inactivation linked to the X inactivation centre in heterozygotes manifesting haemophilia A. *Eur J Hum Genet.* 2005;13:635-640.
- (161) Zabel BU, Baumann WA, Pirntke W, Gerhard-Ratschow K. X-inactivation pattern in three cases of X/autosome translocation. *Am J Med Genet.* 1978;1:309-317.
- (162) Lau AW, Brown CJ, Penaherrera M et al. Skewed X-chromosome inactivation is common in fetuses or newborns associated with confined placental mosaicism. *Am J Hum Genet.* 1997;61:1353-1361.
- (163) Young NS. The problem of clonality in aplastic anemia: Dr Dameshek's riddle, restated. *Blood.* 1992;79:1385-1392.
- (164) Cattanaach BM. Control of chromosome inactivation. *Annu Rev Genet.* 1975;9:1-18.
- (165) Tomkins DJ, McDonald HL, Farrell SA, Brown CJ. Lack of expression of XIST from a small ring X chromosome containing the XIST locus in a girl with short stature, facial dysmorphism and developmental delay. *Eur J Hum Genet.* 2002;10:44-51.
- (166) Pereira LV, Zatz M. Screening of the C43G mutation in the promoter region of the XIST gene in females with highly skewed X-chromosome inactivation. *Am J Med Genet.* 1999;87:86-87.

- (167) Monteiro J, Derom C, Vlietinck R et al. Commitment to X inactivation precedes the twinning event in monozygotic MZ twins. *Am J Hum Genet.* 1998;63:339-346.
- (168) Derom R, Derom C, Vlietinck R. Placentation. In: Keith LG, Papiernik E, Keith DM, Luke B, eds. *Multiple pregnancy: epidemiology, gestation and perinatal outcome.* New York: Parthenon Publishing; 1995:113-128.
- (169) Belmont JW. Genetic control of X inactivation and processes leading to X-inactivation skewing. *Am J Hum Genet.* 1996;58:1101-1108.
- (170) Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet.* 1986;1:307-310.
- (171) Hedrick PW. Quantitative traits and evolution. *Genetics of population.* Jones and Barlett; 2000:463-480.
- (172) Chadwick LH, Pertz L, Broman KW, Bartolomei MS, Willard HF. Genetic control of X chromosome inactivation in mice: definition of the Xce candidate interval. *Genetics.* 2006.
- (173) Busque L, Mio R, Provost S et al. The age-associated skewing of X-inactivation ratios of blood cells: an heritable trait acting at the stem cell level. [abstract]. *Blood.* 2003;102:568a.

Annexe I

Calcul pour déterminer le ratio d'ICX à partir de l'aire sous la courbe des échantillons amplifiés par PCR

1- Données

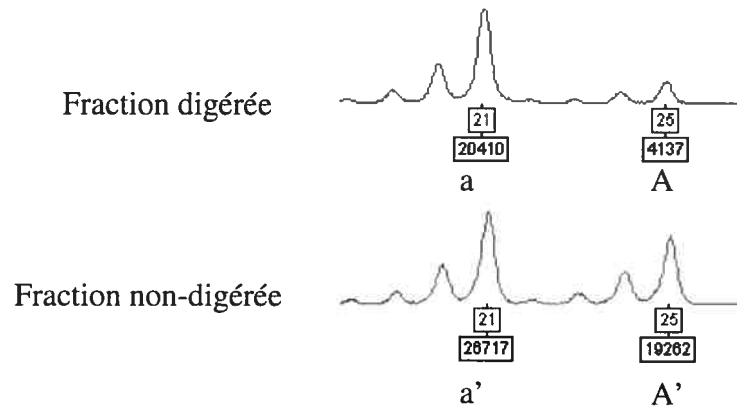


Figure 8. Amplification par PCR du gène HUMARA. Exemple des fractions digérées et non-digérées provenant d'un même échantillon et amplifiées par PCR, migrées sur l'analyseur génétique 3100, puis analysées par Genotyper. Les chiffres 21 et 25 désignent les allèles selon le nombre de répétitions CAG qu'elles contiennent. Le 2^e chiffre représente l'aire sous la courbe, qui est utilisé dans les formules pour déterminer le ratio d'inactivation.

2- Formules

$$P_{\text{sup}} = 1 - \left(\frac{\frac{(A/A+a)}{(A'/A'+a')}}{\frac{(A/A+a)}{(A'/A'+a')} + \frac{(a/A+a)}{(a'/A'+a')}} \right)$$

(Où A représente l'aire sous la courbe de l'allèle supérieur HUMARA, provenant de la fraction digérée, telle que quantifiée par Genotyper. A' représente la même valeur que A, mais pour la fraction non-digérée. a et a' représentent les aires sous les courbes de l'allèle inférieur, pour les fractions digérées et non-digérées respectivement (voir Figure 8))

L'amplification d'une région répétitive par la Taq polymérase résulte en la présence d'un certain montant de sous-produits de PCR, plus petits que le produit majeur et distancés les uns des autres du nombre de bases que contient une répétition (par exemple de 3pb au locus HUMARA). Ces sous-produits, appelés « shadow bands » (littéralement « bandes silhouettes »), seraient probablement causés par le glissement de la polymérase durant l'amplification (Murray 93). Par conséquent, lorsque 2 allèles HUMARA ne sont distancés que par 1 ou 2 répétitions, le shadow band de l'allèle supérieur augmente l'aire sous la courbe de l'allèle

inférieur, faussant ainsi la quantification. Pour corriger cet effet, un pourcentage de l'allèle supérieur a été soustrait de l'allèle inférieur dans tous les échantillons où les allèles n'étaient séparés que par 1 ou 2 répétitions. Le pourcentage à soustraire a été calculé à partir d'échantillons homozygotes, ou d'échantillons dans lesquels la différence entre les allèles était supérieure à 5 répétitions. Puisque le shadow bandig est proportionnel au nombre de répétitions (Lai 03), le pourcentage à soustraire varie selon le nombre de répétitions.

P_{mat} et **P_{trans}** sont calculés comme P_{sup}, où A représente l'allèle partagée entre une mère et sa fille.

$$DS = |P_{sup} - 0,5|$$



Handwritten text at the bottom right of the page, possibly a signature or date.