UNIVERSITE DE NANTES FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE 2010

 $N^{\circ} 20$

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu devant le jury interrégional Le 28 avril 2010 par **Sébastien Ginguené**

Conformément aux dispositions du décret Du 23 janvier 2003 tient lieu de :

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Étude du gène *SHOX* et de la région PAR1 sur une cohorte de 125 patients avec retard de croissance

Président : M. Jean-Marie Bard, Professeur de Biochimie – Pharmacie

Membres du Jury : M. Stéphane Bézieau, Professeur de Génétique – Médecine Mme. Sabine Baron, Praticien Hospitalier Pédiatrie M. Sébastien Schmitt, Praticien hospitalier Génétique

SOMMAIRE

I.	INTRODUCTION	6
Α	. Les phenotypes de petite taille	6
	a) Généralités	6
	b) Dyschondrostéose de Leri-Weill (DCS)	. 11
	1. Micromélie mésomélique	. 12
	2. Déformation de Madelung	. 12
	3. Autres critères cliniques	. 14
	c) Le Nanisme de Langer	. 14
	d) Petite Taille Idiopathiaue (ISS)	. 14
В	AUTRES CAUSES A ECARTER AVANT UNE EXPLORATION SHOX	15
2	a) Le Syndrome de Turner	15
	<i>b)</i> Déficit en hormone de croissance (GH) déficit en récenteur de l'hormone de	
	croissance (GHR) et déficit en IGF-1	16
	c) L'achondronlasie et hynochondronlasie	17
С	I E GENE SHOX NATURE ET FONCTION	19
U.	a) Historiana	10
	b) Nature at fonction	21
	a) Págions régulatricas	25
	1 Dégions Dégulatrices an aval (an 2 ²) du gène	. 25
	 Regions Regulatrices en avait (en 5) du gene Dégions Dégulatrices en amont (en 5²) du gène 	. 23
	2. Regions Regulatices en amont (en 5) du gene	. 27
	a) Anomalies generiques connues	. 29
	 Deletion allenque du gene Délétion de régione régionalitations à distance. 	. 29
	2. Deletion de regions regulatrices à distance	. 29
	3. Duplication partielle ou totale du gene	. 29
	4. Mutations ponctuelles	.31
	e) Corrélation génotype-phénotype	. 32
	<i>f)</i> Intérêt diagnostic de l'exploration du gène SHOX	. 33
II.	MATERIEL ET METHODES	. 35
А	DESCRIPTION DE LA COHORTE	35
R	DEMARCHE ANALYTIQUE DU GENE SHOX A NANTES	39
C		41
	MI PA	. .
D	a) Historiana	. 4 2 12
	 a) Itistorique b) Dringing général 	.42
		.42
Б	C) MLPA SHUA	. 40
E.	SEQUENÇAGE	.49
	a) Generalites	. 49
	b) Technique utilisee	. 49
	c) Mise au point	. 49
	d) Purification des produits d'amplification	. 52
	e) Réaction de séquence	. 52
	<i>f) Purification des produits de séquence</i>	. 53
	g) Analyse sur séquenceur capillaire et traitement informatique	. 53
III.	RESULTATS	. 55
Δ	Β ΕSULTATS DE MI ΡΔ	55
A D	RESULTATS DE MILLA	61
C	Ο ΑΤΙΕΝΤ ΜΙΤΕ (DATIENT NIIMEDA 22)	6/
	$ \qquad \qquad$.04

D. RESULTATS GLOBAUX	67
IV. DISCUSSION	
A. CONFRONTATION DES RESULTATS AVEC LES DONNEES DE LA LITTERATURE	69
a) Cohorte « SLW » de la littérature	
b) Cohortes « ISS » de la littérature	
c) Synthèse	
B. OUVERTURE ET PERSPECTIVES	72
C. CONCLUSION	73
V. TABLE DES FIGURES	74
VI. TABLE DES TABLEAUX	75
VII. ANNEXES	76

REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont tout d'abord aux membres du jury qui ont accepté d'encadrer ce travail :

M. Bard, pour avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Mme. Baron, pour avoir accepté sans hésitation à participer en tant que clinicien à ce travail.

Et je tiens à remercier particulièrement le service de Génétique moléculaire de Nantes : mon directeur de thèse, le chef de service Stéphane Bézieau, ainsi que Sébastien Schmitt pour m'avoir proposé ce sujet et encadré durant ce travail (... mais aussi pour avoir occupé leurs weekends par des relectures de thèse lorsque le temps commençait à être compté début avril !).

Mes remerciements vont aussi à toutes les personnes du service qui m'ont guidé et formé sur le plan pratique : les cadres Pierre Boisseau et Mathilde Giraud, ainsi que tous les techniciens du laboratoire pour m'avoir aidé sur la mise au point du séquençage (j'ai quelques dettes de gâteaux de service à rembourser): merci beaucoup !

Je remercie les personnes que j'ai connu au fils de mes études de Pharmacie et de mon Internat:

L'ensemble des internes nantais et ex-nantais avec lesquels j'ai passé sept semestres très agréables : Adeline et Céline M., Caro, Céline G., Eric, Hélène, Marina, Vidal et Marion, ... et les autres.

La plupart des professeurs de la faculté de Pharmacie de Nantes qui m'ont formé.

Je remercie évidemment tous mes amis d'enfance, d'études et de l'extérieur qui ne s'étonnent plus de me voir construire des aquarium de plus en plus grands, qui prient pour que je ne déménage plus avant très longtemps, qui me voient mettre de la vodka pour stimuler les bactéries dénitrifiantes du bac, qui trouvent presque normal de faire 600km pour ramener un poisson tropical et le nourrir 5 fois par nuit à la pince à épiler, de détruire ma pelouse à coup de pelleteuse pour géothermiser l'eau des poissons, être « assez régulièrement » en retard lors des rendez-vous, ne jamais freiner le premier en kart (plutôt mourir !), faire des phrases qui restent mémorables (« si une clio monte, tout monte », « Faut que je donne à manger aux poissons » entre autres...),... et je ne pense pas que cela soit terminé : Antoine, Alex et Audrey, Gaby, Mylo et Myriam, Thomas et Dorothée, Vincent, Je ne manquerai pas de vous rappeler pour nos prochains déménagements. Je remercie aussi Mathieu pour avoir participé aux relectures pendant ses vacances !

Et je tiens surtout à remercier ma famille :

Amélie, ma femme qui m'a supporté durant tous mes concours et qui, en se mariant avec moi, s'est aussi mariée avec mes différentes passions un peu envahissantes !

Quentin, mon fils de 18 mois dont le premier mot a été « Popaaa » (j'avoue lui avoir fait suivre un entraînement intensif...), et pour qui, être Interne en cours de rédaction de thèse se résume à dormir et faire des dessins sur un ordinateur portable ! J'ai encore pas mal de choses à lui expliquer...

Ma belle-famille qui a su m'accueillir et me confier Amélie.

Mes grands-parents maternels qui ont toujours été très généreux avec moi et dont mon seul regret est de ne pas avoir eu le temps de pouvoir faire la même chose pour eux.

Mon grand-père paternel chez qui j'ai passé trois très bonnes années après mon Bac ce qui m'a permis de réellement le connaître et de ne jamais l'oublier.

Mes grands frères Olivier et Grégory ainsi que leurs familles respectives sur qui je peux toujours compter !!

Et mes parents, qui m'ont toujours poussé dans tout ce que je faisais, qui ont toujours été parfaits, grâce à qui je partais avec beaucoup plus de chances dans la vie que d'autres et qui se sont souvent fait du souci pour mon « avenir » : mais ça y est, il n'y a plus de souci à se faire, si vous lisez ceci cela signifie que j'ai même passé ma thèse dans les temps !

SG, avril 2010.

PS : et je remercie aussi mon berger belge Bali qui a fait fuir nos récents cambrioleurs... sans lui, mon ordinateur portable aurait disparu avec ma thèse !!

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN: Acide désoxyribonucléique

CNE : Elément non-codant de l'ADN très conservé (Conserved Non-coding DNA Element)

DCS: Dyschondrostéose

DS : Déviations standard

GH : Hormone de croissance (Growth Hormon)

HAS: Haute Autorité de Santé

IGF-1: Facteur de croissance peptidique de type 1 (Insulin-like Growth Factor)

IGFBP3: Protéine de liaison des IGF de type 3 (Insulin-like Growth Factor Binding Proteins)

IMC: Indice de Masse Corporelle

ISS : Petite taille idiopathique (Idiopathic Short Stature)

Kb : Kilobases

MLPA : Réaction d'amplification multiplexée par sondes ligation-dépendantes. (Multiple Ligation-dependant Probe Amplification)

PAR1 : Région PseudoAutosomale 1 de l'X

PCR: Réaction d'amplification en chaîne par polymerase (Polymerase Chain Reaction)

RCIU: Retard de Croissance Intra-Utérin

SHOX: gène contenant une séquence impliquée dans le contrôle de la taille (Short stature HomeobOX-containing gene)

SLW : Syndrome de Léri-Weill

SNP: Polymorphisme nucléotidique simple (Single Nucleotide Polymorphism)

I. Introduction :

En 1966, le code génétique, qui fait correspondre un acide aminé à une suite donnée de trois bases nucléiques (codon), est découvert. Il est alors établi qu'un gène est à l'origine de la production d'une protéine, laquelle est constituée d'une chaîne d'acides aminés. Au fil des explorations du génome humain, un grand nombre d'anomalies génétiques vont venir expliquer certaines pathologies. C'est le cas, depuis une dizaine d'années, d'un type particulier de phénotypes de petite taille. La région distale du bras court du chromosome X est fréquemment le site d'anomalies telles que les délétions, pouvant conduire à un phénotype de petite taille mais aussi à des retards mentaux, à l'ichtyose liée à l'X ou encore au syndrome de Kallmann (1).

L'objet de ce mémoire est multiple : étudier, dans un premier temps, l'exploration d'une anomalie génétique pouvant être responsable d'un retard de croissance au sein d'une cohorte de patients, mettre au point dans un second temps un complément d'exploration par séquençage de ce gène et, enfin, tirer des conclusions nécessaires pour améliorer la démarche diagnostique au CHU de Nantes.

A. Les phénotypes de petite taille :

a) Généralités :

Alors que la taille moyenne a considérablement augmenté au cours du XX^{ème} siècle, les phénotypes de petite taille touchent approximativement 3% de la population et représentent l'un des plus fréquents motifs de suivi médical pendant l'enfance (2). D'après Schneider et al. (3), 2,3% des enfants sont de petite taille (<-2DS).

L'insuffisance staturale d'un enfant doit être appréciée par rapport à la courbe de croissance de la population, par rapport à la taille des parents, mais aussi par rapport à la vitesse de croissance.

Les courbes de croissances de référence ont été réalisées à partir des mesures de taille en fonction du sexe, par classes d'âge, sur de nombreux enfants et sur de longues durées. Le profil de référence utilisé en France est celui de Sampé et Pédron (4). En déterminant la moyenne de taille puis l'intervalle de taille entre lequel on trouve 95% des enfants, on retrouve 2,5% des enfants en dessous de cet intervalle, ce qui correspond environ à l'estimation du pourcentage des retards staturaux chez l'enfant (2,3% selon (3)). La limite inférieure de cet intervalle de taille correspond à –2 déviations standards (DS) par rapport à la taille moyenne, c'est pourquoi un patient est considéré comme atteint de retard statural lorsque sa taille

s'écarte de plus de deux déviations standards (DS). La taille peut aussi être exprimée en percentile, la normale étant située entre le 3^{ème} et le 97^{ème} percentile pour l'âge et le sexe.

Le terme de retard statural est alors utilisé pour désigner un phénotype de petite taille. Le plus souvent, les petites tailles sont héréditaires et ne présentent pas de caractère pathologique en l'absence de cassure sur la courbe de croissance : par contre, si la courbe s'infléchit et change de couloir, la vitesse de croissance est diminuée et ceci nécessite une consultation en pédiatrie.

Pour classifier un retard statural, il faut tenir compte d'un ensemble de critères :

- Poids et taille à la naissance (permettant l'évaluation d'un éventuel retard de croissance intra-utérin),
- Déclenchement de la puberté,
- Pathologie chronique et âge osseux associés à la courbe de croissance.

C'est pourquoi, la surveillance de la courbe staturale et de la courbe pondérale fait partie de la surveillance systématique de tout enfant : on peut admettre que la taille normale de l'enfant est égale à la taille moyenne de la population pour l'âge, corrigée de l'écart-type moyen des parents.

La taille prévisionnelle à l'âge adulte peut être estimée par la taille cible corrigée (en centimètres):

Une fois la taille cible déterminée, il suffit de vérifier si l'enfant se trouve bien dans le couloir de croissance qui l'amènera à sa taille cible à l'âge adulte : lorsque la taille d'un enfant est en dessous de 2 couloirs de croissance de sa taille cible, une évaluation médicale est alors nécessaire même si sa taille actuelle est comprise dans la norme (+/-2DS).

La taille est conditionnée par de nombreux facteurs intervenant sur la synthèse des protéines de structure des os et des muscles. Les causes de retard de croissance sont donc multiples (Tableau 1, (5)). Il faut distinguer :

- Facteurs <u>environnementaux</u> (alimentation, contexte socio-familial) aboutissant en général à un nanisme harmonieux ;
- Retards de croissance <u>secondaires à une pathologie chronique</u> (insuffisances rénales chroniques, syndromes de malabsorption type

intolérance au gluten de la Maladie coeliaque, maldigestion, ou les maladies métaboliques) ;

- Maladies endocriniennes (hypothyroïdie congénitale, déficit en hormone de croissance (GH) ou hypercorticismes) ;
- Causes constitutionnelles, telles que les maladies chromosomiques (Trisomie 21, syndrome de Turner), les chondrodysplasies (regroupant un ensemble de maladies osseuses constitutionnelles génotypiques), le retard de croissance intra-utérin ou encore les petites tailles essentielles.

	Maladies osseuses: chondrodysplasies		
Retards de croissance	Retard de croissance intra-utérin (RCIU)		
constitutionnels	Aberrations chromosomiques (Turner, T21 SHOX)		
	Petite taille essentielle (familiale)		
	Maladies cardiaques		
	Maladies pulmonaires (mucoviscidose)		
Retards de croissance secondaires	Maladies rénales (tubulopathies)		
à une maladie chronique	Maladies inflammatoires (Crohn, rectocolite hémorragique)		
	Maladies digestives (Maladie coeliaque)		
	Maladies métaboliques		
	Hypothyroïdies		
Retards de croissance secondaires à une maladie endocrinienne	Insuffisance somatotrope (GH, IGF-1)		
	Hypercorticisme (Cushing)		
	Retard pubertaire		
Autres causes	Nanisme psychosocial		
	Hypercorticisme iatrogène		

Tableau 1 : Principales causes de retard de croissance.

Ainsi, et si l'enquête clinique ne permet pas d'orienter le diagnostic étiologique, un minimum d'explorations s'impose (Tableau 2) pour rechercher une maladie pouvant se révéler par un retard de croissance isolé (80% des cas) chez un enfant. Dans ce cadre, on recherchera dans un premier temps une tubulopathie, une insuffisance rénale, une intolérance au gluten, un déficit en hormone de croissance (GH), et une hypothyroïdie de révélation tardive. Chez une petite fille, on se méfiera d'un syndrome turnérien puisque le syndrome dysmorphique peut être très discret dans les mosaïques de Turner: la réalisation d'un caryotype est utile pour écarter ce diagnostic.

	Poids et taille à la naissance		
	Courbe de croissance du poids et de la taille		
Interrogatoire et examen	Taille des parents et de la fratrie		
clinique	Mesures : envergure et taille assise		
	Antécédents médicaux et chirurgicaux		
	Stade pubertaire		
	Bilan endocrinien (TSH et T4, Testostérone, Oestradiol, FSH, LH, Prolactine)		
	Dosage GH, IGF1, IGFBP3		
Bilan biologique	Test de stimulation de la GH (arginine insuline ou propranolol glucagon)		
	Ig GAM, Ac anti-gliadine		
	Caryotype (pour les filles)		
	Recherche des mutations du gène FGFR3 si rhizomélie		
Bilan radiologique	Avant-bras, poignet		
(enfant et parents si petite	Rachis lombaire		
tailie)	Bassin		

Tableau 2 : Bilan initial d'exploration d'un retard de croissance en pédiatrieau CHU de Nantes.

Les maladies du squelette sont des pathologies génétiques du développement de l'os et/ou du cartilage de croissance qui affectent non seulement la croissance linéaire mais aussi les proportions corporelles. La recherche de signes dysmorphiques doit être systématique. Le caractère harmonieux ou non du retard de croissance peut être apprécié en comparant la taille et l'envergure qui doivent être sensiblement égales chez l'enfant normal. Dans le contexte qui nous intéresse ici, il est important de typer le raccourcissement des membres :

- Rhizomélie : raccourcissement atteignant les racines des membres (bras et la cuisse),
- Mésomélie : raccourcissement atteignant la portion médiane des membres (une partie du bras et de l'avant-bras ou une partie de la cuisse et de la jambe),
- Acromélie : raccourcissement atteignant les extrémités des membres (jambe et l'avant-bras)
- Micromélie : raccourcissement atteignant l'ensemble du membre.

Il est en effet important de distinguer un syndrome dysmorphique à prédominance mésomélique de ceux à prédominance rhizomélique pour l'orientation de l'exploration. L'imagerie main et poignet peut-être nécessaire.

b) Dyschondrostéose de Leri-Weill (DCS):

La taille comporte donc une lourde composante génétique lorsque les facteurs environnementaux sont écartés : l'étude de patients atteints du Syndrome de Turner (19) a permis de cibler les anomalies potentielles au niveau du chromosome X. De nombreux gènes ont été identifiés et malgré une hétérogénéité reconnue dans ce domaine, les mutations ou délétions du gène *SHOX* (Short stature HomeobOXcontaining gene) sont fréquemment retrouvées chez certains sujets de petite taille.

L'haploinsuffisance de ce gène est responsable de phénotypes de petite taille de sévérité hautement variable, allant de la petite taille isolée (ISS) sans atteinte dysmorphique, jusqu'au Syndrome de Léri-Weill (SLW), tandis qu'une délétion homozygote du gène *SHOX* conduit au Nanisme de Langer. Les indications de l'analyse du gène *SHOX* sont donc les suivantes :

- retard statural avec taille < -2DS,</p>
- > signes cliniques et radiologiques évocateurs de DCS,
- arbre généalogique évocateur d'une transmission autosomique dominante du retard statural.

La dyschondrostéose (DCS) est une dysplasie osseuse transmise sur un mode autosomique dominant et fait partie des maladies osseuses constitutionnelles. (Figure 2) Ce syndrome a été décrit pour la première fois en France par André Léri et Jean Weill en 1929 (6). Ces patients présentent un ensemble de signes cliniques associés à leur insuffisance staturale modérée (-2.2 +/- 1DS) sans différence entre les deux sexes : taille finale de l'ordre de 155 centimètres pour les hommes et de 145 centimètres pour les femmes). Une micromélie mésomélique ainsi que la déformation du poignet dite de Madelung sont notamment retrouvées dans la plupart des cas (Madelung clinique ou radiologique dans 74% des SLW, tous âges confondus, (7)).

1. Micromélie mésomélique :

La micromélie mésomélique peut être évaluée par la mesure de l'envergure en plaçant le patient dos au mur, bras tendus, paumes des mains vers l'avant et alignées avec les épaules. Les mesures anthropométriques mettent en évidence des bras (-2.9 +/-1DS) mais aussi fréquemment des membres inférieurs courts avec une atteinte à prédominance médiane de l'avant-bras et/ou des jambes.

Il peut être intéressant de réaliser une mesure de la taille assise : un rapport « Taille assise sur Taille debout » supérieur à 55,5% est en faveur d'un Syndrome de Leri-Weill (8).

2. Déformation de Madelung :

La déformation du poignet en « dos de cuillère » dite déformation de Madelung (Figure 1) est majorée au cours de l'adolescence (7). Cette anomalie osseuse résulte d'une croissance désorganisée de l'épiphyse radiale aboutissant à un raccourcissement et une courbure postéro-externe du radius, ainsi qu'à une subluxation dorsale de l'extrémité inférieure du cubitus. Une organisation en coin des os du carpe peut, à l'extrême, aboutir à une dislocation cubitale au niveau du poignet ou du coude. Les patients consultent alors pour la douleur associée et la limitation des mouvements. Il faut noter que cette déformation peut être absente cliniquement et présente radiologiquement : elle n'est donc pas toujours aisée à mettre en évidence. La prévalence de la déformation de Madelung est plus élevée dans le SLW (74%) que dans le syndrome de Turner (3 à 7%) (7).

L'incidence des déformations osseuses est plus élevée chez les femmes (rapport 4/1 entre femmes et hommes, (7)). Ceci peut être expliqué par l'effet positif des estrogènes sur la maturation du squelette ayant pour conséquence de majorer l'effet d'une autre anomalie de développement (maturation prématurée des chondrocytes) : cette hypothèse expliquerait le fait que les anomalies du squelette sont non seulement plus fréquentes chez la femme mais aussi plus sévères que chez l'homme en cas d'anomalie *SHOX*. Par ailleurs, une comparaison filles prépubères et filles pubères a montré que les anomalies osseuses progressaient avec l'âge et le développement pubertaire (7 et 9).





Figure 1 : Radiographies des avant-bras d'une patiente présentant une anomalie de Madelung (patient numéro 70 de la cohorte nantaise).

3. Autres critères cliniques :

Il existe d'autres signes cliniques associés au syndrome de LW, de fréquence moins élevée, tels que l'incurvation tibiale, un cubitus valgus, l'hypertrophie musculaire (qui serait associée au SLW essentiellement chez les hommes selon Schiller et al., (10)) ou le palais ogival. Un IMC élevé chez un patient de petite taille serait aussi en faveur d'un syndrome de Leri-Weill (8).

Lorsque l'on suspecte une maladie osseuse constitutionnelle responsable d'un retard de croissance et en l'absence de manifestation clinique évidente, il est nécessaire de pratiquer un bilan radiologique : main et poignet de face, avant-bras de face puis bassin et rachis lombaire. En effet, l'absence d'élargissement franc de la distance interpédiculaire de face de L1 à L5 est en faveur d'une DCS.

Ce bilan permet d'apprécier non seulement la maturation osseuse mais aussi la minéralisation ainsi que les anomalies morphologiques évocatrices afin d'orienter les recherches.

L'ensemble de ces critères cliniques peuvent orienter vers la prescription d'une exploration génétique : en effet, un SLW peut maintenant être génétiquement défini par une haploinsuffisance du gène *SHOX* (anomalie hétérozygote dans 60 à 100% des SLW (selon (2), (8), (10), (11), (12) (13), (14), (15), (10), voir tableau 24 regroupant les résultats de l'ensemble de ces publications).

c) Le Nanisme de Langer :

Le Nanisme de Langer, ou Nanisme mésomélique, est transmis sur un mode autosomique récessif et a été décrit pour la première fois en 1967 (16). Il est caractérisé par une mésomélie sévère des avant-bras et une taille adulte se situant entre –5.5 et –7.2 DS (122 à 134 centimètres) sans différence entre les sexes. Les cas sont rares.

Plusieurs observations avaient souligné la présence d'un Nanisme de Langer chez des enfants issus de parents tous deux porteurs d'une DCS, ces résultats avaient permis d'affirmer que le Nanisme de Langer correspond à la forme homozygote de la DCS (17 et 18).

d) Petite Taille Idiopathique (ISS) :

La petite taille idiopathique, « Idiopathic Short Stature » (ISS), est un diagnostic d'élimination. Les phénotypes de petite taille représentent environ 2% de la population (19), dans une large majorité des cas (80 %), cette petite taille est idiopathique et, parmi ces patients, seule une très faible proportion présente une anomalie du gène *SHOX* (entre 2,2 et 2,4% selon les études de Rappold en 2002 (20) et 2007 (8)).

Ainsi, ce groupe de patient ISS est défini par une petite taille inférieure à – 2DS sans explication (Figure 2). Un patient peut être facilement classé à tort dans ce groupe puisque les signes cliniques de dyschondrostéose sont parfois frustres chez les jeunes enfants et notamment chez les garçons. Il faut aussi rappeler que la déformation de Madelung peut être absente cliniquement mais bien présente radiologiquement. Il est donc important qu'un patient ne soit étiqueté « Petite taille Idiopathique » qu'après avoir exclu toutes les causes les plus courantes.

Ce diagnostic est particulièrement important aux Etats-Unis : en effet, outre-Atlantique ce seul diagnostic de petite taille idiopathique est une indication reconnue des traitements par hormone de croissance.

B. Autres causes à écarter avant une exploration SHOX :

a) Le Syndrome de Turner :

Le Syndrome de Turner est caractérisé par un syndrome d'infantilisme chez des patients présentant un caryotype 45X: ce syndrome regroupe petite taille (-3 ou 4 déviation standard) et impubérisme ou dysgénésie gonadique. Ce sont deux signes constants associés fréquemment à une dysmorphie cranio-faciale (visage triangulaire, hypoplasie du maxillaire inférieur, rétrognatie, oreilles basses, cheveux implantés bas), un thorax large "en bouclier" (pectus excavatum) et un cou court.

Malgré une haploinsuffisance du gène SHOX en raison de la perte ou du réarrangement de l'un des chromosomes X par définition chez les patients turnériens, les symptômes cliniques ne sont pas caractéristiques d'un Syndrome de Leri Weill (Figure 2) : le syndrome de Turner n'est, par exemple, pas corrélé avec la présence de la déformation de Madelung des poignets (seulement 3 à 7% chez ces patients alors que l'on retrouve la déformation de Madelung chez 74% des patients atteints de DCS) et seulement 3% d'entre eux présentent une incurvation du tibia (7). Ce constat pourrait être expliqué par le déficit en stéroïdes sexuels des patient turnériens, ce qui les affranchirait de l'effet des estrogènes accentuant la maturation du squelette, et avant pour conséquence de majorer l'effet d'une autre anomalie de développement comme une anomalie SHOX (7). Le peu de déformation de Madelung en comparaison avec les DCS peut aussi s'expliquer par l'existence de mosaïques chez les patients atteints du Syndrome de Turner : plusieurs lignées cellulaires coexistent chez ces patients et toutes ne seraient pas haploinsuffisantes pour le gène SHOX. En effet, environ 50% des patientes atteintes de syndrome de Turner ont une monosomie 45,X, les autres présentent des anomalies de structure de l'X ou des mosaïques (21).

Par ailleurs, il a été établi que la taille moyenne des patients présentant une haploinsuffisance *SHOX* était de -2.2DS. La taille moyenne des patients atteints d'un syndrome de Turner est de -3.2DS : l'haploinsuffisance *SHOX* n'est donc responsable que des 2 tiers du déficit de taille du syndrome de Turner, ce qui

implique l'existence d'autres loci sur le chromosome X contribuant à l'ostéogénèse et donc à la taille des individus.

b) Déficit en hormone de croissance (GH), déficit en récepteur de l'hormone de croissance (GHR) et déficit en IGF-1 :

Les déficits en hormone de croissance (GH) ou en récepteur de la GH ont un profil clinique similaire : le patient présente une taille normale à la naissance et l'atteinte débute entre 2 et 3 ans, parfois plus tard, par un retard de croissance harmonieux, une vitesse de croissance diminuée et un retard de maturation osseuse. Ces enfants ont souvent un visage triangulaire avec un front bombé, un petit menton et un excès de tissu adipeux sur le tronc. La notion d'une anoxie néonatale, d'une naissance par le siège et d'anomalies de la ligne médiane peuvent êtres relevées. Des hypoglycémies récurrentes néonatales ou encore un micropénis sont évocateurs.

Au sein des déficits en GH, il faut distinguer les anomalies du gène GH1 (déficit en GH de type 1A) et les anomalies du gène du récepteur au GHRH de l'antéhypophyse (déficit en GH de type 1B). Les déficits en GH peuvent aussi être secondaires et apparaître consécutivement à une pathologie intracrânienne (neurochirurgie, radiothérapie, tumeur cérébrale,...).

Les déficits en récepteur de la GH sont, quant à eux, expliqués par une anomalie du gène du récepteur à la GH, ils correspondent au profil de résistance ou d'insensibilité à la GH.

Le déficit en IGF-1, dû à une délétion du gène de l'IGF-1, se distingue des déficits en GH ou en récepteur à la GH par le début de l'atteinte clinique : en effet, les déficits en IGF-1 sont responsables de retards de croissance intra-utérins (RCIU) et d'anomalies du développement cérébral.

Ces déficits doivent être confirmés par un test de stimulation et de sécrétion de GH (arginine insuline ou propranolol glucagon, Tableau 3) : en cas de déficit en GH, le pic réponse de GH est inférieur à 10 ng/ml. Dans les cas douteux, une étude du profil de sécrétion nocturne de GH peut être nécessaire.

	GH	IGF-1
Déficit en GH	Bas	Bas
Déficit en récepteur pour la GH	N ou élevé	Bas
Déficit en IGF-1	N ou élevé	Bas

Tableau 3 : Interprétation des tests de stimulation de la GH.

Ces déficits représentent un faible pourcentage parmi les phénotypes de petite taille. Certaines études suggèreraient l'existence de polymorphismes géniques normaux du gène du récepteur à la GH qui seraient responsables de profils staturaux variés : cette voie serait une nouvelle explication des écarts de tailles entre différentes populations humaines (22).

c) L'achondroplasie et hypochondroplasie:

L'achondroplasie est une affection du tissu osseux de nature autosomique dominante rare (environ un individu sur 15000) aboutissant à un profil rhizomélique contrairement au SLW qui engendre un profil mésomélique. Elle est le résultat d'une mutation du gène FGFR3 (Fibroblast Growth Factor Receptor 3) situé sur le chromosome 4 et codant pour le récepteur du facteur de croissance fibroblastique. L'achondroplasie est détectable dès la naissance après un examen clinique et radiologique soigneux. Cependant environ 90% des personnes atteintes naissent de parents sains : il s'agit d'une mutation de novo. L'affection se caractérise par un trouble de l'ossification et une atteinte des cartilages de croissance qui sont les zones de croissance du tissu osseux proprement dit. Le cartilage osseux se transforme trop tôt en tissu osseux définitif avec arrêt de la croissance, les os longs des membres étant le plus souvent concernés là encore. Les patients atteints d'achondroplasie mesurent à peu près 1,20 mètres avec une rhizomélie des bras et des jambes ainsi qu'un visage caractéristique (macrocéphalie et un front haut avec une ensellure nasale marquée). L'achondroplasie est susceptible d'entraîner une diminution du calibre du canal rachidien (réduction des distances interpédiculaires des dernières vertèbres lombaires) conduisant à l'apparition de troubles de la statique vertébrale et d'une arthrose précoce.

L'hypochondroplasie est une affection voisine mais caractérisée par une micromélie plus modérée et des signes cliniques globalement réduits par rapport à l'achondroplasie. Le gène en question est le même, d'autres mutations sont en cause.



Figure 2 : Grandes lignes de caractéristiques cliniques et génétiques des 3 principaux syndromes à prendre en compte dans un contexte d'exploration du gène *SHOX*, au sein des patients de petite taille (3% de la population).

C. Le gène SHOX, nature et fonction :

a) Historique :

Les études cytogénétiques des années 1980 avaient permis de mettre en évidence des anomalies des chromosomes sexuels chez l'Homme: les délétions terminales des bras courts des chromosomes X et Y étaient constamment associées à des individus de petite taille (23).

On distingue au sein des chromosomes sexuels humains deux types de régions fonctionnelles: une région spécifique de chacun des chromosomes sexuels et deux régions dites pseudoautosomales (PAR) parfaitement homologues entre les chromosomes X et Y. Les gènes de ces régions PAR sont donc transmis de manière autosomique, non liée au sexe et, chez la femme, ces gènes échappent à l'inactivation de l'X : hommes et femmes ont donc deux copies fonctionnelles de ces gènes (Figure 3).

Il existe deux régions PAR : PAR1, qui est la région pseudoautosomale majeure s'étendant sur 2,7 mégabases à l'extrémité distale du bras court des chromosomes X et Y (Xp22.3 et Yp11.2), et PAR2, la région pseudoautosomale mineure s'étendant sur 0,33 mégabases à l'extrémité du bras long des chromosomes sexuels (Xq28, Yq12). La région PAR1 est le site d'un crossing-over obligatoire et nécessaire pour la ségrégation méiotique correcte, responsable de la fréquence dix fois plus élevée de recombinaisons survenant dans cette région (24 et 25). Les proportions en GC (proportion supérieure à 48%) ainsi qu'en répétitions *Alu* sont particulièrement élevées dans PAR1 ce qui explique les difficultés à séquencer cette partie des chromosomes sexuels.



Figure 3 : Représentations schématiques des chromosomes X et Y.

En 1992, plusieurs arguments plaidaient en faveur d'un gène impliqué dans la croissance et localisé sur une région PAR. L'association systématique du phénotype de petite taille chez les patients atteints d'un Syndrome de Turner (45,X0) a orienté les recherches autour des aberrations des chromosomes sexuels. En effet, chez les femmes, dans chaque cellule, un des deux chromosomes X est inactivé : dans le Syndrome de Turner, le chromosome X subsistant est normal et actif dans toutes les cellules. Les symptômes de ces patientes ne pouvaient donc provenir que de la perte de gènes échappant à l'inactivation de l'X du chromosome X inactif, c'est-à-dire ceux des régions PAR.

Les études des réarrangements de l'Xp22 ont permis de localiser le gène en cause dans la région pseudoautosomale PAR1 (26,27). Certains loci de contrôle de la taille ont été déduits des études de corrélations entre hommes et femmes ainsi qu'entre patients normaux et patients présentant une anomalie de chromosomes sexuels (28).

C'est en 1997 que le gène a été identifié dans la région PAR1 de l'X par une étude de corrélation entre taille et réarrangements de l'X et de l'Y : une zone de 700 kb semblait être une bonne candidate (29). L'analyse de patients associant retard statural et réarrangements de l'X ou de l'Y a permis de définir un intervalle critique de 170 kb dans la zone distale de la région pseudoautosomique en Xp22 ou Yp11.3. La forte probabilité de lien entre un gène et les anomalies de patients atteints à la fois de Syndrome de Turner et de retard statural a alors été mise en évidence pour la première fois : Rao (19) a mis en évidence une mutation générant un codon stop dans l'exon 5 du gène *SHOX*, conjointement à la co-ségrégation de cette mutation chez des patients de petite taille (Figure 4).



Figure 4 : Evolution de la région critique SHOX au fil de l'avancée des connaissances.

Deux équipes ont donc simultanément isolé ce nouveau gène d'environ 35 kb, l'équipe de Rao (19) le nommant *SHOX* (Short stature HomeobOX gene), et celle d'Ellison le nommant PHOG (Pseudoautosomal Homeobox Containing Osteogenic Gene) (30).

Dès 1998, des mutations ainsi que des délétions du gène *SHOX* ont été corrélées au Syndrome de Leri-Weill (18 et 14). Il a été ensuite établi que des anomalies homozygotes étaient présentes dans tous les cas de Syndrome de Langer et, plus récemment, que des anomalies hétérozygotes du gène *SHOX* étaient impliquées dans 3 grands syndromes:

- 60 à 100% (Tableau 24) des SLW et plus précisément dans 77% des SLW selon (31) en 2009)
- 66% des syndromes de Turner (31)
- 2 à 5% des ISS (2,2% et 2,4% selon Rappold (20, 8), et récemment 4,9% selon Chen (2)).

b) Nature et fonction :

Il existe au moins deux transcrits, SHOXa et SHOXb, par épissage alternatif de l'exon 6: le premier codant pour 292 et le second pour 225 acides aminés. Ces deux isoformes échappent à l'inactivation de l'X et diffèrent par leur extrémité C-terminale (phosphorylation et propriétés de liaison protéique) donnant les exons 6a et 6b respectivement.

Selon les recommandations de l'HGVS (Human Genome Variation Society), la nomenclature utilisée dans ce document est issue des clones NCBI références NM_000451.3 (*SHOXa*) et NM_006883.2 (*SHOXb*). Le gène est composé de 6 exons, globalement très conservés au sein des espèces (mammifères, poissons et oiseaux) codés sur environ 35 kb, de la 505 079^{eme} à la 540 146^{eme} base de l'X. L'exon 1 est un exon non codant (Tableau 4).

	Localisation sur le chromosome X (en bases nucléotidiques)
Exon 1	505 079 à 505 337
Exon 2	511 200 à 511 909
Exon 3	515 353 à 515 561
Exon 4	521 556 à 521 613
Exon 5	521 734 à 521 822
Exon 6a	525 126 à 527 558
Exon 6b	539 520 à 540 146

Tableau 4 : Localisation des exons du gène SHOX sur le chromosome X en bases nucléotidiques à partir du télomère ; clones NCBI références NM_000451.3 (*SHOXa*) et NM_006883.2 (*SHOXb*).

Les profils d'expression des deux transcrits sont différents selon les tissus : SHOXa est largement exprimé (muscle squelettique, placenta, pancréas, cœur, fibroblastes de la moelle osseuse) alors que la transcription de SHOXb est plus limitée (reins fœtaux, muscles squelettiques, fibroblastes de la moelle osseuse) (18).

La protéine comprend trois domaines caractéristiques : un homéodomaine, un domaine de liaison SH3 et un domaine OAR (Figure 5).



Figure 5 : Représentation schématique du gène SHOX.

L'<u>homéodomaine</u> est partagé entre les exons 3 et 4. Ce domaine code pour 61 acides aminés et se situe au milieu de la protéine. La structure de cet homéodomaine est de type hélice-tour-hélice ce qui est courant au sein des protéines interagissant avec l'ADN. Historiquement, les homéobox sont des séquences très conservées initialement découvertes dans les gènes déterminant le développement de chaque segment au cours de l'embryogénèse. Ce type de séquences a ensuite été retrouvé dans de nombreux gènes du développement ainsi que dans certains facteurs de transcription, comme par exemple dans les gènes *Hox* codant pour des facteurs de transcription fortement exprimés au cours de la phylogénèse (32).

Un <u>domaine SH3</u> existe en aval de cet homéodomaine, son rôle est important dans les interactions protéine-protéine.

Le <u>domaine OAR</u> (Orthopedia Aristaless Rax, domaine identifié pour la première fois dans le gène *Aristaless* chez la drosophile : en cas de mutation, les drosophiles ne possédaient pas d'antennes d'où sa dénomination) correspond aux 19 derniers acides aminés de la protéine SHOX. Ce domaine OAR comporte une séquence de 14 acides aminés commune à un sous-groupe de protéines facteurs de transcription.

L'étude du rôle de la protéine SHOX au niveau cellulaire a permis de mettre en évidence qu'il s'agit d'une protéine nucléaire. Cette protéine est capable de se lier à l'ADN par son homéodomaine de structure hélice-tour-hélice, et d'avoir ainsi un rôle d'activateur de transcription entraînant l'arrêt du cycle cellulaire des chondrocytes (33) : la protéine SHOX a donc un rôle antiprolifératif au niveau de la chondrogénèse, permettant un équilibre entre prolifération et apoptose des chondrocytes durant le développement osseux. Globalement, la protéine SHOX joue un rôle répresseur sur la fusion des plaques de croissance, contrairement aux estrogènes qui accentuent la maturation du squelette. La protéine SHOX est exprimée dès la 12^{ème} semaine de gestation jusqu'à la fusion de la plaque de croissance, essentiellement au niveau du tissu mésenchymateux des membres. L'analyse du profil d'expression durant l'embryogénèse humaine a montré que la protéine SHOX est particulièrement exprimée au niveau du genou, du coude, du poignet et des os de l'avant-bras (34).

La croissance longitudinale du corps est sous le contrôle de la prolifération et de la différenciation des chondrocytes des plaques de croissances. Une haploinsuffisance du gène *SHOX* entraîne une différenciation prématurée des chondrocytes prolifératifs et donc une progression du phénotype hypertrophique, aboutissant ainsi à l'accélération de fusion de la plaque de croissance. Ce mécanisme explique un certain nombre de symptômes observés dans le Syndrome de Turner (micrognathie, cou court). Histologiquement, les enfants atteints de DCS et de Nanisme de Langer présentent une plaque de croissance désorganisée au niveau de la zone de prolifération avec une perte d'alignement parallèle des travées de chondrocytes (35).



Figure 6 : Représentation schématique du gène *SHOX* et des zones potentiellement régulatrices dans la région PAR1 du chromosome X.

c) Régions régulatrices :

Les CNE, ou « Conserved Non-coding DNA Elements », sont des régions très conservées du génome et potentiellement régulatrices, pouvant avoir un effet activateur ou répresseur sur la transcription du gène. Ces régions, encore mal connues, pourraient expliquer les niveaux d'expression différents d'un gène entre différents types de cellules d'un même individu.

Dans une région d'ADN, une séquence activatrice est une séquence régulatrice pouvant fixer des protéines (facteurs de transcription) dans le but de favoriser la transcription d'un gène. Le gène et la séquence activatrice ne sont pas obligatoirement proches l'un de l'autre, la distance les séparant peut être considérable. Ainsi, ces séquences sont situées en amont (c'est à dire en 5') ou en aval (en 3') du gène, voir sur un chromosome différent si le repliement de l'ADN dans le noyau permet une proximité physique entre le gène et la région régulatrice.

C'est en octobre 2005 que Benito-Sanz et al. ont décrit une nouvelle classe de délétions hétérozygotes de la région PAR1 à distance du gène *SHOX* (37) chez 12 patients. Chaque patient présentait un phénotype compatible avec un syndrome de Léri-Weill malgré la présence de 2 copies intactes du gène. Tous les patients avaient pour point commun une zone délétée à distance de SHOX laissant supposer l'existence d'une région régulatrice en 3' (Figure 6).

Jusqu'à présent, le rôle des anomalies de séquences promotrices ou régulatrices était probablement sous-estimé. Actuellement, dans le cas des patients de petite taille, des anomalies sont mises en évidence uniquement pour une petite proportion de patients (SLW et ISS) : plusieurs auteurs (2, 12, 36) pensent donc bientôt avoir la possibilité d'expliquer certains dossiers non-résolus par l'exploration des régions régulatrices.

1. Régions Régulatrices en aval (en 3') du gène :

Selon Sabherwal (12), la zone en aval du gène *SHOX* située entre la 560 et 760000^{eme} bases à partir du télomère serait une région régulatrice importante située dans un désert génique. Cette zone d'environ 200kb contient 8 séquences très conservées au sein des espèces à distance du gène *SHOX* (cis-régulation, Figure 7). L'équipe de J. Chen a étudié une cohorte de plus de 800 patients (ISS et SLW, (2)) au sein desquelles les anomalies *SHOX* (tout confondu hors duplications) représenteraient :

- 4,9% des patients du groupe ISS dont 22% sont des anomalies de la région régulatrice en 3' avec le gène SHOX intact,
- 56.7% des patients du groupe SLW dont 34% sont des anomalies de cette même région en 3' du gène.

Les anomalies constatées sont essentiellement des anomalies des CNE7, CNE8 et/ou CNE9 et ne sont pas retrouvées au sein d'une population témoin. Ce travail suggère donc que le rôle des régions régulatrices en 3' du gène *SHOX* n'est pas à négliger dans l'étude des patients de petites tailles pour lesquels aucune anomalie intragénique n'a été mise en évidence.



Figure 7 : Comparatif des régions non-codantes très conservées en aval du gène *SHOX* entre le génome de certaines espèces animales (vertébrés) et la zone 550000-760000 (bases) du chromosome X de l'Homme (séquence de référence hg18, ECR Genome Browser, Build 37.1). Données issus de Sabherwal (**12**) et remises à jour, les pics rouges correspondent à des séquences conservées à plus de 70% (numérotation en paires de bases à partir du télomère).

On peut noter que la proportion de patients porteurs d'une anomalie au niveau de ces régions régulatrices en 3' est plus élevée (34%) dans le groupe SLW que dans le groupe ISS (22%) (2): il serait donc possible d'envisager que les anomalies au niveau de ces régions en 5' accentueraient les phénotypes observés.

Par ailleurs, plusieurs publications décrivent le CNE9 comme étant probablement l'un des CNE les plus importants dans le rôle régulateur du gène *SHOX* (37 et 12).

Il a été aussi signalé que l'association d'une anomalie du CNE7 et du CNE8 ou la présence d'une anomalie du CNE8 seule pouvaient être rencontrées chez des patients symptomatiques tandis qu'une anomalie du CNE7 isolée ne semblerait pas suffire pour avoir une symptomatologie prononcée chez le patient. Ces notions sont à moduler : il existe une grande variabilité d'expression phénotypique pour de mêmes anomalies au sein des familles porteuses d'une déficience *SHOX*.

Le gène SHOX étant absent chez la souris, l'équipe de Sabherwal (12) a étudié le potentiel activateur de ces régions chez le poulet afin de confirmer les constatations relevées chez l'Homme (Tableau 5).

CNE	2	3	4	5	6	7	8	7 et 8	9
Phénotype de petite taille chez l'Homme en cas d'anomalie du CNE (2)	NI	NI	NI	NI	NI	0	+	+	++
Activité activatrice chez l'embryon de poulet (n'excluant pas une activité plus tardive dans le développement de l'animal) (12)	0	0	+	+	0	0	0	/	+

NI : non-interprétable.

Tableau 5 : Corrélation entre les anomalies de CNE, la symptomatologie des patients selon J.Chen (2) et l'activité de cis-regulation chez l'embryon de poulet selon N.Sabherwal (12).

2. Régions Régulatrices en amont (en 5') du gène :

Récemment, à la suite d'analyses génomiques comparatives, Durand et al. ont identifié un certain nombre de régions conservées non-codantes en amont du gène SHOX (Figure 8). L'activité activatrice de ces régions a ensuite été testée lors d'essais in vivo chez le poulet : les CNE-2, CNE-3 et CNE-5 ont bien une activité sur le développement des membres chez le poulet. Une première analyse d'une cohorte de 60 patients atteints d'un SLW, dont le gène SHOX ainsi que les régions activatrices en 3' étaient intacts, n'a pas mis en évidence de délétion au niveau des CNE-2, CNE-3, et CNE-5. Les mutations ponctuelles n'ont cependant pas été recherchées.



Figure 8 : Comparatif des régions non-codantes très conservées en amont du gène *SHOX* entre le génome de certaines espèces animales et la zone 300000-450000 (bases) du chromosome X de l'Homme (séquence de référence hg18, ECR Genome Browser, Build 37.1). Données issus de Durand (36) et remises à jour, les pics rouges correspondent à des séquences conservées à plus de 70%.

Cette absence de délétion peut être surprenante comparativement à la haute fréquence d'anomalie de la région en aval du gène SHOX : une analyse comparative des 2 régions a révélé que la fréquence de régions répétées est bien supérieure dans la région régulatrice en aval que dans cette région de CNE en amont. L'organisation de la région PAR1 expliquerait donc les résultats de Durand en 2009 (36). On peut aussi supposer que les anomalies de la région régulatrice en amont ne conduisent pas à un phénotype SLW : le recrutement des 60 patients étiquetés SLW aurait donc biaisé les résultats.

L'exploration de cette région en amont fera probablement l'objet d'études complémentaires au sein d'autres cohortes de patients dans les années à venir.

d) Anomalies génétiques connues :

Les phénotypes de petite taille représentent 2 à 3% de la population, dans 80 % des cas, cette petite taille est idiopathique et, parmi ces patients, seuls 2,2 à 4,9 % présentent une anomalie du gène *SHOX* (8, 2).

La prévalence des anomalies *SHOX* (1 naissance sur 2000) serait sensiblement équivalente à la prévalence du déficit en hormone de croissance (déficit en GH : 1 sur 3500) ou encore à la prévalence du Syndrome de Turner (1 sur 5000 naissances).

Les anomalies génétiques connues au niveau du gène SHOX sont de quatre types :

- > Délétions alléliques du gène SHOX.
- > Délétions de la région PAR1 à distance du gène SHOX.
- > Duplication partielle ou totale du gène : effet variable sur la taille
- Mutation ponctuelle : la plus fréquente est la mutation R195X dans l'exon 5

Selon J. Ross (7), 81% des anomalies *SHOX* sont des délétions de tout ou partie du gène *SHOX*; c'est pourquoi, dans un premier temps, les cas Index sont analysés en vue de mettre en évidence les grands réarrangements par technique MLPA. Le choix des techniques d'exploration en fonction de leur sensibilité est important puisqu'il a été constaté que les mutations ponctuelles pouvaient avoir un effet similaire à celui des délétions complètes du gène sur le phénotype (7).

1. Délétion allélique du gène :

La relativement grande fréquence de délétions du gène *SHOX* a été attribuée à la composition structurelle de la région PAR1 : le grand nombre de séquences répétées prédispose aux délétions (8, 25). Ce type d'anomalies représente 81% des anomalies *SHOX*.

Les délétions du gène entier représenteraient 38,5% des anomalies chez les patients atteints d'un SLW(12).

2. Délétion de régions régulatrices à distance :

Ces anomalies concernent les CNE, notamment les CNE 5, CNE 7, CNE 8 et CNE 9. Les répercussions sur le phénotype sont mal évaluées actuellement mais les travaux récents tendent à faire explorer ces zones en cas de phénotype évocateur en l'absence d'anomalie dans le gène *SHOX*.

Les délétions portant sur la région régulatrice en 3' représenteraient potentiellement 3.3% des anomalies *SHOX* chez les SLW (12).

3. Duplication partielle ou totale du gène :

La grande taille observée dans les syndromes de Klinefelter (patients XXY) et chez les femmes Triplo X (patientes XXX) est probablement la résultante de la présence de trois copies du gène *SHOX*. L'hypothèse de relier une grande taille

dans des familles présentant des duplications *SHOX* est donc justifiée d'autant plus que les techniques d'exploration du gène SHOX permettent de mettre en évidence des duplications.

N. Simon Thomas (39) a récemment décrit une famille dont les parents et la fille sont de petite taille. Le père n'a pas de déformation clinique des avant-bras mais présente une déformation radiologique bilatérale ; la mère ne présente aucune anomalie clinique ni radiologique tandis que la fille présente un tableau typique de syndrome de LW. Après exploration, le père présente une large délétion hétérozygotes de plus de 800 kbases emportant le gène *SHOX* tout entier et ses abords, tandis qu'une duplication de l'ensemble des exons *SHOX* a été mise en évidence chez la mère. La fille a hérité de la délétion du père mais aussi de la duplication de la mère : la superposition de ces deux anomalies aboutit à une exploration quantitative normale du gène *SHOX* (Figure 9).





Ainsi, la duplication SHOX chez la mère n'aboutit pas à un phénotype de grande taille tandis que la duplication chez la fille ne permet pas non plus de corriger le phénotype de petite taille expliqué par la délétion issue de son père.

Un autre auteur, L. Roos (40), a publié il y a quelques mois le cas d'une autre enfant initialement explorée pour un retard de développement du langage associé à une dysmorphie du visage. Il a été mis en évidence fortuitement une large duplication couvrant l'ensemble du gène SHOX mais aussi les CNE de la zone régulatrice en 3' du gène. Cette enfant de 10 ans ne présente pas de déformation osseuse significative ni de taille anormale. Plusieurs apparentés de la branche maternelle et de la branche paternelle sont de grande taille (+1.5 DS) mais dans la norme. Il a été mis en évidence que la duplication *SHOX* est issue de son père qui est de grande taille mais lui aussi dans la limite de la normale : cette même duplication n'est pas reliée à un phénotype de grande taille chez cette patiente (Figure 10).



Figure 10 : Duplication Xp22.33 du gène *SHOX* aboutissant à une analyse quantitative anormale (3 copies *SHOX*) chez l'enfant.

N. Simon Thomas (39) avait émis l'hypothèse que les phénotypes de grande taille pourraient être expliqués par une duplication de la zone régulatrice en 3' du gène (CNE). Cependant le cas décrit par L. Roos (40) ne permet pas de la vérifier. Le lien entre duplications *SHOX* et symptômes cliniques semble donc difficile à établir même si certains auteurs ont déjà exposé plusieurs cas de grande taille : en effet, d'après Ogata (41) l'association d'une duplication SHOX à une délétion de l'X conduisant à une déficience en estrogènes serait l'explication du phénotype de grande taille de certains patients par effet synergique.

4. Mutations ponctuelles :

A ce jour, un grand nombre de mutations ponctuelles ont été identifiées (Annexes 1 à 7).

Ces mutations sont soit des mutations non-sens, c'est-à-dire entraînant une protéine tronquée, soit des mutations faux-sens, remplacement d'un acide aminé par un autre, localisées dans l'homéodomaine qui est le domaine de liaison à l'ADN. Les mutations les plus fréquemment mises en évidence se trouvent dans l'exon 3, exon 4 et exon 5 du gène, la plus fréquente étant R195X (18) conduisant à une protéine tronquée et un phénotype de SLW (18). Il y a actuellement très peu de mutations liées à une atteinte clinique franche répertoriées dans les régions 5' UTR et 3' UTR du gène.

Aucune mutation ponctuelle n'est signalée dans l'exon 1 (non-codant) du gène et un très faible nombre de cas de SLW a été expliqué par des mutations ponctuelles en 5' du gène. Les mutations ponctuelles intragéniques représenteraient 13,9% des anomalies *SHOX* parmi les SLW (12).

e) Corrélation génotype-phénotype :

Le gène SHOX est donc impliqué dans l'ISS, la DSC et le syndrome de Turner qui présentent, chacun, une atteinte clinique très différente (42).

	DSC	Syndrome de Turner	ISS
Petite taille	++	+++	+
Déformation de Madelung	74%	3 à 7%	0
Incurvation du tibia		3%	0
Cubitus valgus	50%	50%	0
Palais ogival	68%	68%	0
Scoliose	5 à 10%	5 à 10%	0
Brièveté des métacarpes	25 à 35%	25 à 35%	0
Micrognathie	25%	25%	0
Mésomélie	+++	+	0
Hypertrophie musculaire	+	0	0

Tableau 6 : variabilité d'expression clinique des 3 syndromes pouvant résulter d'une anomalieSHOX (42).

Il n'existe donc pas de corrélation génotype-phénotype (Tableau 6) ni d'explication quant à la variabilité de manifestation clinique au sein de patients atteints d'une même anomalie chromosomique, même si certaines hypothèses sont avancées (Tableau 7).

Il n'a pas non plus été constaté de différence staturale chez les enfants atteints d'un SLW avec anomalie du gène SHOX en fonction de la provenance maternelle ou paternelle de l'anomalie (7).

	DSC	Syndrome de Turner	ISS
Déformations osseuses	++	+	0
Hypothèses expliquant la variabilité d'expression clinique	Rôle des estrogènes sur la majoration de la sévérité	Dysgénésie gonadique - Anomalie chromosomique en mosaïque avec coexistance d'une lignée normale	Intervention de facteurs ou de gènes modificateurs

Tableau 7 : Hypothèses pouvant expliquer la variabilité d'expression clinique au sein de chaque syndrome (42).

Au sein des anomalies SHOX mises en évidence, il n'a pas été mis en évidence de lien entre la taille de la délétion et le degré d'atteinte clinique (10). L'hétérogénéité phénotypique ainsi que les variations intrafamiliales constatées dans

de nombreuses publications traitant de l'haploinsuffisance SHOX suggèrent qu'il doit exister de nombreuses interactions et modulations de l'expression du gène SHOX. Ceci explique l'intérêt porté pour les régions régulatrices dans plusieurs publications au cours des 5 dernières années (12, 2, et 37, Tableau 24).

f) Intérêt diagnostic de l'exploration du gène SHOX :

La mise en évidence d'une anomalie du gène *SHOX* présente un intérêt certain pour le patient : en effet, le résultat permettra un conseil génétique adapté (mutation *de novo* ou transmission autosomique dominante) ainsi qu'une prise en charge adéquate, ouvrant ou non sur l'indication d'un traitement par hormone de croissance.

Le traitement par hormone de croissance recombinante (rGH) est utilisé en cas :

- de traitement à long terme des enfants atteints d'un retard de croissance lié à un déficit en hormone de croissance normale endogène,
- de retard statural lors d'un Syndrome de Turner,
- de retard statural lors d'une insuffisance rénale chronique chez l'enfant prépubert ou pubert,
- de retard statural non récupéré à la suite d'un RCIU,
- de retard statural associé à un Syndrome de Prader-Willy.

A titre de comparaison, une haploinsuffisance du gène *SHOX* (en raison de la perte ou du réarrangement de l'un des chromosomes X) est mise en évidence chez 66% des patients atteint d'un Syndrome de Turner (les 34% restants, sans anomalie *SHOX* décelée, peuvent être expliqués par les mosaïques de Turner). L'hormone de croissance étant efficace chez les patients de petite taille et porteurs d'un syndrome de Turner (43), il a été supposé que le traitement par hormone de croissance ainsi que sur la taille finale des autres patients présentant une anomalie *SHOX* (44).

En 2007, les résultats d'une étude clinique, l'étude GDFN, randomisée, ouverte, comparant Umatrope[®] (n=27) et absence de traitement (n=25) chez 52 patients avec anomalie du gène SHOX ont été publiés (45). Après 2 ans de traitement, 41 % (n=11) des patients SHOX traités et 4 % (n=1) des non traités avaient une taille normale pour l'âge et le sexe (>-2DS).

De ce fait, en 2008, le laboratoire Lilly a procédé à une demande d'extension d'indication de son hormone de croissance recombinante (Umatrope[®] somatropine) en rappelant que le SLW peut se caractériser par une évolution vers un handicap ou une dégradation marquée de la qualité de vie.

Malgré un service médical rendu jugé modéré, cette demande a été accordée le 16 juillet 2008 par la Commission de Transparence de l'HAS (46) : l'extension

d'indication porte sur le « Traitement des patients ayant un retard de croissance associé à un déficit du gène SHOX (Short Stature HOmeoboX-Containing gene) confirmé par un test ADN » et permet un remboursement à 100% pour les enfants traités en France selon la procédure des médicaments d'exception. La délivrance de ce produit est conditionnée par une prescription initiale hospitalière annuelle réservée aux spécialistes en pédiatrie, ou en endocrinologie et maladies métaboliques exerçant dans les services spécialisés. (**source : Vidal**).

Le diagnostic précoce des anomalies *SHOX* et la mise au point du séquençage ont donc leur intérêt en routine, d'autant plus qu'il n'existe pas de critère clinique permettant de distinguer les bons répondeurs des mauvais répondeurs au traitement par hormone de croissance (51).

II. Matériel et Méthodes :

A. Description de la cohorte :

La cohorte est composée de 125 cas index au 15 février 2010. Ces patients présentent un syndrome de Léri-Weill, ou du moins un phénotype évocateur selon les dossiers, mais un certain nombre de demandes au sujet de patients du type ISS ont aussi été prescrites. Ces prescriptions sont motivées par l'existence d'une petite proportion (2,4%, (20)) d'anomalies hétérozygotes du gène *SHOX* chez les patients atteints de petite taille idiopathique (31).

L'ensemble de ces prélèvements a été adressé au CHU de Nantes soit localement par l'intermédiaire du service de consultation de Pédiatrie, soit en provenance d'autres CHU répartis sur l'ensemble de la France : tous les patients ont été informés de l'objet des recherches génétiques prescrites et ont signé un consentement nous autorisant à explorer leur ADN à des fins diagnostiques. Le recrutement a débuté en mai 2007, quelques temps avant mon arrivée dans le service. J'ai ensuite réalisé l'ensemble des séries MLPA SHOX de mai 2009 à avril 2010.

Lorsqu'une anomalie a été mise en évidence pour un cas index, les prélèvements des parents ont été demandés afin de préciser l'origine de l'anomalie (*de novo* ou héritée) : 21 cas apparentés ont ainsi été analysés.

Afin de classer les patients et de restreindre dans un premier temps le nombre de séquençages aux patients pour lesquels une anomalie SHOX est fortement suspectée, j'ai envisagé la mise en place d'un score clinique (Tableau 8) à titre indicatif : l'amplitude théorique s'étend de 0 à 9 mais tous les scores compris de 6 à 9 sont ramenés à la valeur 5 puisque l'on ne cumule pas la valeur attribuée à un SLW (valeur = 4) avec la valeurs donnée pour la déformation de Madelung (valeur = 3) ni celle donnée pour les déformations osseuses (valeur = 1) puisque les déformations osseuses et/ou de Madelung sont, par définitions, présentes chez un patients porteur d'un SLW.

Il faut bien noter que ce <u>score clinique</u> a été adapté à la sélection des patients pour le séquençage parmi une cohorte de patient à analyser, ce qui est différent d'un score clinique adapté à la prescription d'une exploration *SHOX* parmi la population, il n'est donc <u>en aucun cas destiné à l'usage des prescripteurs</u>.
	LW ou forte suspicion (Madelung, mésomélie, <-2DS)	Déformation de Madelung, clinique ou radiologique (déformation distale du radius)	Autres déformations osseuses	Petite taille < -2DS	Amplitude de Score total
Score attribué par critère clinique	4	3	1	1	0 à 5

Tableau 8 : Score clinique de classification de la cohorte, le score de chaque patient correspond à la somme des valeurs attribuées pour chaque critère clinique avec un plafond fixé à 5.
 Les déformations osseuses comprennent les déformations des 4^{ème} et 5^{ème} métacarpes ainsi que les

Les déformations osseuses comprennent les déformations des 4^{erne} et 5^{erne} métacarpes ainsi que les déformations osseuses des membres autres que la déformation de Madelung.

Les 125 patients de cette étude prospective sont répartis en 3 groupes (Tableau 9): 28 présentent un tableau clinique concordant avec un syndrome de LW fortement probable, 16 peuvent évoquer un Syndrome de LW et 81 sont de type ISS.

	Hommes		Fem	mes	Totaux		
CAS INDEX	VA	%	VA	%	VA	%	
LW fortement probable (score > 3)	12	9.6%	16	12.8%	28	22.4%	
LW évocateur (score compris entre 2 et 3)	3	2.4 %	13	10.4%	16	12.8%	
ISS (score <2)	35	28%	46	36.8%	81	64.8%	
Totaux	50	40%	75	60%	125	100%	

Tableau 9 : Répartition des patients en 3 groupes selon le degré d'atteinte clinique des cas index au sein de la cohorte (<u>hors apparentés</u>).

La moyenne d'âge au sein de la cohorte est sensiblement équivalente entre les deux sexes (13,3 ans), tout en étant légèrement plus élevée pour les hommes. Ce constat peut s'expliquer par l'expression clinique de la DCS généralement plus précoce chez les femmes et donc plus aisée à diagnostiquer chez la petite fille. Les scores cliniques moyens des garçons (1,84) et des filles (1,87) sont toutefois équivalents au sein de la cohorte des cas Index (Tableaux 10 et 11).

CAS INDEX	Hommes	Femmes	Tous confondus	
Moyenne d'âge	13.8	12.6	13.3	
Amplitude des âges	3-40	2-44	2-44	
Taille moyenne (DS)	-2.23 +/- 0.43	-2.11 +/- 0.54	-2.16 +/- 0.50	
Score moyen	1.84	1.87	1.86	

Tableau 10 : Age moyen (en années), taille moyenne (en déviations standards par rapport à la norme française) et score moyen des patients (N = 125) de la cohorte.

Les cas apparentés (N = 21, Tableaux 11 et 12) correspondent le plus souvent aux parents (moyenne d'âge de 37,6 ans) des cas index et sont globalement de taille normale (-0,8 DS). Les scores cliniques moyens sont significativement plus élevé chez la femme (2,29) que chez l'homme (0,71) au sein des apparentés (ce qui est concordant avec l'expression clinique du SLW nettement plus prononcée chez la femme et/ou s'aggravant avec l'âge). Il faut signaler la présence de 5 cas absolument symptomatiques parmi les 21 apparentés. Ces patients ont été analysés après la découverte d'une anomalie chez le cas index correspondant, en vue de déterminer le mode de transmission au sein de la famille (anomalie héritée ou *de novo*).

APPARENTES	Hommes	Femmes	Tous confondus
Moyenne d'âge	37.6	37.6	37.6
Amplitude des âges	2-51	3-53	2-53
Taille moyenne (DS)	-0.5	-1.0	-0.8
Score moyen	0.71	2.29	1.76

Tableau 11 : Age moyen (en années), taille moyenne (en déviations standards par rapport à la norme française) et score moyen des cas apparentés (N = 21) de la cohorte.

	Hommes		Fem	mes	Totaux	
CAS APPARENTES	VA	%	VA	%	VA	%
LW fortement probable (score > 3)	0	0%	6	28%	6	28%
LW évocateur (score compris entre 2 et 3)	1	5%	1	5%	2	10%
ISS (score <2)	3	14%	5	24%	8	38%
Asymptomatiques	3	14%	2	10%	5	24%
Totaux	7	33%	14	67%	21	100%

Tableau 12 : Répartition des patients en 4 groupes selon le degré d'atteinte clinique des cas apparentés au sein de la cohorte.



Figure 11 : Répartition clinique des 125 cas index au sein de la cohorte SHOX de Nantes.

B. Démarche analytique du gène SHOX à Nantes

Lors d'un retard statural, un bilan hormonal et biochimique ainsi qu'un caryotype sont en général prescrits avant de poursuivre davantage les explorations (Figure 12). En cas de bilan hormonal (notamment test de stimulation de la GH) et de caryotype (exclusion d'un syndrome de Turner pour les femmes) normaux, l'exploration se poursuit par l'analyse du gène *SHOX* si des critères cliniques compatibles sont associés à la demande. L'étude du gène *SHOX* se déroule en 3 étapes :

- ➤ extraction,
- ➤ technique MLPA,
- > séquençage des exons 2 à 6a en cas d'absence d'anomalie en MLPA.

Parmi les anomalies *SHOX*, 81% sont des délétions potentiellement diagnostiquées par MLPA, et 19% sont des mutations ponctuelles (7). Seules les mutations ponctuelles ou des délétions de très petite taille peuvent échapper à la première technique : les dossiers des patients rendus sans anomalie en MLPA *SHOX* sont étudiés au cas par cas et inclus pour le séquençage en fonction de leur score clinique, du contexte familial et de la sévérité de l'atteinte.



Figure 12 : Démarche analytique de l'exploration du gène *SHOX* au CHU de Nantes.

C. Technique d'extraction :

Un kit d'extraction d'acides nucléiques se choisit en fonction de plusieurs paramètres :

- Le type de matériel biologique (tissus, bactéries, cellules...)
- La quantité initiale de matériel
- > Le type d'acide nucléique recherché (ADN ou ARN)
- > Le matériel annexe disponible au laboratoire (centrifugeuses)
- > La quantité d'acide nucléique finale nécessaire à l'analyse.

L'analyse moléculaire du gène *SHOX* est réalisée sur l'ADN du patient ainsi que de ses parents. L'acide désoxyribonucléique est ici extrait à partir de sang total prélevé sur tube EDTA. Le procédé consiste en une extraction saline à l'aide du kit Nucleon BACC2[®] (kit commercialisé par GE Healthcare). Ce kit est prévu pour l'extraction d'ADN de cellules sanguines (ADN du noyau des leucocytes) ou de cultures de cellules animales. Ce coffret comporte un réactif A, un réactif B, une solution de perchlorate de sodium ainsi qu'une résine de séparation.

Un certain nombre d'étapes est nécessaire à l'extraction de l'ADN.

Dans un premier temps, le Réactif A (solution de sucre à pH 8) permet la lyse osmotique des cellules sanguines. Les hématies (qui, par définition, ne possèdent pas de sont lysées noyau) et donc solubilisées tandis que les noyaux des leucocytes sont libérés avec le contenu des cytoplasmes cellulaires.

L'ensemble des protéines libres et des noyaux est isolé par centrifugation et repris dans le Réactif B : cette deuxième étape permet de disloquer les membranes nucléaires.

L'ajout de perchlorate de sodium libère l'ADN solubilisé de l'ensemble des ses protéines structure.



L'ajout de chloroforme et de la résine permet la séparation en deux phases par une seconde centrifugation. Le surnageant (phase aqueuse) contient alors l'ADN, cette phase est décantée et l'ADN est précipité par l'ajout d'éthanol froid absolu.

Le flocon est ensuite prélevé, essoré et solubilisé dans une solution de stockage de tampon TE 20:1 (Tris-HCl pH= 7,5 à 20mM et 1mM d'EDTA, le volume est adapté à la concentration en ADN recherchée) : l'EDTA a un rôle inhibiteur des DNAses.

Les concentrations en ADN des extraits sont évaluées par spectromètrie à l'aide d'un Nanodrop. Le profil obtenu permet aussi d'estimer la qualité de l'extrait (contamination par des protéines) à l'aide du rapport Absorbance à 260 nm sur Absorbance à 280 nm.

D. MLPA:

a) Historique :

Cette technique appelée Multiple Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) a été décrite pour la première fois en 2002 (Schouten JP et al. **47**) et à fait l'objet de plus de 150 publications. Schouten y décrivait une nouvelle méthode de quantification relative de 40 séquences différentes d'ADN simultanément. Le multiplexage de l'analyse reposait sur le choix et la conception des sondes puisque les produits de PCR étaient séparés par leur différence de taille.

Cette technique multiplexée permet un gain de temps non négligeable par rapport à d'autres techniques tout en utilisant une très faible quantité d'ADN. La MLPA est utilisée en routine depuis quelques années pour mettre en évidence et caractériser des délétions ou des duplications au sein d'un gène, comme par exemple le gène BRCA1 (Hogervost et al 2003), le gène DMD (Gatta et al 2005) ou encore le gène SHOX depuis mars 2007 au CHU de Nantes.

b) Principe général :

Cette technique est basée sur l'hybridation simultanée de différentes sondes suivie d'une amplification par PCR multiplexe : il est alors possible de comparer le nombre de copies pour un gène cible d'un patient par rapport à un témoin et donc d'en déduire une zone délétée ou dupliquée (Figures 13 à 17).



- 1- Dénaturation de l'ADN (20ng/uL) à 98°C.
- 2- Hybridation des sondes :

3- Ligation :



4- Amplification : une paire d'amorces universelles est utilisée pour amplifier tous les produits de ligation. Chaque produit d'amplification de chaque couple de sondes a une taille unique (130 à 480 bp).



5- Electrophorèse capillaire sur séquenceur : chaque pic est un produit d'amplification d'un couple de sonde.



6- Analyse informatique : les échantillons sont comparés à un échantillon contrôle par superposition des aires de pics, une différence signe une variation du nombre de copies de ce couple de sondes..

Figure 13 : Principe général de la technique MLPA (source : MRC Holland).

Un rapport de 1 entre le pic patient et le pic témoin est normal, un rapport de 1,5 signe une duplication, un rapport de 0,5 signe une délétion hétérozygote et l'absence de pic chez un patient met en évidence une délétion homozygote



Figure 14 : Tracé MLPA *SHOX* obtenu par superposition de l'électrophorégramme patient (rouge) et de celui du témoin normal (bleu) révélant 2 sondes normales (analyse ABI Prism GenScan 3.7 Applied Biosystems).



Figure 15 : Tracé MLPA *SHOX* obtenu par superposition de l'électrophorégramme patient (rouge) et de celui du témoin normal (bleu) révélant 3 sondes délétées de façon hétérozygote et 3 sondes normales (analyse ABI Prism GenScan 3.7 Applied Biosystems).



Figure 16 : Tracé MLPA SHOX obtenu par superposition de l'électrophorégramme patient (rouge) et de celui du témoin normal (bleu) révélant 1 sonde délétée de façon homozygote et 2 sondes normales (analyse ABI Prism GenScan 3.7 Applied Biosystems).



Figure 17 : Tracé MLPA SHOX obtenu par superposition de l'électrophorégramme patient (rouge) et de celui du témoin normal (bleu) révélant 2 sondes dupliquées et 1 sonde normale (analyse ABI Prism GenScan 3.7 Applied Biosystems).

Une éventuelle mutation (ou polymorphisme) contigüe à un site de ligation d'une sonde peut entrainer une diminution du nombre de copies, c'est pourquoi une apparente délétion détectée par une seule sonde demande à être confirmée par une autre technique.

La MLPA nécessite un thermocycleur ainsi qu'un séquenceur et le respect d'un flux adapté pour éviter les contaminations, la MLPA y étant particulièrement sensible.

c) MLPA SHOX :

Le kit MLPA utilisé en routine au CHU de Nantes est le kit SHOX Salsa P18D1 commercialisé par MRC Hollande (Amsterdam). Ce coffret contient 34 sondes spécifiques de la région PAR1 (Figure 18) réparties sur l'ensemble des exons du gène mais aussi dans la zone promotrice ou encore dans la zone régulatrice en aval (37, 38). Un certain nombre de sondes permettent de caractériser une large délétion afin de faire la distinction avec un éventuel Syndrome de Turner (45X0). Le kit contient également 10 sondes contrôles situés sur des régions autosomales.

Les couples de sondes sont régulièrement modifiés par MRC Holland en fonction des avancées des connaissances dans le domaine : un nouveau kit (P18E1, Figure 19) vient par exemple d'être commercialisé début 2010 après la mise en évidence d'un polymorphisme gênant l'interprétation diagnostique au niveau d'un couple de sondes du kit P18D1. Ce nouveau kit devrait permettre de mieux encadrer certains CNE de la région 3' notamment, de ce fait la sensibilité devrait être améliorée.

Selon Falcinelli (15), cette technique permet de détecter 54% des anomalies moléculaires du syndrome de Leri-Weill (publié en 2002 : le mélange de sondes ayant été affiné depuis cette date par MRC Holland, ce pourcentage a probablement augmenté).

Falcinelli a aussi estimé à 19% la proportion de mutations ponctuelles chez les SLW : ceci justifie, une nouvelle fois, la mise au point d'une technique complémentaire comme le séquençage pour les patients de phénotype fortement évocateur et pour lesquels la MLPA n'aurait pas permis de conclure.



Figure 18 : Cartographie des sondes MLPA du kit *SHOX* MRC Holland **P18D1** sur la région PAR1 du chromosome X.



Figure 19: Cartographie modifiée des sondes MLPA du kit *SHOX* MRC Holland **P18E1** sur la région PAR1 du chromosome X.

E. Séquençage :

a) Généralités :

Classiquement, le séquençage d'un exon nécessite la mise au point de la PCR d'amplification correspondante, suivie de la purification des produits d'amplification, d'une réaction de séquence proprement dite et de la purification des produits de séquence, pour finir par le passage sur un séquenceur automatique. L'ensemble de ces manipulations permettent d'obtenir la séquence nucléotidique de l'exon.

b) Technique utilisée :

La technique utilisée met en oeuvre la méthode de Sanger (48) sur séquenceurs ABI Applied Biosystems 3130 disponibles au niveau de la plateforme de séquençage du CHU du Nantes.

c) Mise au point :

Ne disposant pas de mutation connue dans l'exon 1 du gène *SHOX* dans les bases de données et cet exon étant non-codant, il a été décidé de s'intéresser dans un premier temps aux exons 2, 3, 4, 5 et 6a uniquement. Les amorces nécessaires ont été dessinées à l'aide du logiciel Primer3 et ont été synthétisées par la société Eurogentec (Tableau 13). Le passage sur des amorces M13 est prévu par la suite pour l'utilisation de la technique en routine.

Primers	Séquence	Tm	Taille du fragment amplifié	Dénomination du produit amplifié
2aF	GACTGGGACCCTCCTCTCC	56°C	397	2a
2aR	GCGCTGTTATTTACGCCTTT	58°C		
2bF	TCCAATGGAAAGGCGTAAAT	56°C	509	2h
2bR	AGACGGGAGCTGCAAATGT	58°C	509	20
2aF			878	2a∓p
2bR			070	20+0
3F	GTCAAAGCGCATTGGTTTTC	58°C	400	З
3R	GCTGTACGCGTGCTGTGC	60°C	400	5
4-5F	CTGGGTTCACAGGGCTCTT	60°C	070	4 5
4-5R	AAATAGGGGAAAGGGGAAGG	60°C	379	4-5
6aF	AAGAGGCACGTTGGAGGTTT	60°C		
6aR	CGGGGTTGAGTGCAGGAC	60°C	420	6a

Tableau 13 : Tableau des amorces utilisées pour les PCR SHOX.

Il faut noter que pour des raisons de régions riches en GC, il n'a pas été possible de dessiner des amorces 2aR et 2bF de manières optimales, c'est à dire se

chevauchant pour couvrir l'ensemble de la séquence (Figure 20): en effet, la PCR de séquence conduit à la perte de quelques paires de bases en début et en fin de fragment. Nous avons donc procédé à une troisième PCR nommée PCR 2a+b et utilisant les primers 2aF et 2bR afin de récupérer la partie de séquence manquante à l'issue des PCR 2a et 2b de l'exon 2.



Exon 2 du gène SHOX

Figure 20 : Représentation schématique du chevauchement des sondes couvrant l'exon 2 du gène *SHOX*.

Les mises au point ont été démarrées avec une enzyme Taq polymérase standard : le choix s'est porté pour la GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase commercialisée par Promega Corporation pour des raisons de coût et de disponibilité dans le service.

L'essentiel de la mise au point se situe au stade des PCR (Tableau 14) en fonction des particularités de chaque exon. Ainsi, les premières gammes de tests ont été réalisées en jouant sur la concentration en MgCl₂ ainsi que sur la température d'hybridation, le but étant (si possible) de mettre au point l'ensemble des exons avec une température d'hybridation identique. Une température d'hybridation commune rend possible la séquence de plusieurs exons différents sur un même programme de thermocycleur et donc sur les mêmes plages d'utilisation du matériel.

PCR	2a	2b	2a+b*	3	4-5**	6a		
Tampon 5x goTaq		1						
dNTP (mM)		0,2 x 4						
MgCl2 (mM)	1 1,5 1 1,5		1,5	1	1,5			
Primer F (µM)		0,5						
Primer R (µM)		0,5						
DMSO (%)	1		1	1		2		
GoTaq	2 UI/tube							
H2O	qsp 19 μL/tube							

Tableau 14 : Concentrations finales des mix de PCR d'amplification SHOX.

*PCR 2a+b: utilisation des primers 2aF et 2bR,

**PCR 4-5: fragment englobant l'exon 4 et l'exon 5.

A l'issue des tests sur ADN témoin normal (c= 20µg/uL) des PCR, l'amplification correcte des fragments et l'absence d'amplification aspécifique ont été appréciées par migration du produit d'amplification sur gel de polyacrylamide à 6% (Figure 21)



Figure 21 : Contrôle d'amplification (VI= marqueur de taille) après migration sur gel de polyacrylamide 6%

Après avoir déterminé une température d'hybridation commune (59°C, Tableau 15), les différentes conditions de PCR ont été affinées en jouant sur la concentration en MgCl₂, sur le nombre de cycles d'amplification, sur la durée d'hybridation et sur l'utilisation d'adjuvants. Les amplifications 2b et 6a, dont les séquences sont assez riches en GC, ont nécessité l'ajout de DMSO (diméthylsulfoxyde) respectivement à 1 et 2% du mix final dans le but de diminuer les hybridations aspécifiques.

Dénaturation initiale	94°C	2 minutes	
Dénaturation	94°C	30 secondes	
Hybridation	59°C	20 secondes	> 35 cycles
Elongation	72°C	30 secondes	
Elongation finale	72°C	7 minutes	
	15°C	infini	

Tableau 15 : Programme d'amplification commun à toutes les PCR *SHOX* mises au point (2a, 2b, 2a+b, 3, 4-5 et 6a).

d) Purification des produits d'amplification :

Cette étape a pour but de purifier les produits d'amplification de chaque PCR avant de lancer la réaction de séquence proprement dite. Il s'agit ici d'une purification enzymatique mettant en jeu une activité exonucléase (Exo : pour éliminer les amorces libres) et une activité phosphatase (Sap : Shrimp Alkaline Phosphatase, pour retirer les phosphates en 5' des dNTP et donc rendre impossible leur incorporation dans l'ADN).

Cette purification enzymatique (Exo-Sap) nécessite deux incubations successives (Tableau 16): la première à 37°C permettant l'action des enzymes et la seconde à 80°C pour dénaturer les enzymes.

Activité enzymatique	37°C	15 minutes
Dénaturation	80°C	15 minutes
	20°C	infini

Tableau 16 : Programme de purification Exo-Sap sur thermocycleur.

e) Réaction de séquence :

La réaction de séquence est réalisée à l'aide du kit ABI Prism Bigdye Terminator 1.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystem) contenant les ddNTP terminateurs et selon le protocole proposé par le fabriquant en plaques 96 puits (Tableaux 17 et 18). Les amorces sont les mêmes que celles utilisées pour les PCR d'amplification (Tableau 13) à une concentration de 1,6 pM. Pour chaque fragment, deux puits sont nécessaires pour séquencer dans le sens F (« forward ») et dans le sens R (« reverse ») afin d'obtenir les deux séquences complémentaires de chaque région étudiée.

	Volume par puit (μL)
Big Dye Terminator v1,1	1
Tampon 5x Applied	2
Amorce (c= 1,6 pM)	1
H2O	4
Produit de PCR purifié	2

Tableau 17 : Composition du Mix de chaque réaction de séquence.

Dénaturation initiale	96°C	1 min	
Dénaturation	96°C	10 sec	
Hybridation	50°C	5 sec	> 25 cycles
Elongation	60°C	1 min 15 sec	
	20°C	infini	

Tableau 18 : Programme de réaction de séquence sur thermocycleur.

f) Purification des produits de séquence :

Cette dernière étape de purification des produits de réactions de séquences est réalisée par filtration sur gel : le gel utilisé est du Sephadex G50 dont la limite d'exclusion est d'environ 20 bases ce qui permet d'éliminer les dNTP et ddNTP fluorescents. La purification est effectuée en plaque à membrane filtrante Multiscreen Millipore, chargée de G50 : les produits à purifier sont déposés en surface des puits et les produits purifiés sont récupérés en plaque 96 puits après centrifugation et passage forcé au travers du G50.

Les produits de réactions de séquence F et R de chaque fragment sont alors prêts pour leur analyse sur séquenceur.

g) Analyse sur séquenceur capillaire et traitement informatique:

L'analyse est réalisée sur séquenceurs ABI Applied Biosystems 3130 à 16 capillaires. Les paramètres d'injections n'ont pas de particularité par rapport aux analyses de séquences de routine: 1,2Kvolt – 10 secondes. Chaque run de séquence (16 puits analysés) dure environ une heure.

Les données brutes sont ensuite traitées sur le logiciel SeqScape[®] Software v2.5 de la société Applied Biosystems et comparées à un modèle de référence.

Dans une population, un gène est dit polymorphe s'il possède au moins deux allèles ayant une fréquence supérieure ou égale a 1 % : lors de l'analyse des séquences, les polymorphismes au niveau d'une base (SNP : single nucleotide polymorphisms) sont distingués des mutations par consultation des bases de données (logiciel Alamut[®] de Interactive Biosolftware) intégrant la fréquence des SNP au sein d'une population témoin.

Il faut signaler que le modèle SHOX créé dans le logiciel SeqScape[®] comporte un décalage d'une base pour l'ensemble des bases situées en amont de l'A en position 1 de l'exon 2 : en effet, le logiciel décompte à partir de ce cette base la numérotation de la partie non codant en 5' en passant par zéro au lieu d'attribuer directement la position -1 à la base située juste en amont de l'A de l'ATG. L'ensemble des bases en zone 5' non codantes de l'exon 2 se voit donc décalé d'une valeur de +1 dans leur numérotation par rapport à la réalité (et donc par rapport au logiciel Alamut[®]).

Par exemple, le SNP c.277-372G>A situé réellement en position -372 se voit attribuer la numérotation -371 dans le logiciel SeqScape [®].

III. Résultats :

A. Résultats de MLPA :

Les 125 cas index ont donc été analysés dans un premier temps en technique MLPA par série de 10 à 20 patients. Chaque série a systématiquement comporté un Blanc ainsi qu'un patient témoin normal. Nous avons détecté 4 délétions complètes du gène, 8 délétions partielles et 3 duplications (Tableaux 19 et 20). Un certain nombre de polymorphismes ont aussi été mis en évidence chez des cas Index et retrouvés chez leurs apparentés (ces cas, non-pathologiques, ne figurent pas dans le tableau 19). Ces polymorphismes ont été ensuite confirmés par le fabriquant qui adapte les sondes du kit lorsque l'interprétation est litigieuse.

Dans un second temps, 21 apparentés ont été analysés dans le but de déterminé le mode de survenue de l'anomalie découverte (héritée ou *de novo*) chez le cas index correspondant.

	CAS INDEX				Apparenté(s) correspondant(s)			T	
ID	Sexe	Anomalie SHOX	Score	Phénotype	ID	Phénotype	Score	Anomalie SHOX	de l'anomalie
2	F	Délétion	1	Petite taille	135 (père)	ARC	0	Délétion	Anomalie héritée du
	•	Deletion		isolée	136 (mère)	Petite taille	1	RAS	père
4	F	Délétion en 3'	1	Petite taille isolée	х	х	х	Х	х
22	Η	Duplication en 5'	1	Petite taille, ARC	Х	Х	х	Х	х
29	F	Duplication	1	Petite taille	128 (père)	Petite taille	1	Duplication en 3'	Anomalie béritée du
20	•	en 3'		isolée	144 (mère)	RAS	0	RAS	père
					133 (père)	RAS	0	Polymorphisme en 3'	
42	F	Délétion en 3'	4	Madelung et petite taille	129 (mère)	Madelung et petite taille	4	Délétion en 3'	Anomalie héritée de la mère
					143 (sœur)	Petite taille	1	Polymorphisme en 3'	
69	F	Duplication	3	Madelung	Х	Х	Х	Х	Х
70	F	Délétion	4	Madelung et petite taille	Х	х	х	Х	х
73	Н	Délétion en 3'	1	Petite taille, ARC	х	х	х	Х	х
93	Н	Délétion en 3'	1	Petite taille, ARC	х	Х	х	Х	х
99	F	Délétion	4	Madelung et petite taille	134 (mère)	SLW	5	Délétion	Anomalie héritée de la mère
100	F	Délétion	4	Madelung et petite taille	Х	х	х	х	х
110	F	Délétion	1	Petite taille, ARC	Х	Х	х	Х	х
111	Н	Délétion	1	Petite taille isolée	137 (mère)	Madelung et petite taille	4	Délétion	Anomalie héritée de la mère
125	F	Délétion	1	Petite taille, ARC	Х	Х	Х	Х	Х

Tableau 19 : Détail des dossiers pour lesquels une anomalie a été décelée en MLPA, hors polymorphismes (ARC : absence de renseignement clinique).

		Région en 5' du gène	Exon 1	Exon 2	Exon 3	Exon 4	Exon 5	Exon 6	Région en 3' du gène	Score	Séquençage
		J							J		
1										1	
2										1	Dressrit
3										1	Fleschi
4										1	
6										1	
7										1	
8										1	
9										1	
10										2	
11										1	
12										1	
13										1	
14										1	
15										1	
16										1	Dressrit
17										5	Prescrit
10										2	Sélectionné
20										2 1	Selectionine
20										1	
22	2)									1	
23	Ñ									1	Prescrit
24	<u> </u>									1	
25	11									2	Sélectionné
26	Z									1	Sélectionné
27)									4	Sélectionné
28	\sim	-								1	
29	Ω									1	
30										1	
31	Z									4	Selectionne
32	_									4	Selectionne
33										3 4	Sélectionné
35										1	Ociccionne
36	S									1	
37	A (1	
38	0									1	
39										1	
40										1	
41										4	Sélectionné
42										4	
43										1	
44										1	
45										1	Sóloationné
40 ⊿7										4 ⊿	Sélectionné
47										4	Sélectionné
49										1	Selectionine
50										2	
51									İ	1	
52										1	
53										1	Prescrit
54										1	
55										4	Sélectionné
56										1	
57										4	Sélectionné
58				l	l			l		2	Sélectionné

		Région en 5' du gène	Exon 1	Exon 2	Exon 3	Exon 4	Exon 5	Exon 6	Région en 3' du gène	Score	Séquençage 38 patients
50										1	
59										1	Cálostionná
60										4	Selectionne
62										1	Selectionne
62										1	Sáloctionná
64										4	Sélectionné
65										4	Prescrit
66										2	1 rooont
67										1	Sélectionné
68										2	Sélectionné
69										3	Sélectionné
70										4	
71										4	Sélectionné
72										1	Prescrit
73										1	
74										5	Sélectionné
75										1	
76										1	Prescrit
77										1	Prescrit
78										2	
79	[Q]									2	Cálostionná
80	2									2	Selectionne
01	Ň.									1	
02 83										1	
84	Z									2	Sélectionné
85	Ŭ									1	Celeblionne
86	×									2	Prescrit
87	Ш									1	
88										1	
89	Z									2	
90	—									1	
91										2	
92										2	
93	S									1	
94	A C									1	
95	0									1	
96										1	
97										4	Selectionne
98			 			 	 	 		1	
100										4	
100										1	
102										1	Prescrit
103										1	
104										1	
105										1	
106										1	
107										1	
108										1	
109										1	
110										1	
111										1	
112		L								1	
113										1	
114										2	
115		1	1	1	1	1	1	1		1	

		Région en 5' du aène	Exon 1	Exon 2	Exon 3	Exon 4	Exon 5	Exon 6	Région en 3' du aène	Score	Séquençage
	0	<u> </u>							J a		
116										2	
117	×									1	
110										1	
120	Zi NI									2	
120										2	
122	ωÏ									1	
123	E AS									1	
124	O O									1	
125										1	
126										4	
127										0	
128										1	
129										4	
130										4	
131	S									0	
132	Ë									3	
133	z									0	
134										5	
135	⊃, AF	_								0	
136										1	
137	AF C									4	
138										4	
139	S									2	
140	A C									1	
141	Ŭ									1	
142										1	
144										0	
145										0	
146										0	

Délétion
Polymorphisme
Duplication
Normal

La répartition des anomalies relevées figure dans le tableau 21 : on constate 11,2% d'anomalies SHOX à l'issue de l'analyse de première ligne des cas index ce qui est très faible. En effet, alors que l'indication théorique de prescription d'une analyse moléculaire du gène *SHOX* est le dépistage des SLW, un grand nombre de prélèvements de patients présentant peu de signes cliniques sont aussi adressés au laboratoire. Ce faible taux d'anomalies relevées est finalement prévisible compte tenu du score moyen des cas index (score moyen = 1,84) : cette valeur correspond à une cohorte composée majoritairement de patients en ISS (score <2 comme défini par le score clinique mis en place dans cette thèse) par apport au nombre de véritables SLW.

_		Délétions	Duplications	Polymorphismes	Normaux
	Nombre	11	3	13	98
Cas Index	Proportion	8,8%	2,4%	10,4%	78,4%
(N = 125)	Score Moyen	1,82	1,67	1,85	1,46
Cas	Nombre	4	1	5	11
Apparentés (N = 21)	Score Moyen	2,25	1	2,2	1,36

Tableau 21 : Répartition des résultats en technique MLPA au sein de la cohorte.

La proportion d'anomalies parmi les cas apparentés est plus élevée (23,8%) ce qui n'est pas surprenant puisque ces patients ne sont analysés qu'en cas de mise en évidence d'une anomalie chez le cas index correspondant : ce ne sont donc que des résultats de confirmation , il existe un biais évident.

Il faut noter la présence d'une patiente (patiente 69) porteuse une déformation de Madelung pour laquelle une duplication de l'ensemble des exons a été mise en évidence. La duplication n'expliquant pas les signes cliniques de la patiente, il était nécessaire de vérifier l'absence de mutations ponctuelles et d'anomalie cytogénétique qui pourraient être associées à la duplication et qui auraient pu échapper à l'exploration par MLPA. C'est pourquoi les explorations ont été poursuivies chez cette patiente par le séquençage des exons.

B. Résultats du séquençage :

A partir des résultats de MLPA, les dossiers de l'ensemble des patients pour lesquels aucune anomalie n'avait été mise en évidence ont été retraités. Les analyses ont été poursuivies (Tableau 22) dans trois cas de figure :

- pour les patients dont le score était le plus élevé (les scores figurent dans le Tableau 20),
- pour 4 patients dont le score est seulement de 1 mais présentant un retard statural entre -3 et -4DS, avec une notion d'IMC élevé.
- pour les patients dont le dossier comportait déjà une demande de séquençage à la suite du résultat de MLPA.

Nombre de patients	38
Amplitude de score	1 - 5
Score moyen	2,87 +/- 1,46
Amplitude d'âge (années)	6 - 50
Age moyen (années)	16,1 +/- 9,9
Amplitude de taille (DS)	-4 à -2
Taille moyenne (DS)	-2,27 +/- 0,64

Tableau 22 : Age moyen (en années), taille moyenne (DS) et score clinique moyen des patients sélectionnés pour le séquençage du gène *SHOX*.

La représentation de la taille en fonction de l'âge des patients sélectionnés pour le séquençage est cohérente avec l'objectif de cette technique puisque ce sont essentiellement des enfants dont la taille se situe entre -2 et -4DS (Figure 22).



Figure 22 : Représentation de la taille des patients sélectionnés pour le séquençage en fonction de leur âge, Cas Index (N = 36) et Cas Apparentés (N = 2).

Les exons 2 à 6a des 38 patients ont donc été séquencés, seule une mutation ponctuelle a été découverte (patient 33) ce qui est inférieur au chiffre attendu: la sélection des patients n'a en effet pas été aussi stricte qu'elle aurait du l'être puisqu'un certain nombre de patients du groupe ISS ont été intégrés à la demande des cliniciens (Figure 23).

Deux variants (base de données Alamut) sont fréquemment mis en évidence dans notre cohorte : ce sont deux SNP connus et répertoriés, retrouvés soit à l'état hétérozygote soit à l'état homozygote au sein de la cohorte :

- SNP exon 2 (séquence non-codante) :c.-372G>A
- SNP intron 2 : c.277+17T>G



Figure 23: Répartition, en fonction de leur score, des 38 patients sélectionnés pour le séquençage.

C. Patient Muté (patient numéro 33):

L'enfant G. âgé de 6 ans actuellement, est suivi par le Dr Guérin (endocrinopédiatre, CH de Pau) depuis sa naissance pour un retard de croissance intra-utérin (critère clinique de RCIU : poids à la naissance inférieur au 10eme percentile). Cet enfant, né à 39 semaines d'aménorrhée de parents non-consanguins, pesait 2.740kg et mesurait 48 centimètres.

En 2009, il est décidé d'explorer la petite taille : l'enfant présente une brachymétacarpie ainsi qu'une brachyskélie (retard statural dysharmonieux avec membres courts par-rapport au tronc).

Le diagnostic clinique à prédominance mésomélique est fortement en faveur d'un SLW même si ce diagnostic est en général plus difficile à établir chez les jeunes garçons plutôt que chez les jeunes filles.

Le père mesure 160 centimètres (-2,5DS) et présente un phénotype similaire à celui de l'enfant, la mère mesure quant à elle 157 centimètres (-0,5DS) sans particularité clinique.



Figure 24 : Radiographie de l'avantbras et du poignet gauche de l'enfant G. mettant en évidence une incurvation radiale associée à un avant-bras court.

Devant la courbe de croissance qui ne se normalise pas, un bilan complet d'exploration de retard de croissance est alors prescrit en mars 2009: l'aspect radiologique n'est pas typique d'un syndrome de Léri Weill (incurvation radiale, Figure 24, mais pas d'anomalie du rachis lombaire), l'exploration de l'hormone de croissance (test dynamique de la GH sous glucagon/betaxolol) est normal ainsi que le bilan hépatique et rénal.

Une demande d'exploration du gène SHOX est prescrite, et en avril 2009, la technique MLPA est rendue sans anomalie : aucun grand réarrangement n'est décelé. Compte-tenu des informations cliniques associées au prélèvement et de la valeur du score clinique de sélection pour la poursuite des explorations *SHOX* (score = 5 c'est-à-dire score maximal), l'enfant G est inclus dans la cohorte de séquençage.

Les exons 2, 4, 5 et 6a ne présentent aucune particularité en dehors d'un polymorphisme hétérozygote répertorié, en 3' de l'exon 2 : c.277+17T>G.

L'exon 3 présente, quant à lui, un variant hétérozygote en c.424C>T responsable d'une substitution faux-sens de la Proline en position 142 par une Serine (Figure 25). Ce variant n'est pas classé dans les bases de données de mutations *SHOX* disponibles mais se situe au niveau d'une zone très conservée du génome (score 1 pour une échelle de [0-1], source Alamut[®]). Même si aucune cohorte suffisamment importante de témoins n'a pu être testée en criblage pour écarter l'existence d'un SNP (travail en cours dans le service sur 100 ADN témoins), il faut noter que ce variant n'est retrouvé chez aucun autre des *38* patients dont le gène *SHOX* a été séquencé à Nantes. L'acide aminé concerné est lui aussi très conservé au sein des espèces et l'écart physico-chimique entre une Serine et une Proline est important (Distribution de Grantham = 74, [0-215]).

A l'échelle protéique, cette substitution peut potentiellement altérer la structure secondaire et se situe au niveau de l'homéodomaine, zone fonctionnelle essentielle de la protéique *SHOX* pour sa liaison à l'ADN.



Figure 25 : Mise en évidence de l'effet de la mutation c.424C>T au niveau de l'Exon 3 du gène *SHOX* aboutissant au changement protéique p.Pro142Ser (logiciel Alamut[®]).

A la suite de ces résultats, un prélèvement du père a été demandé sur lequel la même anomalie a été mise en évidence. L'ensemble de ces éléments est donc en faveur d'une forte probabilité de lien entre cette mutation hétérozygote et l'atteinte clinique de l'enfant G.

Dans ce cas précis, le séquençage a permis de lancer une prise en charge par hormone de croissance qui n'avait pas pu être déclenchée à la suite du résultat négatif en MLPA compte-tenu des indications strictes de prescriptions.

D. Résultats globaux :

Les résultats globaux de l'analyse *SHOX* (MLPA et séquençage) ont permis de mettre en évidence <u>12% d'anomalies *SHOX* au sein de la cohorte de cas index</u> (Tableau 23). Lorsque l'on examine les résultats par groupe, on retrouve 12,4% d'anomalies chez les patients du groupe ISS (score < 2), 14,3% d'anomalies dans le groupe SLW fortement probable (score >3) mais seulement 6,3% d'anomalies dans le groupe SLW évocateur.

Afin de comparer les résultats avec la littérature, il était nécessaire de distinguer un groupe « ISS » et un groupe « SLW » englobant les SLW fortement probables et aussi les patients ne présentant pas tous signes cliniques d'un SLW mais présentant trop de signes pour être classés dans le groupe ISS. C'est la raison pour laquelle j'ai rapproché les 2 groupes « SLW fortement probable » et « SLW évocateur » en un seul dont la proportion d'anomalies *SHOX* est de 11,4%.

On constate donc, à première vue, peu d'écart de résultats entre les patients adressés en tant que ISS et les patients adressés en tant que SLW, il existe probablement un fort biais de recrutement.

		Délétions	Duplications	Mutations ponctuelles	Del + Dup	Anomalies SHOX	Polymorphismes	Effectif du groupe
ISS	Ν	8	2	0	10	10	8	81
(score <2)	%	9,9%	2,5%	0%	12,4%	12,4%	9,9%	100%
SLW évocateur	Ν	0	1	0	1	1	2	16
(score entre 2 et 3)	%	0%	6,3%	0%	6,3%	6,3%	12,5%	100%
SLW fortement	Ν	3	0	1	3	4	3	28
probable (score >3)	%	10,7%	0%	3,6%	10,7%	14,3%	10,7%	100%
Cohorte	Ν	11	3	1	14	15	13	125
entière	%	8,8%	2,4%	0,8%	11,2%	12%	10,4%	100%

Tous les	Ν	3	1	1	4	5	5	44
SLW (score >2)	%	6,8%	2,3%	2,3%	9,1%	11,4%	11,4%	100,0%

Tableau 23 : Résultats globaux (MLPA et séquençage) d'analyse du gène SHOX de la cohortenantaise de 125 patients.

				SLW			ISS		
	Effectif de la Cohorte	Année	Délétions et Duplications (MLPA, microsatellites)	Mutations ponctuelles (séquençage)	Anomalies SHOX Tous confondus	Délétions et Duplications (MLPA, microsatellites)	Mutations ponctuelles (séquençage)	Anomalies SHOX Tous confondus	Anomalies SHOX tout confondu
Falcinelli et al. (15)	21	2002	48%	14%	62% *	Х	Х	х	х
Schears et al. (14)	7	1998	86%	14%	100% *	Х	Х	х	х
Hubert et al. (13)	16	2001	63%	37%	94% *	Х	Х	x	х
Schiller et al. (10)	32	2000	56%	0%	56% *	Х	Х	х	х
Méta-analyse Falcinelli et al. (15)	67	2002	54%	19%	73% *	Х	Х	x	х
Rappold et al. (20)	900	2002	Х	Х	х	2%	0,4%	2,4% *	х
Stuppia et al., (49)	56	2003	Х	Х	х	7,1%	5,4%	12,5% *	Х
Huber et al. (11)	84 ISS et 56 SLW	2006	Х	Х	68% **	Х	Х	15% **	39% **
Sabherwal et al. (12)	122	2007	42%***	14%	46% **	Х	Х	Х	Х
Rappold et al. (8)	1553 ISS et 55 LW	2007	Х	Х	58% *	Х	Х	2,2%*	4,2%*
Chen et al. (2)	740 ISS et 67 LW	2009	43,3	13,4	56,7%**	4,2%	0,7%	4,9%**	52%**
Cohorte Nantes	81 ISS et 44 LW	2010	9,1%	2,3%	11,4%**	12,4%	0%	12,4%**	12%**

Tableau 24 : Résultats globaux de la cohorte confrontés aux résultats des anomalies SHOX de la littérature.

* exploration des exons 2 à 6a du gène SHOX

** exploration des exons 2 à 6a et des délétions de la région régulatrice en 3' (hors mutations ponctuelles)
*** les délétions de la région régulatrice en 3' représenteraient 3,3% des anomalies SHOX chez les SLW relevées par Sabherwal et al.

IV. Discussion :

A. Confrontation des résultats avec les données de la littérature :

L'ensemble des données issues de notre cohorte nantaise sont confrontées aux principales publications reconnues dans le domaine au sein du Tableau 24. A partir de ces données, j'ai envisagé de comparer les résultats de la cohorte nantaise à une cohorte SLW puis à trois cohortes ISS.

LW		Effectif de la Cohorte	Recrutement	Total des Anomalies	Grands réarrangements	Mutations ponctuelles (séquençage)
Chen et al. (2)	2009	67	LW	56,7%**	43,3%	13,4%
Cohorte Nantes	2010	44	LW	11,4%**	9,1%	2,3%

a) Cohorte « SLW » de la littérature :

Tableau 25 : Comparaison des résultats de la cohorte Nantaise face à la littérature en terme de recrutement de patients pour lesquels un SLW peut être évoqué.

* exploration des exons 2 à 6a du gène SHOX.

** exploration des exons 2 à 6a et des délétions de la région régulatrice en 3' (hors mutations ponctuelles).

Lorsque l'on compare nos résultats du groupe SLW à la récente cohorte de Chen 2009 (Tableau 25), la proportion d'anomalies *SHOX* parmi les SLW suspectés dans la cohorte nantaise est très faible malgré des techniques d'exploration similaires. Une grande partie des patients classés en SLW seraient en réalité des patients du groupe ISS si l'on se réfère aux fréquences données par les publications (Tableau 24). Il y aurait à priori beaucoup moins de SLW fortement évocateurs dans notre cohorte que ce que les prescripteurs nous ont signalé (théoriquement, 22,4% de SLW selon les informations cliniques).

Ce constat vient confirmer la présence d'un <u>biais de recrutement au niveau</u> <u>des patients étiquetés « SLW probables »</u>.

b) Cohortes « ISS » de la littérature :

ISS		Effectif de la Cohorte	Recrutement	Total des Anomalies	Grands réarrangements	Mutations ponctuelles (séquençage)
Hubert et al. (11)	2006	84	ISS	15%**	Х	Х
Chen et al. (2)	2009	740	ISS	4,9%**	4,2%	0,7%
Rappold et al. (20)	2002	900	ISS	2,4%*	2%	0,4%
Cohorte Nantes	2010	81	ISS	12,4%**	12,4%	0%

Tableau 26 : Comparaison des résultats de la cohorte Nantaise face à la littérature en terme de recrutement de patients de petite taille idiopathique (groupe ISS).

*exploration des exons 2 à 6a du gène SHOX.

** exploration des exons 2 à 6a et des délétions de la région régulatrice en 3' (hors mutations ponctuelles).

Lorsque l'on compare nos résultats du groupe ISS aux cohortes correspondantes de Hubert 2006, de Chen 2009 et de Rappold 2002 (Tableau 26), la proportion de la cohorte nantaise est bien supérieure à la proportion admise d'anomalies *SHOX* parmi des ISS. Ceci est en partie expliqué par l'exploration des délétions en régions régulatrices (MLPA) qui n'étaient pas couvertes par Rappold en 2002 avec 2,4% d'anomalies au sein des exons du gène *SHOX* parmi les ISS. La récente publication de Chen de 2009 tient compte des délétions de régions régulatrices : il est donc possible d'admettre que la proportion attendue d'anomalies SHOX parmi les ISS se situe entre 2,4 et 4,9%. Notre résultat est donc bien supérieur à ce que l'on devrait observer sur une cohorte ISS.

Le chiffre obtenu pour la cohorte nantaise est comparable à celui obtenu par Hubert en 2006 dont la cohorte comportait un biais de recrutement. Hubert avait expliqué ce biais par l'inclusion de patients porteurs d'un SLW mais encore trop jeunes pour être cliniquement diagnostiqués avec certitude (11). C'est probablement aussi le cas dans notre cohorte nantaise.

c) Synthèse :

A la suite de l'exploration *SHOX* de notre cohorte nantaise, on observe un grand nombre de cas inexpliqués et globalement beaucoup moins de SLW que la proportion attendue par les prescripteurs (selon les informations cliniques données). De plus, au sein du groupe ISS, un certain nombre de SLW sont probablement étiquetés à tort en ISS. Ceci peut être expliqué du fait :

- de <u>l'absence de renseignement clinique</u>: un grand nombre de prescripteurs ne renseignent que la taille de l'enfant, sans autre précision. Ils disposent alors du bon diagnostic, ou du moins d'informations qui auraient pu élever le score du patient, mais ne nous transmettent que des informations très partielles biaisant l'étude,
- du <u>score de sélection</u> des patients à séquencer : ce score n'est, en effet, pas adapté à l'évaluation clinique pour orienter ou non vers une demande d'exploration du gène SHOX, il est uniquement adapté à sélectionner les patients au sein d'une cohorte supposée être composée de patients ayant une atteinte clinique,
- et/ou de l'absence de certains signes cliniques lors de la consultation : en effet, la mésomélie et les déformations de Madelung sont parfois difficiles à mettre en évidence chez les très jeunes enfants, c'est pourquoi il est nécessaire de demander les radiographies (avant-bras, rachis lombaire) du cas index mais aussi du ou des parents de petites tailles afin de ne pas manquer une <u>forme frustre</u> ou encore peu symptomatique chez l'enfant.

Par ailleurs, lors de l'analyse des anomalies *SHOX* chez des patients atteints d'un SLW, il est établi que 81% des anomalies décelées sont des délétions et que 19% des anomalies sont des mutations ponctuelles (7) : les résultats de notre mise au point ont permis d'obtenir 15 anomalies au sein de la cohorte dont 11 délétions, 3 duplications et 1 mutation ponctuelle. Si l'on exclut les duplications (dont l'implication dans les formes cliniques n'est pas claire), on obtient respectivement 92% de délétions et 8% de mutations ponctuelles dans notre étude. Compte tenu du faible nombre total d'anomalies ne permettant pas de réaliser un calcul fiable, on peut considérer que nos techniques (MLPA et séquençage) donnent des résultats du même ordre d'idée que la littérature même si le taux de mutations ponctuelles est un peu faible.
B. Ouverture et perspectives :

Un certain nombre de régions explorées en techniques MLPA ne sont pas couvertes par le séquençage décrit dans cette étude, les mutations ponctuelles n'y sont donc pas décelées : ces régions en question sont celles du promoteur ainsi que les régions régulatrices (CNE) en 5' et en 3' du gène. Selon les données actuellement disponibles (Tableau 24), les anomalies *SHOX* seraient mises en évidence dans 60 à 100% des cas de SLW : il y aurait donc jusqu'à 40% des SLW inexpliqués à l'issue de l'exploration des exons du gène *SHOX*. De plus, l'absence de corrélation génotype-phénotype et d'explication quant à la variabilité de manifestation clinique demeure : les hypothèses du rôle des régions régulatrices ou de l'intervention d'un autre gène dans l'expression clinique des SLW ont été avancées. Une analyse de liaison de V. Cormier avait permis d'exclure le locus SHOX dans deux familles de DCS suggérant l'implication d'un ou d'autres gènes (50). Un travail dans ce domaine pourrait être intéressant.

D'après les données actuelles (12, 2), il n'y aurait pas d'anomalie formellement identifiée au niveau du promoteur ni des régions régulatrices en 5' en lien avec un phénotype de petite taille, contrairement à certains CNE de la région régulatrice en 3' du gène. C'est pourquoi, la mise au point du séquençage des CNE 5, CNE 7, CNE 8 et CNE 9 est en cours dans le Laboratoire de génétique du CHU de Nantes dans le but de pouvoir proposer une exploration des anomalies *SHOX* la plus complète possible. Cette recherche est importante pour les patients puisque la mise en évidence d'une anomalie moléculaire du gène *SHOX* est indispensable pour déclencher la prise en charge thérapeutique en France.

Par ailleurs, un travail devait être mené afin de réduire le biais lié au recrutement constaté dans cette étude. Il est donc nécessaire de mettre en place une fiche de renseignements cliniques devant accompagner les demandes d'exploration : un score adapté à la prescription de l'exploration SHOX au sein de la population de petite taille devrait permettre de réduire les demandes injustifiées. Un certain nombre de critères sont disponibles dans la littérature :

- une déformation de Madelung doit, par exemple, déclencher d'emblée une exploration,
- un IMC supérieur au 50^{eme} percentile permet notamment de sélectionner efficacement les ISS avec déficience du gène SHOX des autres ISS (8),
- les radiographies des apparentés doivent être réalisées afin de dépister les anomalies difficiles à mettre en évidence chez les jeunes enfants,
- les mesures anthropologiques sont indispensables pour la mise en place du score clinique (envergure et rapport taille assise sur taille),

Un projet de bon de demande associé à un calcul de score inspiré de la publication de Rappold de 2007 a donc été proposé à l'issue de ce travail (Annexe 8) et devra être évalué dans les mois à venir.

C. Conclusion :

Globalement, et même si le nombre d'anomalies du gène SHOX décelées est plus faible que le chiffre attendu, les objectifs de ce mémoire ont été remplis.

- En effet, l'étude a permis de mettre au point le séquençage des exons en vue de son utilisation en routine.
- Les résultats ont eu un effet bénéfique direct pour l'enfant chez qui la mutation ponctuelle de l'exon 3 a été mise en évidence (proposition de prise en charge et remboursement du traitement par hormone de croissance), et pour lequel il y a de grandes chances que ce traitement ait une répercussion favorable sur sa taille adulte.
- Ce travail a aussi démontré qu'il est nécessaire, dès maintenant, de cadrer les prescriptions : en effet, le nombre de demandes d'exploration SHOX a explosé en fin d'année 2009 et il est impératif pour le laboratoire du CHU de Nantes d'avoir des critères de sélection et de priorité, afin de traiter le volume d'analyses dans un délai acceptable.

Les deux prochains objectifs à court terme, pour le laboratoire de Génétique Moléculaire du CHU de Nantes dans le domaine du gène *SHOX*, seront le séquençage des régions régulatrices en 3' ainsi que l'évaluation du score clinique: il devient essentiel que les prescripteurs participent au renseignement du bon de demande, tant pour la bonne marche du diagnostic de laboratoire que pour les patients.

V. Table des Figures :

Figure 1 : Radiographie des avant-bras (Madelung) patiente 70	13
Figure 2 : Principaux syndromes dans le contexte SHOX	18
Figure 3 : Schéma chromosomes X et Y, PAR1	19
Figure 4 : Evolution de la région critique SHOX	20
Figure 5 : Représentation schématique du gène SHOX	22
Figure 6 : Représentation schématique du gène SHOX et	
des régions régulatrices	24
Figure 7 : CNE en 3' du gène SHOX	26
Figure 8 : CNE en 5' du gène SHOX	28
Figure 9: Anomalies parentales (délétion + duplication)	30
Figure 10: Anomalies parentales (duplication)	31
Figure 11 : Répartition clinique des 125 cas index	38
Figure 12 : Démarche analytique d'exploration	40
Figure 13 : Principe général de la MLPA	43
Figure 14 : Tracé MLPA (normal)	44
Figure 15 : Tracé MLPA (délétion hétérozygote)	44
Figure 16 : Tracé MLPA (délétion homozygote)	45
Figure 17 : Tracé MLPA (duplication)	45
Figure 18 : Cartographie des sondes MLPA (kit P18D1)	47
Figure 19: Cartographie des sondes MLPA (kit P18E1)	48
Figure 20 : Chevauchement des sondes couvrant l'exon 2	50
Figure 21 : Contrôle d'amplification sur gel de polyacrylamide	51
Figure 22 : Représentation de la taille en fonction de	
l'age des cas index	62
Figure 23 : Répartition (score) des patients sélectionnés pour	
le séquençage	63
Figure 24 : Radiographie de l'avant-bras du patient 33	64
Figure 25 : Effet de la mutation c.424C>T au niveau protéique	66

VI. Table des Tableaux :

Tableau 1 : Principales causes de retard de croissance	9
Tableau 2: Bilan initial d'exploration d'un retard de croissance	10
Tableau 3 : Interprétation des tests de stimulation de la GH	16
Tableau 4 : Localisation des exons du gène SHOX	.22
Tableau 5 : Corrélation des anomalies des CNE en 3' et symptomatologie	27
Tableau 6 : Variabilité d'expression clinique	32
Tableau 7: Hypothèses d'explication des variations d'expression clinique	32
Tableau 8: Score clinique de sélection au séquençage	36
Tableau 9: Répartition des cas Index en 3 groupes	36
Tableau 10: Age, taille et score moyens (cas Index)	37
Tableau 11: Age, taille et score moyens (cas Apparentés)	.37
Tableau 12 : Répartition des cas Apparentés en 3 groupes	38
Tableau 13 : Amorces de PCR de séquence SHOX	49
Tableau 14 : Composition des mix de PCR SHOX	51
Tableau 15 : Programme d'amplification SHOX	52
Tableau 16 : Programme de purification de séquence SHOX	.52
Tableau 17 : Composition du mix de réaction de séquence SHOX	53
Tableau 18 : Programme de réaction de séquence SHOX	53
Tableau 19: Détail des dossiers cliniques (anomalies MLPA)	56
Tableau 20 : Résultats MLPA des 146 patients (index et apparentés)	57
Tableau 21 : Répartition des résultats MLPA au sein de la cohorte	60
Tableau 22 : Age, taille et score moyens (séquençage)	61
Tableau 23 : Résultats globaux de la cohorte	67
Tableau 24 : Résultats globaux confrontés à la littérature	68
Tableau 25 : Comparaison de cohortes SLW	.69
Tableau 26 : Comparaison de cohortes ISS	.70

VII. Annexes :

	ADN	Protéine	Variant	Atteinte clinique	Auteur	Domaine aff	iecté	Origine éthnique	Nb de cas reportés
3'UTR Exon 6a	c.*16C>G			ISS	S. Souza (NP)			Inconnue	1
3'UTR Exon 6a	c.*365_366delAG			LWD	SHOX Lab Heidelberg (NP)			Caucasien	2
3'UTR Exon 6a	c.*1524C>T			LWD	SHOX Lab Heidelberg (NP)			Caucasien	3
3'UTR Exon 6b	c.*60C>T			LWD	SHOX Lab Heidelberg (NP)			Caucasien	1
3'UTR Exon 6b	c.*146G>C			ISS	SHOX Lab Heidelberg (NP)			Caucasien	1
5'UTR Exon 2	c428A>G			ISS	Rappold et al. (2002)			Asian	4
5'UTR Exon 2	c352delC			LWD	SHOX Lab Heidelberg (NP)			Caucasien	1
5'UTR Exon 2	c65C>A			LWD	Grigelioniene et al. (2001)			Caucasien	1
5'UTR Exon 2	c55C>T			ISS, LWD	S. Souza (NP), SHOX Lab Heidelberg (NP), Rappold et al. (2002)			Inconnue	3

Annexe 1 : Tableau récapitulatif des anomalies ponctuelles des régions 5'UTR et 3'UTR du gène *SHOX* (d'après la base de données Shox database). NP : non-publié , CP : communication personnelle , **Variants** : variants les plus fréquemment cités dans la littérature.

	ADN	Protéine	Variant	Atteinte clinique	Auteur	Domaine affecté	Origine éthnique	Nb de cas reportés
Intron 1	c432-96G>A			LWD	SHOX Lab Heidelberg (NP)		Caucasien	1
Intron 1	c432-84C>G			LWD	SHOX Lab Heidelberg (NP)		Caucasien	25
Intron 2	c.277+1G>A			LWD	S. Thomas (NP)		Caucasien	1
Intron 2	c.278-15C>A			ISS	SHOX Lab Heidelberg (NP)		Caucasien	2
Intron 2	c.278-1G>A			LWD	Flanagan et al. (2002)		Inconnue	1
Intron 3	c.486+27G>A			LWD	SHOX Lab Heidelberg (NP)		Caucasien	1
Intron 3	c.487-29C>T			ISS	SHOX Lab Heidelberg (NP)		Caucasien	3
Intron 3	c.487-2A>G			LWD	SHOX Lab Heidelberg (NP)		Caucasien	1
Intron 4	c.544+32G>C			ISS	SHOX Lab Heidelberg (NP)		Caucasien	1
Intron 4	c.545-57C>T			ISS	SHOX Lab Heidelberg (NP)		Inconnue	3
Intron 5	c.634-2A>G			LWD	SHOX Lab Heidelberg (NP)		Caucasien	1

Annexe 2 : Tableau récapitulatif des anomalies ponctuelles des introns du gène *SHOX* (d'après la base de données Shox database). NP : non-publié , CP : communication personnelle , **Variants** : variants les plus fréquemment cités dans la littérature.

	ADN	Protéine	Variant	Atteinte clinique	Auteur	Domaine affecté	Origine éthnique	Nb de cas reportés
Exon 2	c.2T>C	p.Met1?		LWD	Wasniewska et al. (2009)		Caucasien	1
Exon 2	c.56G>A	p.Gly19Asp		ISS	SHOX Lab Heidelberg (NP)		Caucasien	1
Exon 2	c.61_66delGGCGGA	p.Gly21_Gly22del		ISS	SHOX Lab Heidelberg (NP)		Caucasien	5
Exon 2	c.72_77dupAGGCGG	p.Gly27_Gly28dup		LWD	Benito-Sanz et al. (2006)		Caucasien	1
Exon 2	c.79G>T	p.Gly27*		LWD	SHOX Lab Heidelberg (NP)	Protéine tronquée	Caucasien	1
Exon 2	c.86A>C	p.Lys29Thr	K29T	ISS	SHOX Lab Heidelberg (NP), S. Thomas (NP), S. Kant (CP)		Caucasien	12
Exon 2	c.105C>A	p.Tyr35*	Y35X	LWD	Flanagan et al. (2002), Huber et al. (2006), S. Thomas (NP), Souza et al. (2006)	Protéine tronquée	Caucasien	4
Exon 2	c.106_107delCG	p.Arg36Glyfs*42		LWD	Huber et al. (2001)	Protéine tronquée	Caucasien	1
Exon 2	c.118G>T	p.Glu40*		LWD	S. Thomas (NP)	Protéine tronquée	Caucasien	1
Exon 2	c.131_141delCGCGCTCCCGG	p.Ala44Glyfs*31		LWD	Grigelioniene et al. (2001)	Protéine tronquée	Caucasien	1
Exon 2	c.178A>C	p.Thr60Pro	T60P	ISS	Huber et al. (2006)		Caucasien	1
Exon 2	c.181delG	p.Glu61Argfs*15		LWD	Grigelioniene et al. (2000)	Protéine tronquée	Caucasien	1
Exon 2	c.181G>T	p.Glu61*	E61X	LWD	Rappold et al. (2007), Schiller et al. (2000)	Protéine tronquée	Caucasien	3
Exon 2	c.210G>A	p.Leu70Leu		ISS	SHOX Lab Heidelberg (NP)		Caucasien	1
Exon 2	c.252delA	p.Glu84Aspfs*21		LWD	S. Thomas (NP)	Protéine tronquée	Caucasien	1
Exon 2	c.274G>T	p.Glu92*	E92X	LWD	Huber et al. (2006)	Protéine tronguée	Caucasien	1

Annexe 3 : Tableau récapitulatif des anomalies ponctuelles de l'exon 2 du gène *SHOX* (d'après la base de données Shox database). NP : non-publié , CP : communication personnelle , **Variants** : variants les plus fréquemment cités dans la littérature.

	ADN	Protéine	Variant	Atteinte clinique	Auteur	Domaine affecté		Origine éthnique	Nb de cas reportés
Exon 3	c.278G>A	p.Gly93Glu	G93E	ISS	Messina et al. (2008)			Caucasien	1
Exon 3	c.301C>A	p.Arg101Ser		LWD	SHOX Lab Heidelberg (NP)			Caucasien	1
Exon 3	c.304G>T	p.Glu102*	E102X	LWD	Binder et al. (2004)		Protéine tronquée	Caucasien	1
Exon 3	c.334C>T	p.Gln112*	Q112X	LWD	Huber et al., (2001)	Homeodomaine (c.322 à c.543)	Protéine tronquée	Caucasien	2
Exon 3	c.335A>C	p.Gln112Pro	Q112P	ISS	Rappold et al. (2007)	Homeodomaine (c.322 à c.543)		Caucasien	1
Exon 3	c.340A>T	p.Lys114*		LWD	S. Thomas (NP)	Homeodomaine (c.322 à c.543)	Protéine tronquée	Caucasien	1
Exon 3	c.341dupA	p.Leu115Alafs*67		LWD	M. Baffico (NP)	Homeodomaine (c.322 à c.543)	Protéine tronquée	Caucasien	1
Exon 3	c.346A>G	p.Lys116Glu	K116E	ISS	Rappold et al. (2007)	Homeodomaine (c.322 à c.543)		Caucasien	1
Exon 3	c.352_353delAG	p.Arg118Alafs*63		LWD	S. Thomas (NP)	Homeodomaine (c.322 à c.543)	Protéine tronquée	Caucasien	1
Exon 3	c.352_353dupAG	p.Arg119Glyfs*12		LWD	Zinn et al. (2002)	Homeodomaine (c.322 à c.543)	Protéine tronquée	Inconnue	1
Exon 3	c.355C>G	p.Arg119Gly	R119G	LWD	Binder et al. (2004)	Homeodomaine (c.322 à c.543)		Caucasien	1
Exon 3	c.358delA	p.Ser120Alafs*10		LWD	Ross et al. (2001)	Homeodomaine (c.322 à c.543)	Protéine tronquée	Caucasien	1
Exon 3	c.359delG	p.Ser120Thrfs*10		LWD	S. Thomas (NP)	Homeodomaine (c.322 à c.543)	Protéine tronquée	Caucasien	1
Exon 3	c.374delC	p.Thr125Serfs*5		LWD	Falcinelli et al. (2002)	Homeodomaine (c.322 à c.543)	Protéine tronquée	Caucasien	1
Exon 3	c.380delA	p.Glu127Glyfs*3		LWD	Huber et al. (2006)	Homeodomaine (c.322 à c.543)	Protéine tronquée	Caucasien	1
Exon 3	c.382C>A	p.Gln128Lys		LWD	SHOX Lab Heidelberg (NP)	Homeodomaine (c.322 à c.543)		Caucasien	1
Exon 3	c.383A>T	p.Gln128Leu	Q128L	LWD	Grigelioniene et al. (2001), Ross et al. (2001)	Homeodomaine (c.322 à c.543)		Caucasien	2
Exon 3	c.394C>G	p.Leu132Val	L132V	LWD	Grigelioniene (2000), Schneider et al. (2005)	Homeodomaine (c.322 à c.543)		Caucasien	3
Exon 3	c.397G>A	p.Glu133Lys		LWD	SHOX Lab Heidelberg (NP)	Homeodomaine (c.322 à c.543)		Caucasien	2

Annexe 4 : Tableau récapitulatif des anomalies ponctuelles de l'exon 3 du gène *SHOX* (d'après la base de données Shox database). NP : non-publié , CP : communication personnelle , **Variants** : variants les plus fréquemment cités dans la littérature.

	ADN	Protéine	Variant	Atteinte clinique	Auteur	Domaine aff	ecté	Origine éthnique	Nb de cas reportés
Exon 3	c.400C>A	p.Arg134Arg		ISS	SHOX Lab Heidelberg (NP)	Homeodomaine (c.322 à c.543)		Caucasien	3
Exon 3	c.401G>C	p.Arg134Pro	R134P	LWD	Binder et al. (2004)	Homeodomaine (c.322 à c.543)		Caucasien	1
Exon 3	c.406T>C	p.Phe136Leu	F136L	LWD	Falcinelli et al. (2002)	Homeodomaine (c.322 à c.543)		Caucasien	1
Exon 3	c.408_408delCins9	p.Asp137Thrfs*58		LWD	S. Thomas (NP)	Homeodomaine (c.322 à c.543)	Protéine tronquée	Caucasien	1
Exon 3	c.409G>A	p.Asp137Asn		ISS	Wohlleber (CP)	Homeodomaine (c.322 à c.543)		Caucasien	1
Exon 3	c.421T>G	p.Tyr141Asp	Y141N	ISS	Schneider et al. (2005)	Homeodomaine (c.322 à c.543)		Caucasien	2
Exon 3	c.440G>A	p.Arg147His	R147H	ISS	Souza et al. (2006)	Homeodomaine (c.322 à c.543)		Inconnue	11
Exon 3	c.440G>C	p.Arg147Pro	R147P	LWD	Ross et al. (2005)	Homeodomaine (c.322 à c.543)		Caucasien	2
Exon 3	c.442G>T	p.Glu148*	E148X	LWD	Rappold et al. (2007)	Homeodomaine (c.322 à c.543)	Protéine tronquée	Caucasien	3
Exon 3	c.445G>T	p.Glu149*	E149X	LWD	Huber et al. (2001)	Homeodomaine (c.322 à c.543)	Protéine tronquée	Caucasien	2
Exon 3	c.454C>T	p.Gln152*		LWD	SHOX Lab Heidelberg (NP)	Homeodomaine (c.322 à c.543)	Protéine tronquée	Caucasien	1
Exon 3	c.457C>G	p.Arg153Gly	R153G	LWD	Falcinelli et al. (2002), Stuppia et al. (2003)	Homeodomaine (c.322 à c.543)		Caucasien	4
Exon 3	c.457C>T	p.Arg153Cys	R153C	LWD	Zinn et al. (2002)	Homeodomaine (c.322 à c.543)		Inconnue	1
Exon 3	c.458G>T	p.Arg153Leu	R153L	LWD	Grigelioniene et al. (2000)	Homeodomaine (c.322 à c.543)		Caucasien	1
Exon 3	c.461T>C	p.Leu154Pro	L154P	LWD	Ross et al.(2001)	Homeodomaine (c.322 à c.543)		Caucasien	2
Exon 3	c.463G>C	p.Gly155Arg	G155R	LWD	Huber et al. (2006)	Homeodomaine (c.322 à c.543)		Caucasien	1
Exon 3	c.478C>G	p.Arg160Gly	R160G	LWD	J. Trübenbach (2008)	Homeodomaine (c.322 à c.543)		Caucasien	1
Exon 3	c.481_482dupGT	p.Gln162Cysfs*31		LWD	Huber et al. (2001)	Homeodomaine (c.322 à c.543)	Protéine tronquée	Caucasien	1
Exon 3	c.482T>C	p.Val161Ala	V161A	LWD	Binder et al. (2004)	Homeodomaine (c.322 à c.543)		Caucasien	1

Annexe 5 : Tableau récapitulatif des anomalies ponctuelles de l'exon 3 du gène *SHOX* (d'après la base de données Shox database). NP : non-publié , CP : communication personnelle , **Variants** : variants les plus fréquemment cités dans la littérature.

	ADN	Protéine	Variant	Atteinte clinique	Auteur	Domaine affecté		Origine éthnique	Nb de cas reportés
Exon 4	c.487G>T	p.Val163Phe	V163F	LWD	Zinn et al. (2002)	Homeodomaine (c.322 à c.543)		Inconnue	1
Exon 4	c.492G>A	p.Trp164*	W164X	ISS	Rappold et al. (2007), Huber et al. (2006)	Homeodomaine (c.322 à c.543)	Protéine tronquée	Caucasien	3
Exon 4	c.494T>C	p.Phe165Ser		LWD	S. Thomas (NP)	Homeodomaine (c.322 à c.543)		Inconnue	1
Exon 4	c.499A>G	p.Asn167Asp		LWD	S. Thomas (NP)	Homeodomaine (c.322 à c.543)		Caucasien	1
Exon 4	c.502C>T	p.Arg168Trp	R168W	LWD	Binder et al. (2004), Schneider et al. (2005), Fukami et al. (2004), Huber et al. (2006)	Homeodomaine (c.322 à c.543)		Caucasien	9
Exon 4	c.503G>T	p.Arg168Leu	R168L	ISS	Rappold et al. (2007)	Homeodomaine (c.322 à c.543)		Caucasien	1
Exon 4	c.506G>A	p.Arg169Lys		LWD	S. Thomas (NP)	Homeodomaine (c.322 à c.543)		Caucasien	1
Exon 4	c.508G>C	p.Ala170Pro	A170P	ISS, LWD	Sabherwal et al. (2004), Schneider et al. (2005), Benito-Sanz et al. (2006)	Homeodomaine (c.322 à c.543)		Caucasien	3
Exon 4	c.516C>A	p.Cys172*		LWD	S. Thomas (NP)	Homeodomaine (c.322 à c.543)	Protéine tronquée	Caucasien	2
Exon 4	c.517C>T	p.Arg173Cys	R173C	LWD	Huber et al. (2001), Shears et al. (2002)	Homeodomaine (c.322 à c.543)		Caucasien	6
Exon 4	c.518G>A	p.Arg173His	R173H	LWD	Schneider et al. (2005), Binder et al. (2004)	Homeodomaine (c.322 à c.543)		Caucasien	2
Exon 4	c.518G>T	p.Arg173Leu	R173L	LWD	S. Thomas (NP)	Homeodomaine (c.322 à c.543)		Caucasien	1

Annexe 6 : Tableau récapitulatif des anomalies ponctuelles de l'exon 4 du gène *SHOX* (d'après la base de données Shox database). NP : non-publié , CP : communication personnelle , **Variants** : variants les plus fréquemment cités dans la littérature.

	ADN	Protéine	Variant	Atteinte clinique	Auteur	Domaine at	ffecté	Origine éthnique	Nb de cas reportés
Exon 5	c.547G>A	p.Val183lle		ISS	SHOX Lab Heidelberg (NP)			Caucasien	5
Exon 5	c.583C>T	p.Arg195*	R195X	ISS, LWD	Rao et al. (1997), Belin et al. (1998), Clement - Jones et al. (2000), Flanagan et al. (2002), Ross et al.(2001), Grigelioniene et al. (2001), Fukami et al. (2004)		Protéine tronquée	Asiatique et Caucasien	13
Exon 5	c.596_597dupAC	p.Val200Thrfs*41		LWD	SHOX Lab Heidelberg (NP)		Protéine tronquée	Caucasien	1
Exon 5	c.597C>G	p.Tyr199*	Y199X	LWD	Shears et al. (1998)		Protéine tronquée	Caucasien	1
Exon 5	c.604delA	p.Met202Trpfs*38		ISS	Shanske et al. (2006)		Protéine tronquée	Caucasien	1
Exon 5	c.606G>A	p.Met202IIe		ISS	Pitore (CP)			Inconnue	1
Exon 6a	c.643C>T	p.Gln215*	Q215X	ISS	Huber et al. (2006)		Protéine tronquée	Caucasien	1
Exon 6a	c.657delA	p.Gly220Alafs*20		LWD	Grigelioniene (CP)		Protéine tronquée	Caucasien	1
Exon 6a	c.670G>A	p.Ala224Thr	A224T	ISS	Rappold et al. (2002)			Caucasien	2
Exon 6a	c.685_696delCACCCGCACCTG	p.His229_Leu232del		ISS	Rappold et al. (2002)			Caucasien	2
Exon 6a	c.701C>T	p.Ala234Val		LWD	E. Scarano (NP)			Inconnue	1
Exon 6a	c.728delC	p.Pro243Argfs*164		LWD	Grigelioniene et al. (2001)	Domaine SH3	Protéine tronquée	Caucasien	2
Exon 6a	c.728dupC	p.Pro244Alafs*147		LWD	Zinn et al. (2002)	Domaine SH3	Protéine tronquée	Inconnue	1
Exon 6a	c.738C>T	p.Phe246Phe		ISS	SHOX Lab Heidelberg (NP)			Caucasien	1
Exon 6a	c.805delA	p.Ser269Alafs*138		LWD	Huber et al. (2006)	Domaine OAR (c.805 à c.866)	Protéine tronquée	Caucasien	1
Exon 6a	c.824_825delinsTA	p.Ser275lle		LWD	S. Thomas (NP)	Domaine OAR (c.805 à c.866)		Caucasien	1
Exon 6a	c.827T>C	p.lle276Thr	I276T	ISS, LWD	Huber et al. (2006)	Domaine OAR (c.805 à c.866)		Caucasien	2
Exon 6a	c.877T>C	p.*293Argext*48		LWD	Binder et al. (2004)		Protéine tronquée	Caucasien	1

Annexe 7 : Tableau récapitulatif des anomalies ponctuelles des exons 5 et 6a du gène *SHOX* (d'après la base de données Shox database). NP : non-publié , CP : communication personnelle , **Variants** : variants les plus fréquemment cités dans la littérature.

Expl	oration du gène SHOX		Laboratoi	C.H.U. DE NANTES	UF 9166 TÉL: 02 40 08 40 20		
2 x5 mL de sang total sur EDTA Envoi à température ambiante.		Date de prélèvement: Nom du préleveur:			Heure de prélèvement:		
Pré-requis:	Petite taille:	OUI	NON	Nombre de DS:			
	Bilan endocrinien (dont GH) normal:	OUI	NON				
	Caryotype Normal (si jeune fille):	OUI	NON				
	Antécédent de petite taille chez (au moins) 1 apparenté:	OUI	NON	Si oui, préciser lequel:			
Anomalies	Chez l'enfant:	OUI	NON		Si oui =	3	
radiographiques:	Chez un des parents:	OUI	NON	Si oui, préciser lequel:			
Mésomélie:	Brièveté des avant-bras:	OUI	NON		Si oui =	3	
	Rapport Taille assise/Taille > 55,5%	OUI	NON		Si oui =	2	
	Envergure: cm , Taille: cr Rapport Envergure / Taille < 96,5	n OUI	NON		Si oui =	2	
Autres anomalies	Déformation clinique de Madelung:	OUI	NON		Si oui =	5	
cliniques:	Cubitus valgus	OUI	NON		Si oui =	2	
	Hypertrophie musculaire:	OUI	NON	Si oui, préciser le site:	Si oui =	3	
	IMC > 50eme percentile :	OUI	NON		Si oui =	4	
ID Prescripteur: NOM:		ID pati NOM: Prénoi	ient		SCORE* Total		

_					_
	10	2	24	1 ١	
	10	đ	24		

Service: DDN: Tél: Sexe: Signature attestant la Cas Index: OUI NON prescription: Si "NON", Cas Apparenté de:

* Calcul de score inspiré de Rappold et al., Genotypes and phenotypes in children with short stature : clinical indicators of SHOX haploinsufficiency, J Med genet 2007: faible probabilité d'anomalie SHOX pour un score < 5.

Annexe 8 : Proposition de fiche d'information clinique pour l'exploration SHOX et score clinique associé.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ballabio A, Bardoni B, Carrozz R, Andria G, Bick D, Campbell L, Hame B, Ferguson-Smith MA, Gimelli G, Fraccaro M, Maraschio P, Zuffard O, Guioli S, Camerino G (1989) Contiguous gene syndromes due to deletions in the distal short arm of the human X chromosome. Proc Natl Acad Sci USA 86:10001–10005

2. J Chen, G Wildhardt, Z Zhong, R Röth, B Weiss, D Steinberger, J Decker, W F Blum, and G Rappold (2009) Enhancer deletions of the SHOX gene as a frequent cause of short stature : the essential role of a 250 kb downstream regulatory domain. J Med Genet. 46(12): 834–839

3. Schneider KU, Sabherwal N, Jantz K, Roth R, Muncke N, Blum WF, Cutler GB Jr, Rappold G. (2005). Identification of a major recombination hotspot in patients with short stature and SHOX deficiency. Am J Hum Genet. 77:89–96.

4. Sempé M, Pédron G, Roy-Pernot M.P (1979) Auxologie méthode et séquences. Théraplix, Réédition 1997 Méditions ISBN: 2-905839-2

5. Document disponible sur: http://www.med.univ-rennes1.fr/etud/pediatrie/retard-croissance.htm

6. Leri A, Weill J (1929) Une affection congenitale et symetrique du developpement osseux: la dyschondrosteose. Bull Mem Soc Med Hop (Paris) 53:1491-1494

7. Ross JL, Scott Jr C, Marttila P, Kowal K, Nass A, Papenhausen P, Abboudi J, Osterman L, Kushner H, Carter P, Ezaki M, Elder F, Wei F, Chen H, Zinn AR (2001) Phenotypes associated with SHOX deficiency. J Clin Endocrinol Metab 86:5674–5680

8. Rappold G, Blum WF, Shavrikova EP, Crowe BJ, Roeth R, Quigley CA, Ross JL, Niesler B.(2007) Genotypes and phenotypes in children with short stature: clinical indicators of SHOX haploinsufficiency. J Med Genet. 44:306–13

9. Lichtenstein JR, Sundaram M, Burdge R. (1980) Sex-influenced expression of Madelung's deformity in a family with dyschondrosteosis. J Med Genet 17:41–43

10. Schiller S, Spranger S, Schechinger B, Fukami M, Merker S, Drop SL, Troger J, Knoblauch H, Kunze J, Seidel J, Rappold GA (2000) Phenotypic variation and genetic heterogeneity in Leri-Weill syndrome. Eur J Hum Genet 8:54–62

11. Huber C, Rosilio M, Munnich A, Cormier-Daire V.(2006) French SHOX GeNeSIS Module High incidence of SHOX anomalies in individuals with short stature. J Med Genet 43:735–9

12. Sabherwal N, Bangs F, Röth R, Weiss B, Jantz K, Tiecke E, Hinkel GK, Spaich C, Hauffa BP, van der Kamp H, Kapeller J, Tickle C, Rappold G. (2007) Long-range conserved non-coding SHOX sequences regulate expression in developing chicken limb and are associated with short stature phenotypes in human patients. Hum Mol Genet.16:210–22

13. Huber C, Cusin V, Le Merrer M, Mathieu M, Sulmont V, Dagoneau N, Munnich A, Cormier-Daire V (2001) SHOX point mutations in dyschondrosteosis. J Med Genet 38:323

14. Shears DJ, Vassal HJ, Goodman FR, Palmer RW, Reardon W, Superti-Furga A, Scambler PJ, Winter RM (1998) Mutation and deletion of the pseudoautosomal gene SHOX cause Leri-Weill dyschondrosteosis. Nat Genet 19:70–73

15. Falcinelli C, lughetti L, Percesepe A, Calabrese G, Chiarelli F, Cisternino M, De Sanctis L, Pucarelli I, Radetti G, Wasniewska M, Weber G, Stuppia L, Bernasconi S, Forabosco A (2001) SHOX point mutations and deletions in Leri-Weill dyschondrosteosis. J Med Genet 39:E33

16. Langer Jr LO (1965) Dyschondrosteosis, a hereditable bone dysplasia with characteristic roentgenographic features. AJR Amer J Roentgenol 95:178–188

17. Fryns JP, Van Den Berghe H (1979) Langer type of mesomelic dwarfism as the possible homozygous expression of dyschondrosteosis. Hum. Genet. 46: 21-27.

18. Belin V, Cusin V, Viot G, Girlich D, Toutain A, Moncla A, Vekemans M, Le Merrer M, Munnich A, Cormier-Daire V (1998) SHOX mutations in dyschondrosteosis (Leri-Weill syndrome). Nat Genetics 19:67–69

19. Rao E, Weiss B, Fukami M, Rump A, Niesler B, Mertz A, Muroya K, Binder G, Kirsch S, Winkelmann M, Nordsiek G, Heinrich U, Breuning MH, Ranke MB, Rosenthal A, Ogata T, Rappold GA (1997) Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome [see comments]. Nat Genet 16:54–63

20. Rappold GA, Fukami M, Niesler B, Schiller S, Zumkeller W, Bettendorf M, Heinrich U, Vlachopapadoupoulou E, Reinehr T, Onigata K, Ogata T (2002) Deletions of the homeobox gene SHOX (short stature homeobox) are an important cause of growth failure in children with short stature. J Clin Endocrinol Metab 87:1402–1406

21. Sagi L, Zuckerman-Levin N, Gawlik A, Ghizzoni L, Buyukgebiz A, Rakover Y, Bistritzer T, Admoni O, Vottero A, Baruch O, Fares F, Malecka-Tendera E, Hochberg Ze (2007) Clinical Significance of the Parental Origin of the X Chromosome in Turner Syndrome, J Clin Endocrinol Metab 92(3):846-52

22. Audi L, Esteban C, Carrascosa A, Espadero R, Perez-Arroyo A, Arjona R, Clemente M, Wollmann H, Fryklund L, Parodi LA; Spanish SGA Study Group. (2006) Exon 3-deleted/full-length growth hormone receptor polymorphism genotype frequencies in Spanish short small-for-gestational-age (SGA) children and adolescents (n = 247) and in an adult control population (n = 289) show increased fl/fl in short SGA. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 91:5038–5043

23. Zuffardi O, Maraschio P, Lo Curto F, Müller U, Giarola A, Perotti L. (1982) The role of Yp in sex determination: new evidence from X/Y translocations. Am J Med Genet.12(2):175–184

24. Lien S, Szyda J, Schechinger B, Rappold G, Arnheim N (2000) Evidence for heterogeneity in recombination in the human pseudoautosomal region: High resolution analysis by sperm typing and radiation-hybrid mapping. Am. J. Hum. Genet. 66:557–566.

25. Blaschke RJ, Rappold G. (2006) The pseudoautosomal regions, SHOX and disease. Curr Opin Genet Dev.16:233–9

26. Ogata T, Goodfellow P, Petit C, Aya M, Matsuo N. (1992) Short stature in a girl with a terminal Xp deletion distal to DXYS15: localisation of a growth gene(s) in the pseudoautosomal region. J Med Genet. 29(7):455–459

27. Schaefer L, Ferrero GB, Grillo A, BassiMT, Roth EJ,Wapenaar MC, van Ommen GJ, Mohandas TK, Rocchi M, Zoghbi HY, Ballabio A (1993) A high resolution deletion map of human chromosome Xp22. Nat Genet. 4:272–279

28. Ogata T, Matsuo N (1993) Sex chromosome aberrations and stature: deduction of the principal factors involved in the determination of adult height. Hum Genet 91:551-562

29. Ogata T, Yoshizawa A, Muroya K, Matsuo N, Fukushima Y, Rappold G, Yokoya S. (1995) Short stature in a girl with partial monosomy of the pseudoautosomal region distal to DXYS15: further evidence for the assignment of the critical region for a pseudoautosomal growth gene(s). J Med Genet. 32(10):831–834

30. Ellison JW, Wardak Z, Young MF, Gehron Robey P, Laig-Webster M, Chiong W. (1997) PHOG, a candidate gene for involvement in the short stature of Turner syndrome. Hum Mol Genet . 6:1341–7

31. Gahunia HK, Babyn PS, Kirsch S, Mendoza-Londono R (2009) Imaging of SHOX-associated anomalies. Semin Musculoskelet Radiol. 13(3):236-54

32. Krumlauf R (1994) Hox genes in vertebrate development. Cell 78:191–201

33. Marchini A, Marttila T, Winter A, Caldeira S, Malanchi I, Blaschke RJ, Hacker B, Rao E, Karperien M, Wit JM, Richter W, Tommasino M, Rappold GA. (2004). The Short stature homeodomain protein SHOX induces cellular growth arrest and apoptosis and is expressed in human growth plate chondrocytes. J Biol Chem. 279:37103–37114

34. Clement-Jones M, Schiller S, Rao E, Blaschke RJ, Zuniga A, Zeller R, Robson SC, Binder G, Glass I, Strachan T, Lindsay S, Rappold GA (2000) The short stature homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. Hum Mol Genet 9:695–702

35. Munns CF, Glass IA, LaBrom R, Hayes M, Flanagan S, Berry M, Hyland VJ, Batch J A, Philips GE, Vickers D (2001) Histopathological analysis of Leri-Weill Dyschondrosteosis: disordered growth plate. Hand Surg. 6, 13–23.

36. Durand C, Bangs F, Signolet J, Decker E, Tickle C, Rappold G. (2009) Enhancer elements upstream of the SHOX gene are active in the developing limb, Eur J Hum Genet.

37. Benito-Sanz S, Thomas NS, Huber C, Gorbenko del Blanco D, Aza-Carmona M, Crolla JA, Maloney V, Rappold G, Argente J, Campos-Barros A, Cormier-Daire V, Heath KE. (2005) A novel class of Pseudoautosomal region 1 deletions downstream of SHOX is associated with Leri-Weill dyschondrosteosis. Am J Hum Genet. 77:533–44

38. Fukami M, Kato F, Tajima T, Yokoya S, Ogata T. (2006) Transactivation function of an approximately 800-bp evolutionarily conserved sequence at the SHOX 3' region: implication for the downstream enhancer. Am J Hum Genet. 78:167–70

39. Thomas NS, Harvey JF, Bunyan DJ, Rankin J, Grigelioniene G, Bruno DL, Tan TY, Tomkins S, Hastings R (2009) Clinical and molecular characterization of duplications encompassing the human SHOX gene reveal a variable effect on stature. Am J Med Genet A. 149A(7):1407-14.

40. Roos L, Nielsen K, Tümer Z, (2009) A duplication encompassing the SHOX gene and the downstream evolutionarily conserved sequences, 149, 12:2900-2901

41. Ogata T, Kosho T, Wakui K, Fukushima Y, Yoshimoto M, Miharu N. (2000) Short stature homeobox-containing gene duplication on the der(X), gonadal dysgenesis, and tall stature. J Clin Endocrinol Metabol 85:2927–2930.

42. Hubert C, Cormier-Daire V (2004) Génétique et gène SHOX = SHOX gene and short-stature syndromes. Archives de pédiatrie ISSN 0929-693X, vol. 11, 6 : 555-556

43. Donaldson MDC (1997) Growth hormone therapy in Turner syndrome: current uncertainties and future strategies. Horm Res 48(Suppl 5):35–44

44. Hintz RL, Attie KM, Baptista J, Roche A (1999) Effect of growth hormone treatment on adult height of children with idiopathic short stature. Genentech Collaborative Group. N Engl J Med 340:557–559

45. Blum W, Crowe B, Quigley C, Jung H, Cao D, Ross JL, Braun L, Rappold G (2007)

Growth Hormone Is Effective in Treatment of Short Stature Associated with Short Stature Homeobox-Containing Gene Deficiency: Two-Year Results of a Randomized, Controlled, Multicenter Trial J. Clin. Endocrinol. Metab. 92: 219-228

46. Document disponible sur :

http://www.lilly.fr/docs/product/avis/Umatrope_ext_d_indication_SHOX_16_juillet_20 08.pdf

47. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. Nucleic Acids Res. 30:e57

48. Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467

49. Stuppia L, Calabrese G, Gatta V, Pintor S, Morizio E, Fantasia D, Guanciali Franchi P, Rinaldi MM, Scarano G, Concolino D, Giannotti A, Petreschi F, Anzellotti MT, Pomilio M, Chiarelli D, Tumini DS, Palka G (2003) SHOX mutations detected by FISH and direct sequencing in patients with short stature. J Med Genet 40:e11

50. Cormier-Daire V, Huber C, Munnich A (2001) Allelic and nonallelic heterogeneity in dyschondrosteosis (Léri-Weill syndrome). Am J Med Genet 106:272–274

51. Ogata T, Onigata K, Hotsubo T, Matsuo N, Rappold G (2001) Growth hormone and gonadotropin-releasing hormone analog therapy in haploinsufficiency of SHOX. Endocr J 48:317-22

Nom – Prénoms : GINGUENÉ Sébastien, Vincent.

Titre du mémoire-thèse : Etude du gène SHOX et de la région PAR1 sur une cohorte de 125 patients avec retard de croissance

Résumé du mémoire thèse :

Les phénotypes de petite taille touche 3% de la population et représentent l'un des plus fréquents motifs de suivi médical pendant l'enfance. Le gène *SHOX* est fréquemment impliqué dans la dyschondrostéose (Syndrome de Léri-Weill), mais aussi dans un certain nombre de cas de petites tailles idiopathiques, c'est pourquoi l'exploration de ce gène est de plus en plus prescrite.

Ce mémoire retrace l'étude nantaise d'une cohorte de 125 patients aboutissant sur la mise au point d'un séquençage des régions codantes du gène, ainsi que sur la réalisation d'une fiche d'informations cliniques devant permettre, à l'avenir, une meilleure sélection des patients pour l'exploration du gène *SHOX*.

MOTS CLES :

SHOX, retard de croissance, Syndrome de Léri-Weill, Dyschondrostéose, Noncodant DNA Element (CNE), Idiopatic Short Stature (ISS).

JURY

Président : M. Jean-Marie Bard, Professeur de Biochimie, Faculté de Pharmacie de Nantes

Assesseurs: M. Stéphane Bézieau, Professeur de Génétique, Faculté de Médecine de Nantes Mme. Sabine Baron, Praticien Hospitalier Pédiatrie, C.H.U. de Nantes M. Sébastien Schmitt, Praticien hospitalier Génétique, C.H.U. de Nantes

Adresse de l'auteur : 7, rue Louis Carmontelle 44120 VERTOU. sgnantes@yahoo.fr