

UNIVERSITE LILLE DROIT ET SANTE
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE – SANTE

Doctorat d'Université
Discipline : Génétique

**Déterminisme moléculaire du développement des
membres : apport des nouvelles technologies d'étude
du génome**

Thèse d'université soutenue publiquement le 10 décembre 2019 par
Anne-Sophie JOURDAIN

Membres du Jury :

Madame le Docteur Muriel Holder-Espinasse
Monsieur le Professeur Frank Noël Fitoussi
Monsieur le Professeur Pierre-Olivier Angrand
Monsieur le Docteur Gilles Morin
Madame le Professeur Sylvie Manouvrier-Hanu
Madame le Docteur Fabienne Escande

Rapporteur
Rapporteur
Président du jury
Examineur
Directrice de thèse
Co-directrice de thèse

RESUME

Le développement embryonnaire des membres est un processus complexe dont le mécanisme reste à ce jour imparfaitement connu. Ses anomalies sont des entités très hétérogènes et individuellement rares, mais touchent plus de 1/500 nouveau-nés et une proportion plus élevée de fœtus. Elles représentent donc un véritable problème de santé publique, d'où l'importance d'un diagnostic précis. Il peut s'agir d'anomalies uniques ou multiples, isolées ou syndromiques, sporadiques ou familiales. L'étude de larges cohortes de patients porteurs de malformations des membres est un excellent outil qui permet d'identifier des gènes ou éléments régulateurs impliqués dans leur pathologie et par conséquent dans le développement du membre. Dans la majorité des cas, l'événement génétique responsable est une mutation ponctuelle située dans des gènes codant des facteurs de transcription ou dans des régulateurs transcriptionnels. Cependant, des variations du nombre de copies peuvent être également impliquées. Actuellement, de nouvelles technologies d'étude du génome, allant du séquençage haut débit d'un panel de gènes cibles, au séquençage de l'exome complet voire du génome, peuvent permettre d'identifier ces nouvelles cibles. C'est donc grâce à l'apport de ces avancées technologiques que nous avons souhaité étudier le déterminisme moléculaire du développement des membres. Pour ce faire nous avons analysé une très large cohorte de 684 patients, tous porteurs d'une malformation des extrémités, *via* différents panels de gènes, plus ou moins larges, voire *via* l'analyse d'exome complet ou d'une CGH pangénomique enrichie. Les résultats de ce travail nous ont permis, d'une part, d'établir un panel de gènes, adapté au laboratoire d'analyse moléculaire, dont l'analyse bioinformatique et le coût sont optimisés, permettant d'identifier les SNVs mais également les CNVs en une seule technique. D'autre part, d'identifier 5 gènes peu ou non décrits en pathologie humaine mais dont le rôle dans le développement des membres semble plus que probable et dont des analyses fonctionnelles, prometteuses, ont débuté pour l'un d'entre eux.

SUMMARY

Limbs development is a complex process of which mechanism is today only partially known. Embryological development abnormalities of genetic origins are rare entities. Such abnormalities can be unique or multiple, single or syndromic, sporadic or of family origins.

The study of large cohorts of patients carrier of limb extremities malformations is an excellent tool that allows an identification of the genes or regulatory elements involved in their pathology and consequently, in the development of the limb. In most of the cases, the genetic event involved is a point mutation in the genes coding transcriptional factor or regulatory sequence. However, variations in the number of copies are also involved.

Today, new technologies of genome study, from high through put sequencing of a target genes panel to a whole exome or genome sequencing, can allow an identification of these new targets. It is thank to these technological advances that we decided to study the molecular determinism of limbs development. To do so, we analyzed a very large cohort of 684 patients, all carriers of a limb malformation, through different genes panels, of different sizes, but also through a whole exome analysis and a pangenomic CGH array.

The results of this work allowed us, in the first part, to establish a genes panel, suitable to a molecular analysis laboratory, to the bioinformatic analysis with an optimized cost, and that can identify the SNVs but also the CNVs in only one analysis.

On a second part, we managed to identify 5 genes, not yet described in human pathology, which seemed to have a role in limb development. For one of these genes a promising functional analysis has started.

REMERCIEMENTS

A ma directrice de Thèse et Présidente du Jury,

Madame le Professeur Sylvie MANOUVRIER

Professeur des Universités et Praticien Hospitalier
Chef du Service de Génétique Clinique
Hôpital Jeanne de Flandre
CHU de Lille

Je vous remercie de m'avoir encadrée durant mes 5 années de thèse et de m'avoir prodigué votre savoir sur la génétique et la clinique des malformations des membres depuis mon arrivée dans l'équipe de diagnostic il y a 8 ans. Je vous remercie également de m'avoir fait participer à la création de notre équipe de recherche RADEME.

A ma co-directrice de Thèse,

Madame le Docteur Fabienne ESCANDE

Praticien Hospitalier
Responsable d'UF Tumeurs Solides
Co-responsable d'UF Maladies Rares
Service Hormonologie Métabolisme Nutrition Oncologie
Institut de Biochimie et Biologie Moléculaire
CHU de Lille

Je te remercie d'avoir accepté de codiriger ma thèse de sciences. Merci pour tes conseils, ta disponibilité et ton savoir.

Depuis maintenant 8 ans nous développons des projets de plus en plus ambitieux dans le cadre du diagnostic moléculaire des malformations des membres. J'ai pu débiter le Sanger à tes côtés et analyser aujourd'hui du WES et bientôt du WGS. Je suis très heureuse de faire partie de ton équipe. Merci beaucoup pour la confiance que tu m'accordes.

A mon jury,

Madame le Docteur Muriel HOLDER-ESPINASSE

Praticien Hospitalier et Clinicien de centre expert
South East Thames Regional Genetics Service
Guy's Hospital
Londres

Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail de thèse 5 ans après avoir encadré Florence Petit, la première thésarde de l'équipe.

Soyez assurée de mes sincères remerciements.

A mon jury,

Monsieur le Professeur Frank Noël FITOUSSI

Professeur des universités, Praticien Hospitalier
Service de Chirurgie Orthopédique et Réparatrice de l'Enfant
Hôpital Armand Trousseau
Faculté de Médecine Sorbonne Université

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de siéger au sein du jury de cette thèse.

Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail.

Veillez trouver le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A mon jury,

Monsieur le Professeur Pierre-Olivier ANGRAND

Professeur des universités
INSERM U908 *Cell Plasticity and Cancer*
Université de Lille 1

Je vous remercie d'avoir accepté avec beaucoup de gentillesse d'évaluer ce travail de thèse.

Vous me suivez depuis le début de ma thèse en faisant parti de mon jury de comité de suivi individuel. Je vous remercie pour vos conseils, votre franc parlé et vos nombreuses bonnes idées.

A mon jury,

Monsieur le Docteur Gilles MORIN

Praticien Hospitalier, Généticien
Service de Génétique Clinique et Oncogénétique
CHU Amiens-Picardie

Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail de thèse.

Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail.

Veillez trouver le témoignage de tous mes remerciements et de ma sincère reconnaissance.

REMERCIEMENTS PERSONNELS

Florence,

Je tiens à te remercier tout particulièrement pour ton aide, ton soutien scientifique mais aussi moral, tes conseils, ton expérience, ta grande disponibilité, ta sincérité et surtout ton énorme gentillesse ! Je suis vraiment très heureuse d'avoir débuté ma carrière en travaillant avec toi, sur tes projets de recherches tous plus intéressants les uns que les autres. Merci pour tout !

Perrine,

« P », mon amie, ma copine. Un énorme merci pour tes nombreux conseils, ta relecture, tes gossips pas toujours fous et surtout pour ton soutien sans faille. Nous nous sommes rencontrées lors de ton passage dans l'équipe de diagnostic en temps qu'interne et d'ici quelques mois tu vas devenir notre « chef ». Nous allons également débiter de nouveaux projets de recherche ensemble dans le cadre de ta thèse. Je suis extrêmement heureuse d'avoir fait ta connaissance, de travailler avec toi et surtout, que l'on soit devenue amies. Merci pour tout !

Cindy et Anaïs,

Les girls, je vous remercie énormément toutes les deux pour votre présence, votre soutien, nos fous rires et de m'avoir nourrie aux petits pains les dernières semaines d'écriture de la thèse.

Max,

Je tiens à te remercier pour ta présence, ta compréhension durant ces 5 années où je ramenaient du travail à la maison et pendant nos vacances. Merci de m'avoir poussée dans mes retranchements et de m'avoir remotivée à chaque moment nécessaire. Grâce à toi je suis allée au bout de cette thèse. Je suis très fière de faire partie de ta vie.

Alessa,

Ma chérie, je te remercie pour ces nuits courtes passées en ta présence durant ces derniers mois. Elles m'ont permis de ne pas rêver de la thèse pendant quelques nuits. Tu es mon rayon de soleil, ma princesse, ton sourire et ton rire me rebouteront toujours. Merci ma croquette de m'avoir poussée au bout de ce travail en me criant « cours ! cours ! cours maman ! ». Beaucoup disent que, pour un thésard, la thèse c'est comme son bébé, mais saches que tu seras l'unique bébé d'amour de ma vie et que tu es le chef d'œuvre que j'ai le mieux réussi. Je vais pouvoir me consacrer entièrement à toi maintenant.

Mes parents, mes frères,

Merci de m'avoir soutenue depuis le début et tout au long de ce travail. De m'avoir poussée au bout et de m'avoir remonté le moral quand cela était nécessaire. Merci pour vos conseils, votre relecture et votre patience. Merci de vous occuper aussi bien de votre petite fille, votre nièce.

Yoshi,

Mon chaton, merci pour tes ronrons apaisants et tes énormes câlins. Tu m'as permis de faire des pauses durant ce travail en t'interposant entre l'ordinateur et moi. Tu es ma petite moufassette d'amour.

Morgane,

« M », mon amie, je te remercie pour tes conseils et ton soutien. Nous nous sommes rencontrées lors de ton internat et maintenant nous sommes amies, avec Perrine, et je pense que nous faisons un super trio de gossip girls ! Merci pour tous ces moments passés et que nous passerons, surtout nos midis potins !

Guillaume,

« Guigui », merci pour ta présence et tes conseils. Actuellement tu es dans la même panade... J'espère pouvoir t'aider autant.

Simon,

« Sissi », un merci tout particulier car avec toi ce n'est que fous rires et rigolades. J'adore manger avec toi le midi même si je pense que, des fois, tu préférerais manger seul ;) merci d'avoir été un babysitter parfait pour mes petites HEK.

Simon bis,

Merci mon ami pour ta relecture et tes conseils pour la langue française que tu maîtrises mieux que quiconque ! Vivement nos prochaines soirées jeux.

Mes collègues,

Tout particulièrement Marthe, Tony, Cathy, Lauriane, Cédric, Laurence, Michel, Catherine, Julie, Denis, Laëtitia, Lucie D, Caroline, Seb, Lucie C, Marie Françoise, Marie Pierre, Malika, Emilie, Fabrice, Christophe, Simon, Céline, Clémence, Jamal. Merci à toutes et tous pour votre soutien, vos conseils, votre présence et votre gentillesse.

TABLE DES MATIERES

RESUME	2
SUMMARY	3
REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIERES	12
SOMMAIRE DES FIGURES.....	14
SOMMAIRE DES TABLEAUX.....	15
INDEX DES ABBREVIATIONS	17
INTRODUCTION.....	19
ETAT DE L'ART.....	22
1- NOUVELLES METHODES D'ANALYSE DU GENOME.....	22
2- LE DEVELOPPEMENT DES MEMBRES	32
2.I- INITIATION ET IDENTITE DU BOURGEON DE MEMBRE	34
2.II- CROISSANCE PROXIMODISTALE ET AER	35
2.III- POLARISATION PREPOSTAXIALE ET ZPA	37
2.IV- POLARISATION DORSOVENTRALE ET VOIE WNT	38
3- ETIOLOGIES DES MALFORMATIONS DES MEMBRES	39
4- CLASSIFICATION DES MALFORMATIONS DES MEMBRES.....	39
4.I- ANOMALIES REDUCTIONNELLES	39
4.II- LES STRUCTURES SURNUMERAIRES	52
4.III- LES ANOMALIES DE FUSION	53
TRAVAIL DE THESE.....	57
1- OBJECTIFS	57
2- MATERIEL ET METHODES	59
2.I- COHORTES DE PATIENTS	59
2.II- ANALYSE MOLECULAIRE PAR PANELS CIBLES	61
2.III- ETUDE DES VARIATIONS DU NOMBRE DE COPIES GENIQUES ET DES REMANIEMENTS PAR PUCE CGH ENRICHIE	65
2.IV- SEQUENÇAGE D'EXOME COMPLET (WES)	67
2.V- ANALYSES FONCTIONNELLES	67
3- RESULTATS DES ANALYSES PAR PANELS CIBLES « RECHERCHE »	74
3.I- COHORTE RETROSPECTIVE	74
	12

3.II- DISTRIBUTION ET INTERPRETATION DES VARIANTS DE LA COHORTE RETROSPECTIVE	74
3.III- COMPARAISON DE LA TECHNOLOGIE HALOPLEX <i>VERSUS</i> SURESELECTQXT	97
4- RESULTATS DES ANALYSES PANGENOMIQUES PAR CGH ENRICHE	99
4.I- COHORTE DE PATIENTS	99
4.II- ANALYSE DES RESULTATS	101
5- RESULTATS DES ANALYSES PANGENOMIQUES PAR SEQUENÇAGE D'EXOME COMPLET (WES)	103
5.I- COHORTE DE PATIENTS	103
5.II- PERFORMANCE DU WES	106
5.III- DISTRIBUTION ET INTERPRETATION DES VARIANTS ISSUS DU WES	107
6- DEBOUCHES TRANSLATIONNELS : ETABLISSEMENT D'UN PANEL DE DIAGNOSTIC « +50 »	116
6.I- ETABLISSEMENT DU PANEL +50	116
6.II- COHORTE PROSPECTIVE	118
6.III- PERFORMANCE DU PANEL DE ROUTINE	121
6.IV- DISTRIBUTION ET INTERPRETATION DES VARIANTS DE LA COHORTE PROSPECTIVE	123
7- DEBOUCHES FONDAMENTAUX	136
7.I- GENE <i>HDAC4</i>	136
7.II- IDENTIFICATION DE NOUVEAUX GENES	143
<u>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</u>	163
<u>ANNEXE I : GENES ET ELEMENTS REGULATEURS INCLUS DANS NOS PANELS CIBLES</u>	171
<u>ANNEXE II : ORGANIGRAMME COMPLET DE L'ETUDE DU GENE <i>LEF1</i>, HYPOTHESES ET PERSPECTIVES.</u>	186
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	186

SOMMAIRE DES FIGURES

Figure 1: Chronologie du “Human Genome Project”	23
Figure 2: Schématisation des différentes préparations de bibliothèques NGS selon les techniques proposées.	24
Figure 3: Schématisation de l’amplification clonale proposée par la technologie Life	25
Figure 4: Schématisation de l’amplification clonale proposée par la technologie Illumina	26
Figure 5: Schématisation des méthodes de séquençage NGS	27
Figure 6: Schématisation des 4 segments de membre	32
Figure 7 : Schématisation des 3 axes du développement du membre et de leur centre de signalisation	33
Figure 8: Schématisation de l’initiation du bourgeon de membre chez la souris	35
Figure 9 : Exemples de phénotypes chez des souris KO pour des gènes impliqués dans le développement de l’axe proximo- distal.	36
Figure 10: Exemples de phénotypes chez des souris dont l’expression des Bmps est dérégulée	37
Figure 11 : Photographie d’hémimélie transversale d’un membre supérieur.	40
Figure 12 : Exemple d’anomalie réductionnelle longitudinale radiale (aplasie du radius et du pouce) dans un cas de syndrome de Okihiro.	41
Figure 13 : Anomalie longitudinale radiale et dysostose mandibulofaciale dans le cadre d’un syndrome de Nager	42
Figure 14 : Main bote radiale avec pouce présent en cas de syndrome TAR.	43
Figure 15: Enfant atteint d’achéiropodie.	44
Figure 16: Photographies de mains fendues.	44
Figure 17 : SHFLD par délétion BHLHA9	46
Figure 18 : Maladie des brides amniotiques	48
Figure 19 : Classification des différents types de Brachydactylies selon Tentamy.	51
Figure 20: Classification des différents types de polydactylies d’après Malik	53
Figure 21 : Radiographie d’une synostose huméro-radiale à gauche, et d’une synostose radio-ulnaire dans le cas d’un syndrome de Holt-Oram à droite.	54
Figure 22 : Classification des différentes syndactylies d’après Malik	56
Figure 23: Schématisation de la stratégie du travail de thèse	58
Figure 24 : Schématisation du minigène PCAS permettant la réalisation de test d’épissage <i>ex vivo</i>	70
Figure 25 : Radiographies et photographies des 4 extrémités du patient NGS_Halo-197 porteur de pieds et mains fendus isolés.	84
Figure 26 : Radiographies des mains et des pieds du patient NGS_Halo-114 porteur d’un symphalangisme familial.	86
Figure 27 : Radiographies et photographies des 4 extrémités du patient NGS_Halo-216, fœtus atteint d’ectrodactylies sévères des quatre membres. Radiographies des pieds et mains du patient NGS_Halo-019 et de son frère.	87
Figure 28 : Photographies et radiographie des mains et pieds du patient NGS_Halo-219	90
Figure 29 : Photographies et radiographies des foetus NGS_Halo-020, 104 et 181, porteurs d’anomalies réductionnelles sévères	91
Figure 30: Photographies et radiographies des extrémités de la patiente NGS_Halo-106 porteuse de syndactylies des mains (opérées), de polydactylies préaxiales bilatérales et syndactylies des pieds.	92
Figure 31 : Arbres généalogiques des patients NGS_Halo-228 et NGS_Halo-059 porteurs de VSI dans le gène <i>DLX5</i>	94
Figure 32: Radiographies des extrémités du patient NGS_Halo-079 et NGS_Halo-90 présentant une brachydactylie de type E	96
Figure 33 : Exemple de lecture de séquence permettant d’évaluer les deux techniques de préparation de bibliothèque haloplex <i>versus</i> SureSelect QXT	98
Figure 34: Distribution des patients de la cohorte ectrodactylie selon leur catégorie phénotypique	101

Figure 35 : Distribution des CNVs identifiés par CGH enrichie.....	102
Figure 36 : Arbres généalogiques des familles ayant bénéficié d'un WES.....	103
Figure 37 : Distribution globale des variants identifiés par WES avant et après applications des différents filtres	107
Figure 38 : Analyse du gène <i>PUF60</i> chez la patiente Exome-F5.....	111
Figure 39 : Représentation de la protéine PUF60 et des phénotypes associés à des variants du gène décrits dans la littérature	113
Figure 40 : Composition de la cohorte prospective selon les 7 groupes phénotypiques établis.....	120
Figure 41 : Composition de la cohorte prospective selon les sous groupes phénotypiques établis.....	120
Figure 42 : Etude de la performance du séquençage des cibles du panel diagnostique +50 V3 <i>via</i> la technologie SureSelect QXT panel <i>versus</i> le WES	122
Figure 43 : Schématisation de la fonction répressive de HDAC4 sur RUNX2 dans le développement squelettique	137
Figure 44 : Identification de <i>HDAC4</i> en pathologie humaine.....	138
Figure 45 : Etude du gène <i>HDAC4</i> <i>in vivo</i>	139
Figure 46 : Résultat des Western Blot réalisés pour les variants de <i>HDAC4</i> identifiés en NGS	141
Figure 47 : Analyse par hybridation <i>in situ</i> de l'expression de <i>hdac4</i> chez le zebrafish	142
Figure 48 : Etude des malformations squelettiques chez des modèles murins double KO <i>Fgf4/Fgf8</i> <i>-/-</i>	144
Figure 49 : Etude <i>in vivo</i> chez la souris du gène <i>Fmn1</i>	146
Figure 50 : Expériences d'hybridation <i>in situ</i> sur embryon de souris KO <i>Fmn1</i> <i>-/-</i>	147
Figure 51 : Représentation de la protéine LEF1	148
Figure 52 : Schématisation de l'activation des TCFs/LEF dans la voie Wnt <i>via</i> la β caténine	149
Figure 53 : Etudes <i>in vivo</i> du gène <i>LEF1</i>	151
Figure 54 : Etude familiale du variant c.928A>G du gène <i>LEF1</i>	152
Figure 55 : Description et visualisation <i>via</i> le logiciel Alamut des 2 variants retrouvés dans le gène <i>LEF1</i>	155
Figure 56 : Etude de l'impact des variants du gène <i>LEF1</i> sur la synthèse de la protéine.....	156
Figure 57 : Etude de l'impact des variants du gène <i>LEF1</i> sur la localisation de la protéine.....	157
Figure 58 : Etude de l'impact des variants du gène <i>LEF1</i> sur sa fixation au promoteur de <i>SALL4</i>	158
Figure 59 : Etude de l'impact des variants du gène <i>LEF1</i> sur sa fixation au promoteur de <i>TBX5</i>	159

SOMMAIRE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste des cibles et de leurs coordonnées génomiques incluses dans le design à façon de la CGH enrichie « ectrodactylie ».....	66
Tableau 2 : Catalogue des plasmides utilisés pour les études fonctionnelles	68
Tableau 3 : Séquence des amorces créées pour la mutagenèse dirigée.....	69
Tableau 4 : Séquence des amorces dessinées pour la création du plasmide d'épissage <i>ex-vivo</i>	71
Tableau 5 : Détails des conditions de transfection cellulaire utilisées selon les tests fonctionnels réalisés.	72
Tableau 6 : Liste des anticorps utilisés pour la réalisation des Western Blots et leur dilution	73
Tableau 7 : Répartition phénotypique des patients de la cohorte rétrospective ayant bénéficié d'un séquençage par panels ciblés 125 ou +300.....	74
Tableau 8 : Liste des patients de la cohorte rétrospective pour lesquels un diagnostic moléculaire a pu être établi	76
Tableau 9 : Liste des patients de la cohorte rétrospective présentant un variant d'intérêt mais dont le diagnostic moléculaire n'a pu être établi de façon certaine.....	79
Tableau 10 : Rendement diagnostique selon le groupe phénotypique de la cohorte rétrospective.....	82
Tableau 11 : Description du phénotype et des analyses moléculaires réalisées chez les patients ayant bénéficiés d'une étude par CGH enrichie.....	99

Tableau 12 : Phénotype du cas index de chaque famille ayant bénéficié d'un WES et analyse moléculaire réalisée en premières intentions	104
Tableau 13 : Etude qualitative des WES réalisés.....	106
Tableau 14 : Distribution des variants identifiés par WES et des gènes retenus dans les 18 familles analysées	108
Tableau 15 : Détails et interprétation des variants identifiés par WES	109
Tableau 16 : Liste des patients de la cohorte prospective pour lesquels un diagnostic moléculaire a pu être établi	124
Tableau 17: Liste des patients de la cohorte prospective présentant un variant d'intérêt mais dont le diagnostic moléculaire n'a pu être établi de façon certaine	130
Tableau 18: Rendement diagnostique selon le groupe phénotypique de la cohorte prospective	134
Tableau 19 : Liste des variants du gène <i>HDAC4</i> étudiés en Western Blot	140
Tableau 20 : Informations concernant les variants identifiés dans le gène <i>LEF1</i>	154

INDEX DES ABBREVIATIONS

A: Adénine	FMN1: Formin 1
ACMG: American College of Medical Genetics and Genomics	G: Guanine
ACPA : Analyse chromosomique sur puce à ADN	GATK: Genome Analysis Tool Kit
ADN: Acide Désoxyribonucléique	Gb: Giga base
ADNc: Acide Désoxyribonucléique Codant	GRCh37: Genome Reference Consortium version 37
AER : Apical Ectodermal Ridge pour crête apicale ectodermique	HAND2: Heart and Neural Crest Derivatives Expressed Protein 2
ARN: Acide Ribonucléique	HDAC4: Histone Deacetylase 4
ARNm: Acide Ribonucléique messenger	Hg19: Human Genome version 19
BAM: Binary Alignment Map	HGM: High Mobility Group
BHLHA9 : Basic Helix Loop Helix Family Member A9	HGVS: Human Genome Variation Society
BMP : Bone Morphogenic Protein	HOX: Homeobox Protein
BMPR1B : Bone Morphogenic Protein Receptor 1B	IGV: Integrative Genomics Viewer
BTRC : Beta Transducin Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase	Kb: Kilo base
C : Cytosine	KDM6A: Lysine Demethylase 6A
CADD : Combined Annotation Dependent Depletion	KO: Knock-Out
CDH3 : Cadherin 3	LARM: LMX1B Auto Regulatory Modules
cDNA : ADN codant	LEF1: Lymphoid Enhancer Binding Factor 1
CGH : Comparative Genomic Hybridization	LMX1B: LIM Homeobox Transcription Factor 1 beta
CIA : Communication Inter-Auriculaire	MLPA: Multiplex Ligation Probe Amplification
CIV : Communication Inter-Ventriculaire	MSX: Msh Homeobox
CNV: Copy Number Variation pour variation en nombre de copie	NGS: Next Generation Sequencing
ddNTP : Dideoxynucleotides	Pb: Paire de bases
DLX : Distal Less homeobox	PBX: Pre B Cell Leukemia Transcription Factor
DVD : Diagnostic Variant Database	PCR: Polymerase Chain Reaction
DYNC1i1 : Cytoplasmic Dynein 1 Intermediate Chain 1	PORCN: Porcupine O-Acyltransferase
eExons : Enhancer Exons pour exon régulateur	PUF60: Poly(U) Binding Splicing Factor 60
ECR2 : Evolutionarily Conserved region 2	qPCR: PCR quantitative en temps réel
EN1 : Cngrailed 1	RPPH1 : Ribonuclease P RNA Component H1
EYA1 : EYA transcriptional coactivator and phosphatase 1	RUNX2: Runt-related Transcription Factor 2
FASTQ : Fasta Quality	SALL4: Sal-Like Protein 4
FGF : Fibroblast Growth Factors	SAM: Sequence Alignment Map
FGFR1: Fibroblast Growth Factor Receptor 1	SHH : Sonic HedgeHog
FH: Formin Homology	SHFLD: Split Hand Foot Malformation Long Bone Deficiency pour syndrome de pieds et mains fendus - anomalie des os longs
	SHFM3 : Split hand foot malformation 3 pour pieds et main fendus de type 3
	SNP : Single Nucleotide Polymorphism
	SNV: Single Nucleotide Variation pour variation ponctuelle

SNX3: Sorting Nexin 3
SP: Specificity Protein
T: Thymine
TBX: T-box
TP63: Tumor Protein p63
VCF: Variant Calling Format
VSI: Variant de Signification Inconnue
WES: Whole Exome Sequencing
WGS: Whole Genome Sequencing
WNT: Wiggless Integration
WT : Wild Type pour sauvage
ZPA: Zone of Polarizing Activity pour zone
d'activité polarisante
ZRS : ZPA Regulatory Sequence

INTRODUCTION

Les anomalies du développement embryonnaire d'origine génétique regroupent des entités très hétérogènes et individuellement rares. Touchant plus de 3% des nouveau-nés et une proportion plus importante de fœtus, elles constituent un véritable problème de santé publique. Il peut s'agir d'anomalies uniques ou multiples, isolées ou syndromiques, sporadiques ou familiales. Pour certaines, il existe une grande hétérogénéité phénotypique avec parfois des phénotypes chevauchants, ne facilitant pas le diagnostic clinique. A cela, s'ajoute une hétérogénéité génique qui augmente le degré de complexité dans l'établissement du diagnostic moléculaire de ces pathologies. L'identification de l'anomalie moléculaire en cause est cependant nécessaire au conseil génétique pour le patient et sa famille et, bien souvent, également pour adapter la prise en charge du patient, et prévenir certaines complications.

Parmi les anomalies du développement, celles des membres touchent plus d'un nouveau-né sur 500. Elles sont de sévérité extrêmement variable depuis des anomalies réductionnelles sévères (par exemple l'amélie qui correspond à l'absence complète d'un membre) jusqu'à des anomalies mineures du nombre ou de la morphologie des doigts. Bien que de nombreuses avancées aient été réalisées dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la formation des membres, le déterminisme génétique des différentes étapes qui y président est encore peu connu. L'expression temporo-spatiale spécifique de chacun des facteurs de transcription impliqués complique en effet leur identification. C'est ainsi que les malformations des membres constituent un excellent modèle d'étude permettant d'étoffer les connaissances sur ces phénomènes complexes de régulation (Wilkie 2003).

Alors qu'une anomalie des membres est retrouvée dans environ 1400 syndromes malformatifs, moins de 150 gènes responsables de ces malformations sont actuellement identifiés (Manouvrier-Hanu, Holder-Espinasse, et Lyonnet 1999 ; Zuniga, Zeller, et Probst 2012). Ainsi, aujourd'hui, la cause moléculaire de leur pathologie n'est identifiée que chez environ 1/3 des patients (Manouvrier-Hanu et Mezel 2010). Dans la majorité des cas, l'événement génétique responsable est une mutation ponctuelle (SNP, petite délétion et/ou insertion), présente à l'état hétérozygote, homozygote ou hétérozygote composite dans un des gènes codant des facteurs de transcription ou des régulateurs/modulateurs

transcriptionnels impliqués dans la formation des membres (Heintzman et Ren 2009 ; Manouvrier-Hanu, Holder-Espinasse, et Lyonnet 1999). Cependant, des variations du nombre de copies de régions régulatrices ou de gènes ont également été identifiées (Spielmann et Klopocki 2013). Elles sont impliquées, soit directement par le déséquilibre génomique qu'elles entraînent, soit indirectement en perturbant les interactions entre un/des gène(s) et son/ ses élément(s) régulateur(s) (abolition d'un TAD, *Topologically Associated Domain*).

La collaboration mise en place depuis plus de 20 ans entre le laboratoire de biochimie et biologie moléculaire - UF8923 Génétique des Maladies Rares et des Syndromes Malformatifs - et la clinique de Génétique « Guy Fontaine » du CHU de Lille, permet de réaliser l'analyse moléculaire de plus de 300 dossiers de patients atteints de malformations des membres par an et d'établir un diagnostic moléculaire pour environ un tiers d'entre eux. Depuis 2012, l'équipe de recherche RADEME (EA7364) a permis d'étudier sur un plan fondamental les variants et gènes identifiés dans le cadre du diagnostic et a ainsi participé à l'amélioration des connaissances sur le développement des membres.

L'arrivée des nouvelles technologies de séquençage (NGS : *Next Generation Sequencing*) dans les laboratoires constitue une formidable opportunité pour l'amélioration du rendement diagnostique dans ces pathologies, avec la possibilité d'explorer simultanément de nombreux gènes voire de découvrir de nouveaux gènes ou séquences régulatrices. De nombreux exemples d'analyse de cohortes par les nouvelles technologies de séquençage sont disponibles dans la littérature comme par exemple dans le cadre du diagnostic moléculaire de patients atteints de déficience intellectuelle (Carvill et Mefford 2015), de neuropathie (Reid et al. 2016 ; Dohrn et al. 2017), de pathologies neuromusculaires (Dhamija et Chambers 2015), de myopathies (Krahn et al. 2017), d'épilepsie (J. Wang et al. 2014) ou encore dans l'étude du syndrome de Marfan (Wooderchak-Donahue et al. 2015). Toutes confirment l'intérêt de ces nouvelles technologies dans l'amélioration de l'identification des causes génétiques de ces pathologies. Dans le domaine des malformations des membres, peu de données sont disponibles. A notre connaissance, les seules cohortes publiées sont des cohortes analysées séquençage Sanger (Syndrome de Nail-Patella et *LMX1B* (Ghoumid et al. 2016); syndrome de Holt-Oram et *TBX5* (Clémence Vanlerberghe et al. 2019); Syndrome Coxo-Podo-Patellaire et *TBX4* (C. Vanlerberghe et al. 2017)); DHLPC (Furniss et al. 2009);

caryotype (Vergult et al. 2013) ou *CGH-array* (Manolakos et al. 2010 ; Dimitrov et al. 2010 ; Cheng et al. 2014 ; Holder-Espinasse et al. 2019).

Au cours de ce travail de thèse, nous avons appliqué les nouvelles techniques d'analyse du génome, telles que le NGS par panel et l'exome mais aussi l'analyse chromosomique sur puce ADN enrichie et ciblée, à une cohorte exceptionnelle de patients atteints de malformations des membres isolées ou syndromiques. Ce travail, qui avait pour objectif de faire progresser les connaissances sur les mécanismes génétiques présidant au développement des membres, a été réalisé dans le cadre d'une recherche translationnelle afin d'une part, d'identifier des nouveaux gènes candidats impliqués dans des anomalies du développement des membres, et d'autre part, d'améliorer la qualité et le rendement du diagnostic moléculaire chez ces patients. Après un état des lieux des connaissances sur les nouvelles technologies d'analyse du génome, le développement des membres et la classification des malformations des membres, nous présenterons notre travail, les méthodes utilisées et les résultats obtenus, avant de les discuter.

ETAT DE L'ART

1- Nouvelles méthodes d'analyse du génome

La génomique est une discipline permettant d'étudier le fonctionnement d'un organisme par l'analyse de l'ensemble de ses gènes. Pour cela, de multiples techniques ont été développées depuis les années 1960 suite à la découverte de la structure en double hélice de l'ADN (Watson et Crick 1953). Mais c'est grâce à la technique de séquençage des acides nucléiques, mise au point dans les années 1970 par Maxam et Gilbert, que l'étude des gènes a réellement pris son essor (Maxam et Gilbert 1977). Cette technique reposait sur une méthode chimique radioactive. Elle a par la suite été améliorée par Sanger en 1977 (Sanger, Nicklen, et Coulson 1977 ; Sanger et Coulson 1978). Actuellement, la méthode Sanger est automatisée et représente le séquençage de première génération (Ansorge et al. 1989 ; Soper et al. 1998). En 1989 est lancé le « *Human Genome Project* », un projet ambitieux piloté par le « *National Institutes of Health* », qui avait pour but de séquencer le génome humain complet, sur une durée d'environ 15 ans, pour un coût estimé de 3 milliards de dollars (E. D. Green, Guyer, et National Human Genome Research Institute 2011 ; E. Green 2015 ; Boeke et al. 2016). C'est en 2001 que ce projet a permis d'obtenir une cartographie complète du génome humain (Figure 1).

Ces dernières années, d'importants progrès ont été réalisés dans le domaine du séquençage et du génotypage, avec notamment l'avènement d'une deuxième génération de technique de séquençage (*New Generation Sequencing*, NGS). Mis au point en 2005 par l'équipe de J. M. Rothberg, le NGS s'est peu à peu développé pour devenir, aujourd'hui, une technique fiable, à fort potentiel en termes d'identification de gènes d'intérêt dans les pathologies humaines (J. Zhang et al. 2015). Cette nouvelle technologie permet de réduire les coûts ainsi que les temps d'analyse tout en augmentant leur volume (plus de cibles et plus de patients séquencés simultanément). En contrepartie, l'investissement matériel ainsi que le temps pré/post-analytique augmentent (Collins 2003).

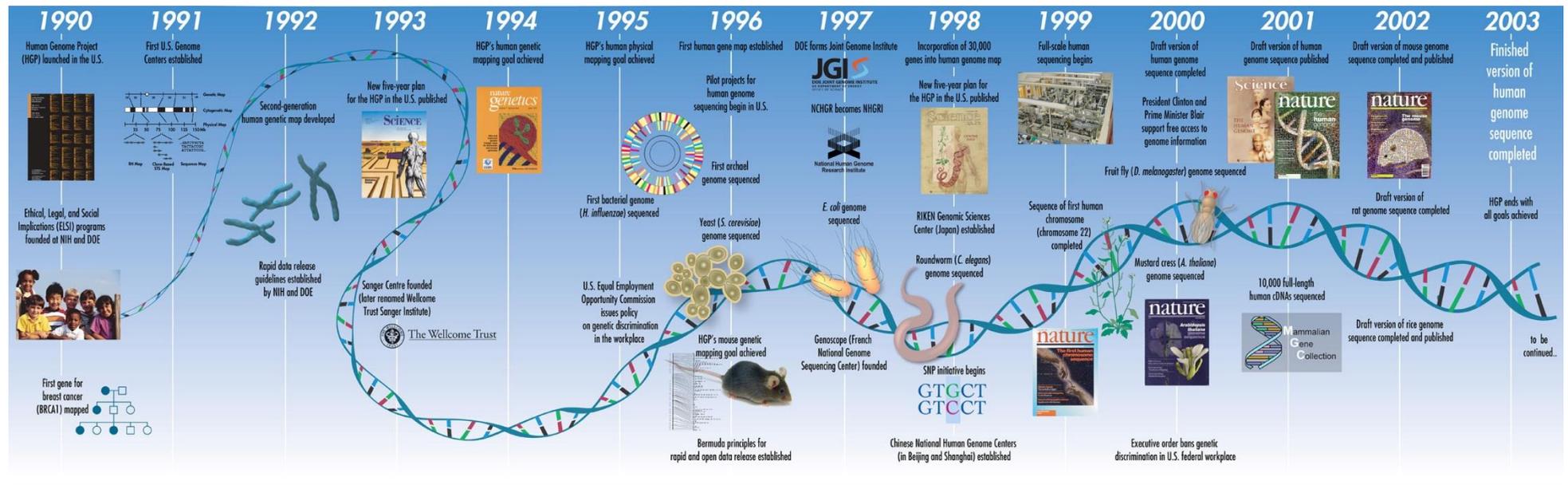


Figure 1: Chronologie du "Human Genome Project" (<https://www.genome.gov/>)

La technique de NGS de seconde génération se compose de 3 étapes distinctes : la préparation de la librairie, l'amplification clonale et le séquençage à proprement parler (Behjati et Tarpey 2013 ; Mardis 2013 ; de Kock et al. 2016 ; E. D. Green, Guyer, et National Human Genome Research Institute 2011).

La préparation de la librairie consiste à multiplexer de façon équimolaire les régions cibles de plusieurs échantillons qui seront séquençés simultanément. Pour cela, 2 principales approches existent : par PCR-amplicon ou par capture (Samorodnitsky, Jewell, et al. 2015 ; Samorodnitsky, Datta, et al. 2015 ; Metzker 2010 ; van Dijk et al. 2014 ; Ke et al. 2016) (Figure 2).

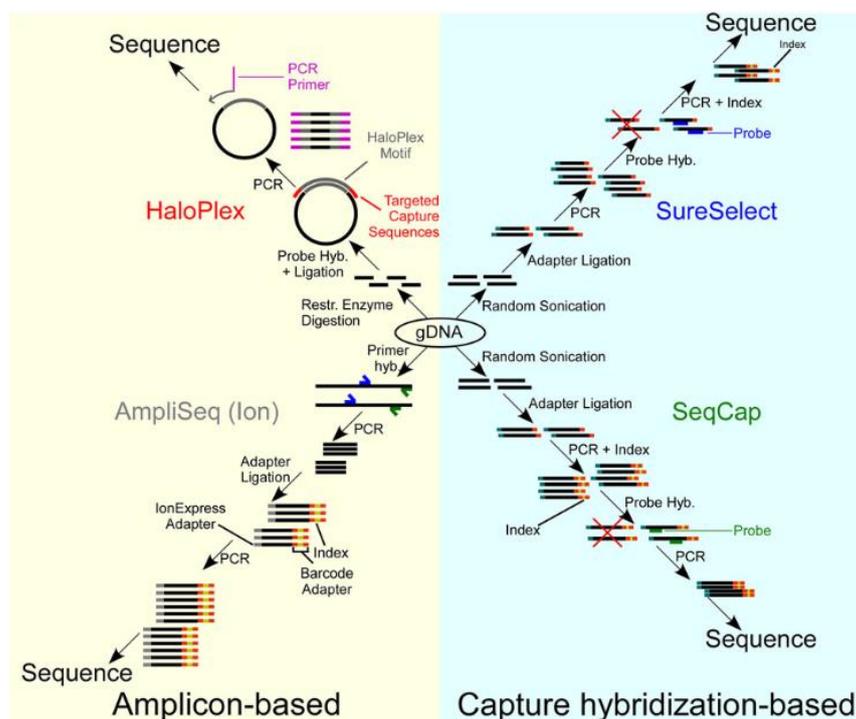


Figure 2: Schématisation des différentes préparations de librairies NGS selon les techniques proposées (Samorodnitsky, 2015).

La PCR-Amplicon (ex : kit Ampliseq ThermoFischer Scientific, TrueSight Illumina, Multiplicom Agilent), est basée sur un enrichissement des gènes-cibles grâce à des amorces spécifiques qui se fixent sur l'ADN natif. La méthode par capture (ex : kit SureSelect XT/QXT Agilent, TargetSeq Life technologies, Sequence Capture Arrays Roche Nimblegen) nécessite, quant à elle, que l'ADN soit au préalable digéré mécaniquement ou enzymatiquement. Des sondes de 150pb anti sens biotinylées et complémentaires aux régions cibles, dans leur intégralité, vont ensuite venir capturer les fragments désirés par hybridation. Enfin, la technologie HaloPlex (Agilent) est une adaptation de ces deux techniques. En effet, l'ADN

doit être digéré enzymatiquement au préalable. Ensuite, c'est par PCR-Amplicon que les cibles sont sélectionnées. Cependant, dans cette méthode, les amorces simple brin complémentaires des régions cibles sont situées aux extrémités d'une sonde double brin biotinylée permettant de les relier entre elles pour ainsi former un halo qui sera ensuite capturé par des billes magnétiques.

La seconde étape concerne l'amplification clonale des bibliothèques. Ceci permet d'obtenir une quantité suffisante de matériel à séquencer. Comme précédemment, il existe 2 méthodes majoritaires dépendantes du type de séquençage. La première, représentée en figure 3, consiste en une PCR à émulsion. Les amplicons précédemment amplifiés et purifiés viennent se fixer sur des billes *via* des amorces spécifiques. Puis, grâce à un mélange eau-huile, la bille couplée d'un amplicon unique se retrouve dans une goutte permettant une amplification clonale. La bibliothèque, enfin terminée, sera séquencée sur un appareil de la gamme Ion de chez Thermofischer.

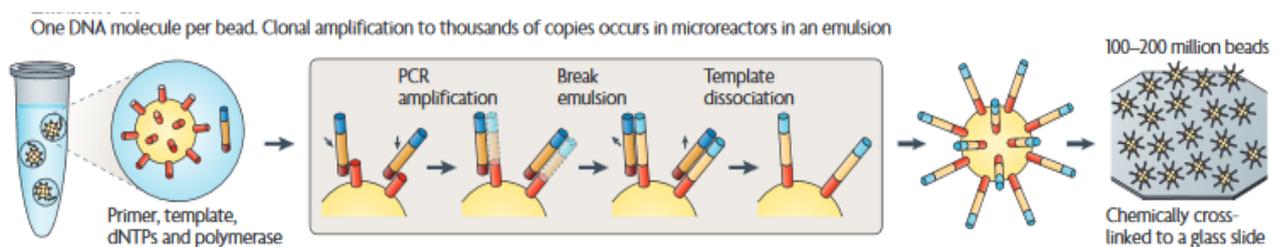


Figure 3: Schématisation de l'amplification clonale proposée par la technologie Life (Metzker, 2010)

La deuxième technique d'amplification clonale se fait directement sur une surface solide appelée *Flowcell* (Figure 4). Des amorces spécifiques, espacées les unes des autres, sont hybridées sur la *flowcell* et captent les amplicons précédemment préparés. Une amplification est ensuite réalisée par pontage permettant la formation des *clusters* de clones. Cette technique est spécifique aux machines de la gamme Illumina puisque le séquençage sera ensuite réalisé sur cette même *flowcell*.

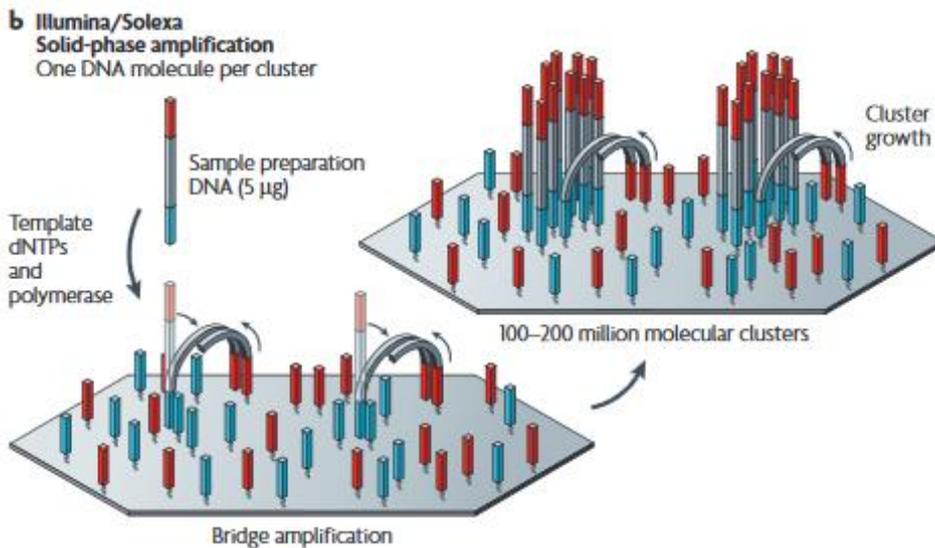


Figure 4: Schématisation de l'amplification clonale proposée par la technologie Illumina (Metzker, 2010)

Enfin, la troisième et dernière étape concerne le séquençage à proprement parler de la librairie. La méthode proposée par Thermofischer avec sa gamme Ion Torrent (PGM, Proton, S5, ...) repose sur le principe de la pHmétrie (Figure 5-A). Lors de l'ajout d'un nucléotide, soit celui-ci est incorporé libérant un proton responsable d'un changement de pH ; soit il n'est pas incorporé et le pH reste inchangé. Les modifications de pH sont alors converties en signal pouvant être lu et analysé. Le principe de séquençage proposé par Illumina (Miseq, NextSeq, HiSeq, NovaSeq, ...) se rapproche de la méthode Sanger (Figure 5-B). En effet, le séquençage est réalisé par ajout d'un ddNTP fluorescent, cette fois-ci, réversible, permettant un séquençage par synthèse, et l'émission d'un signal lumineux s'il est incorporé. Ces signaux sont alors captés instantanément et traduits.

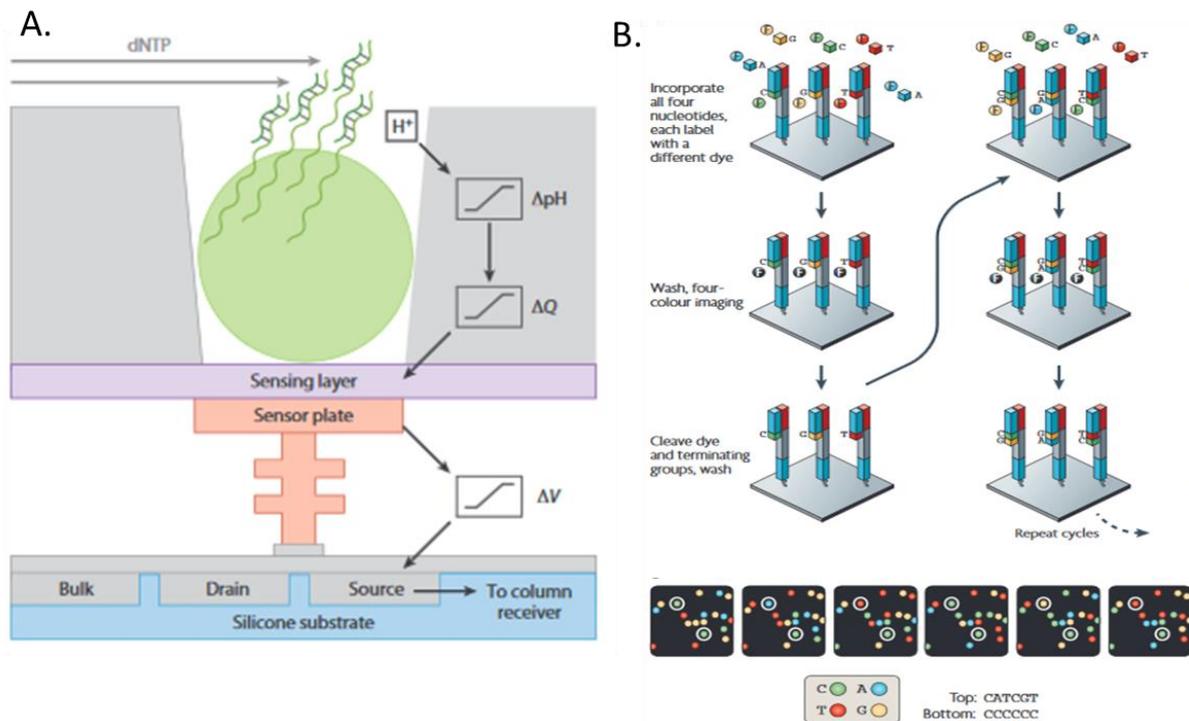


Figure 5: Schématisation des méthodes de séquençage NGS. A- Technique de séquençage basée sur la pHmétrie, ThermoFisher (Mardis, 2013). B- Technique de séquençage par incorporation de ddNTP fluorescent, Illumina (Metzker, 2015).

Comme détaillée ci-dessus, une multitude de techniques de préparation de bibliothèques mais également de séquençage et de séquenceurs différents existent et sont commercialisés par différentes entreprises. Tous ont leurs avantages et inconvénients. La préparation de bibliothèque par PCR-Amplicon est rapide, moins coûteuse et n'impose pas l'achat de matériel spécifique contrairement aux premières techniques de capture qui nécessitent que l'ADN soit fragmenté mécaniquement (biorupteur). Elle présente cependant une moins bonne spécificité ainsi qu'une profondeur et une couverture moins homogènes pour les larges panels. Son utilisation semble la plus adaptée dans le cadre de petits panels de quelques gènes mais avec un nombre élevé de patients à analyser (diminution du coût, rapidité de préparation). La préparation de bibliothèques par capture permet une meilleure spécificité puisqu'elle utilise des sondes anti sens entièrement complémentaires de la cible. Elle permet également d'obtenir une profondeur homogène et reproductible entre chaque patient et chaque expérience, sur l'ensemble des cibles étudiées. Ce dernier paramètre est primordial pour la détection de CNVs, puisqu'en effet, celle-ci est basée sur une comparaison inter

échantillon (patient *versus* échantillon de référence) et inter gènes (gènes cibles *versus* gènes de ménages de références). Il est à noter que la technique de capture a récemment évolué permettant une fragmentation des ADNs enzymatique et non plus mécanique, ce qui n'implique plus l'achat de biorupteur. Enfin, le séquençage par pHmétrie a l'avantage d'être ultra rapide (environ 4h contre 8h *minimum* pour les autres types de séquençage). Il permet donc d'obtenir des résultats en un temps record et a sa place dans le cadre des diagnostics dont le rendu de résultat doit être extrêmement rapide. Cependant, ce système de détection étant très sensible, la moindre fluctuation de pH engendre des artefacts de séquences et donc une moins bonne qualité. Bien que plus long et plus coûteux, le séquençage par incorporation de ddNTP fluorescent procure une meilleure qualité de séquençage.

Une troisième génération de séquenceur, encore en développement, promet un séquençage pangénomique, direct, de longue molécule d'ADN, sans préparation de librairie et sans phase d'amplification clonale, souvent source d'erreur de séquence (Schadt, Turner, et Kasarskis 2010).

Ces nouvelles technologies d'étude du génome génèrent un grand nombre de variants à étudier. Pour cela, des outils bioinformatiques d'analyse sont nécessaires pour interpréter les signaux émis par les séquenceurs. Le *Base Calling* va convertir le signal brut issu du séquenceur en une séquence A,T,G,C. Il attribue également un score qualité à chaque base séquencée. Cela permet de générer un fichier FASTQ (*FASTA Quality*). Chacune de ces séquences sera ensuite attribuée au patient à l'aide des barres codes, c'est l'étape de démultiplexage. Les séquences, ensuite nettoyées (*trimming*, élimination des bases de mauvaises qualité, ...) peuvent être alignées, comparées, à une séquence de référence donnée grâce à divers outils (BWA, Bowtie, SAMtools, ...). En résulte un fichier BAM (*Binary Alignment Map*). Il est d'usage d'utiliser le BAM pour visualiser, de façon simple et rapide, les séquences appelées lectures ou « reads ». Ainsi, il est possible d'estimer la profondeur (nombre de reads à une position donnée) ainsi que la couverture (nombre de bases lues sur le nombre de bases totales ciblées) mais également de valider visuellement la présence d'un variant (environnement, homopolymère, ...). Les variants sont détectés grâce au *Variant Calling* réalisé par des outils bioinformatiques (GATK, Samtools, VarScan, ...) et répertoriés dans un tableau consultable sous Excel appelé VCF (*Variant Call Format*). Enfin, l'annotation des variants interroge différentes bases de données (SnEff, Annovar, *Variant Effect*

Predictor, ...) permettant d'attribuer une position codante, un type de variation ainsi qu'un ensemble de critères minutieusement choisis dans le but de faciliter la sélection de variants d'intérêt (prédiction de l'impact sur la protéine ou sur l'épissage, une fréquence dans la population, ...). En diagnostic, il est important de suivre des règles strictes quant à la classification des variants pouvant aller de bénin (polymorphisme) à pathogène (variant responsable du phénotype). Pour cela, des recommandations ont été émises par l'*American College Of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) en 2015 permettant d'attribuer 5 scores au variant : C1 pour bénin, C2 probablement bénin, C3 variant de signification inconnue (VSI), C4 probablement pathogène, C5 pathogène (Richards et al. 2015; R. C. Green et al. 2013).

Différents types d'analyses par NGS existent, allant du séquençage haut débit d'un panel de gènes cibles, au séquençage de l'exome complet (WES, *Whole Exome Sequencing*) voire du génome (WGS, *Whole Genome Sequencing* respectivement). Chacune de ces analyses comporte ses avantages et ses inconvénients. Le panel de gènes-cibles permet d'avoir une très bonne couverture d'un nombre de gènes d'intérêt plus ou moins important, n'impose pas l'utilisation de machines à grosse capacité très coûteuses et son analyse bioinformatique est relativement rapide et facile, surtout pour les équipes ayant acquis une expertise sur les pathologies étudiées. Il est, de plus, évolutif puisque des cibles peuvent être ajoutées facilement au design selon les avancées des connaissances. Sa place en laboratoire de diagnostic moléculaire en France est donc des plus adaptée. Cependant, il ne permet pas la découverte de nouveaux gènes impliqués dans des pathologies humaines, contrairement à l'étude de l'exome complet (WES), voire du génome (WGS), cette dernière permettant aussi l'analyse des parties non codantes, dont les éléments régulateurs. Ces deux techniques ont pour avantage de permettre une approche naïve et non supervisée contrairement au panel qui se limite à une analyse gène-candidat. Malheureusement, les techniques de WES et WGS ne sont pas encore à la portée de tous les laboratoires puisqu'elles nécessitent des séquenceurs à très haut débit coûteux, des capacités de stockage informatique considérables et sécurisées mais également le recrutement de personnels spécialisés en bioinformatique. De plus, il est important de prendre en compte que l'étude de WES génère plus de 45 000 variants en moyenne par patient et le WGS plus de 3 millions. L'enjeu au niveau analytique n'est donc pas le même et implique un développement très important

d'outils bioinformatiques complexes et en constante évolution. Enfin, ces analyses sont associées à un risque de découverte incidente non négligeable (variations dans un gène sans lien avec le motif de la prescription). Leur utilité, en France, ne se trouve pour le moment pas en diagnostic, notamment à cause des nombreuses contraintes qu'ils imposent, mais plutôt en recherche, dans le cadre de l'identification de nouveaux évènements, gènes voire éléments régulateurs impliqués en pathologie humaine (R. C. Green et al. 2013 ; Januar et al. 2016).

La plupart de ces nouvelles technologies NGS d'étude du génome permettent désormais de détecter des CNVs (*Copy Number Variations*) de gènes, déjà décrits ou non, en pathologie humaine, grâce aux développements d'outils bioinformatiques spécifiques, alors que les analyses moléculaires usuelles, de type séquençage Sanger, n'incluaient pas ce type de détection. Auparavant, l'usage de techniques supplémentaires, telles que la PCR quantitative (qPCR), la MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), voire l'analyse comparative sur puce à ADN (ACPA ou *Comparative Genomic Hybridization array*, CGH), restait la meilleure option pour la détection de ce type d'évènement.

Parallèlement à ces techniques de séquençage, la CGH reste l'outil diagnostique le plus utilisé dans la recherche d'anomalie chromosomique chez les patients porteurs d'anomalies du développement associées ou non à une déficience intellectuelle (Aradhya et al. 2012 ; Lee et al. 2012 ; Kashevarova et al. 2014). Cette technique, implantée dans de nombreux laboratoires de diagnostic moléculaire depuis le début des années 2000, permet de rechercher, de façon pangénomique des anomalies chromosomiques déséquilibrées, de type délétions, insertions, translocations, de plus ou moins grande taille (Cheung et Bi 2018 ; Shinawi et Cheung 2008 ; Bejjani et al. 2005). Il est possible d'enrichir ces puces sur certaines zones d'intérêts par l'ajout de sondes spécifiques d'hybridation au détriment du nombre de sondes déjà présentes et pour un coût plus élevé. Le principe de la CGH réside dans la confrontation, de façon équimolaire, de l'ADN d'un patient à un ADN témoin du même sexe, sur un support solide composé de centaines de milliers de sondes. Ces sondes sont des petits oligonucléotides anti sens spécifiques qui permettront aux ADNs, marqués par un fluorophore, de s'hybrider sur la puce. Ainsi, *via* l'analyse de la fluorescence, il est possible de déterminer le nombre de copies d'un gène, d'une région chromosomique, du patient en le comparant à un ADN « de référence. Encore aujourd'hui, l'avantage principal de la CGH

réside dans son analyse pangénomique non restreinte à quelques gènes. En effet, les outils bioinformatiques développés dans le cadre du séquençage pangénomique (génomome complet) ne sont pas encore suffisamment performants pour égaler la fiabilité de la CGH. Cependant, la détection de CNVs reste limitée aux nombres de sondes présentes sur la puce et ne permet pas d'identifier de très petites insertions ou délétions de moins de 150pb contrairement à l'utilisation de qPCR et de MLPA mais dont l'analyse ne peut se faire sans *a priori*.

L'ensemble de ces techniques conduit à l'identification d'un nombre grandissant d'évènements de signification inconnue dans des gènes encore non ou peu décrits en pathologie humaine, ce qui nécessite une expertise importante dans le domaine étudié. C'est pourquoi l'existence des centres de référence est cruciale. Notre équipe fait, à ce sujet, partie de la filière de santé nationale Anomalies du Développement avec ou sans Déficience Intellectuelle de causes Rares (AnDDi-Rares) dédiée aux maladies avec anomalie du développement somatique et cognitif, avec une expertise toute particulière dans le domaine des malformations des membres.

2- Le développement des membres

Le développement du membre est un processus complexe. A la fin du premier mois de vie embryonnaire, les futurs membres sont identifiables à l'état de bourgeonnements sur le flanc de l'embryon. Ces bourgeons, constitués de cellules mésenchymateuses homogènes recouvertes d'une couche de cellules ectodermiques, vont ensuite s'allonger et se différencier afin de former les membres, constitués de 4 segments (racine / segment rhizomélique ou stylopode / segment mésomélique ou zeugopode / segment distal ou autopode) (Figure 6). Lors de cette croissance du membre, les cellules mésenchymateuses vont se condenser puis se différencier en cartilage et enfin en structures osseuses (Zeller, López-Ríos, et Zuniga 2009).

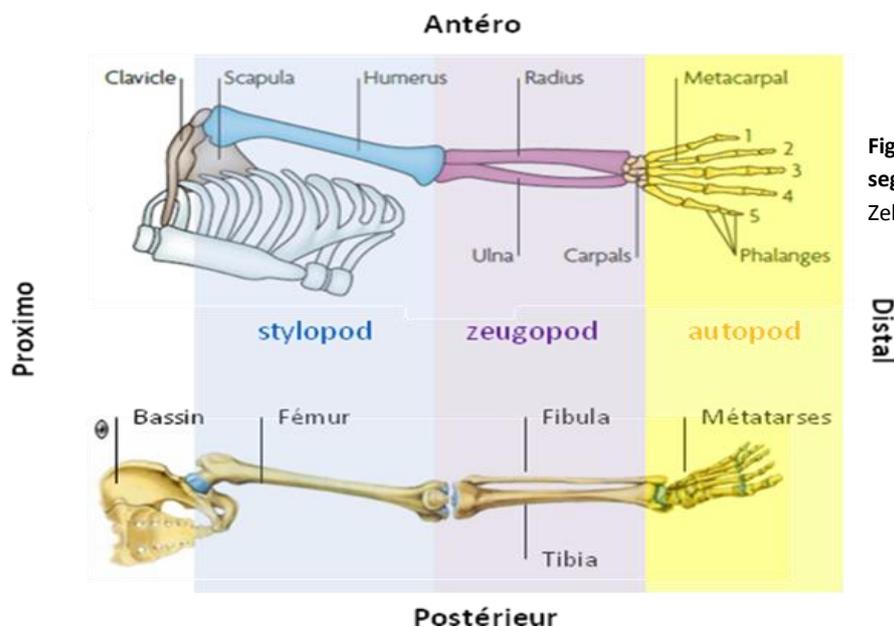


Figure 6: Schématisation des 4 segments de membre (adapté de Zeller, López-Ríos, et Zuniga 2009)

La croissance et la différenciation du bourgeon de membre s'établissent en parallèle, selon 3 axes coordonnés : proximo-distal, antéro-postérieur et dorso-ventral (Figure 7). Chez les vertébrés, chacun de ces axes est contrôlé par un centre de signalisation (Fernandez-Teran et Ros 2008) :

- La crête apicale ectodermique (*apical ectodermal ridge*, AER) régulée par la voie des facteurs de croissance fibroblastiques (*Fibroblast Growth Factors*, FGFs) préside à l'axe proximo-distal ;

- La zone d'activité polarisante (*zone of polarizing activity*, ZPA) par la voie *Sonic HedgeHog* (SHH) est essentielle à la polarisation pré-postaxiale ;
- L'ectoderme dorsal par la voie des WNTs (*Wingless integration site*) est nécessaire à la polarisation dorso-ventrale.

Une interconnexion et un dialogue permanent entre ces 3 centres de signalisation sont indispensables pour un développement normal du membre. De très nombreux facteurs sont mis en jeu afin de permettre des phénomènes conjoints et coordonnés de prolifération, migration, différenciation et apoptose cellulaire, l'ensemble étant finement régulé de façon spécifique et spatio-temporel.

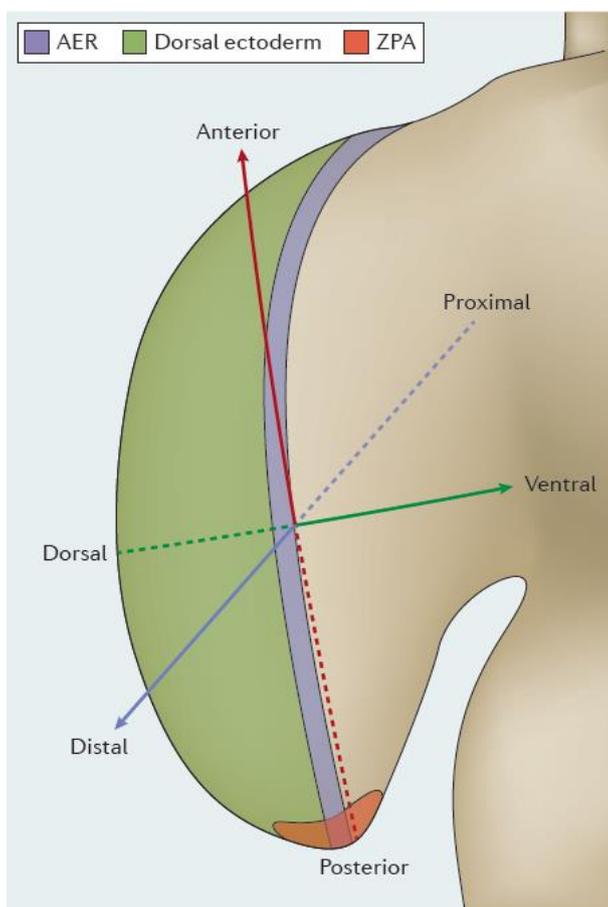


Figure 7 : Schématisation des 3 axes du développement du membre et de leur centre de signalisation (Petit, 2017).

2.i- Initiation et identité du bourgeon de membre

L'identité, le positionnement et la morphologie du membre sont définis en amont de l'initiation du bourgeon. Pour cela, une zone étroite du mésoderme latéral acquiert la capacité de créer un membre grâce à l'expression des gènes des clusters *HOXA* et *HOXD* (Medina-Martínez, Bradley, et Ramírez-Solis 2000 ; Suemori et Noguchi 2000) et à leur collaboration avec les facteurs de transcription *PBX* (Capellini, Zappavigna, et Selleri 2011). Des expérimentations chez la souris ont démontré qu'une délétion des clusters *Hoxa* ou *Hoxd* entraînait une altération de la différenciation de l'autopode (Zákány et al. 2001 ; Medina-Martínez, Bradley, et Ramírez-Solis 2000 ; Suemori et Noguchi 2000). La délétion des deux clusters, quant à elle, provoquait un arrêt précoce de la croissance du bourgeon de membre (Kmita et al. 2005). L'acide rétinoïque aurait également un rôle crucial à ce stade puisqu'il permettrait l'initiation du bourgeon de membre supérieur lors de la gastrulation (Grandel et Brand 2011).

Deux facteurs de transcription de la famille des T-box, *TBX5* et *TBX4*, permettent de différencier, respectivement, les membres supérieurs des membres inférieurs, grâce à leurs territoires d'expression restreints (Figure 8) (Duboc et Logan 2011). Chez les souris *knock-out* (KO) *Tbx5* *-/-*, les membres supérieurs sont absents (Rallis et al. 2003). A titre de comparaison, chez l'Homme, les variations hétérozygotes de type perte-de-fonction du gène *TBX5* sont responsables d'anomalies radiales des membres supérieurs et une atteinte cardiaque, tandis que les variations perte-de-fonction du gène *TBX4* sont responsables de dysplasie osseuse affectant les os des membres inférieurs et ceux du bassin. Ces deux facteurs de transcription permettent l'initiation de l'expression du gène *FGF10* codant l'un des principaux facteurs de croissance fibroblastique de l'induction de l'AER.

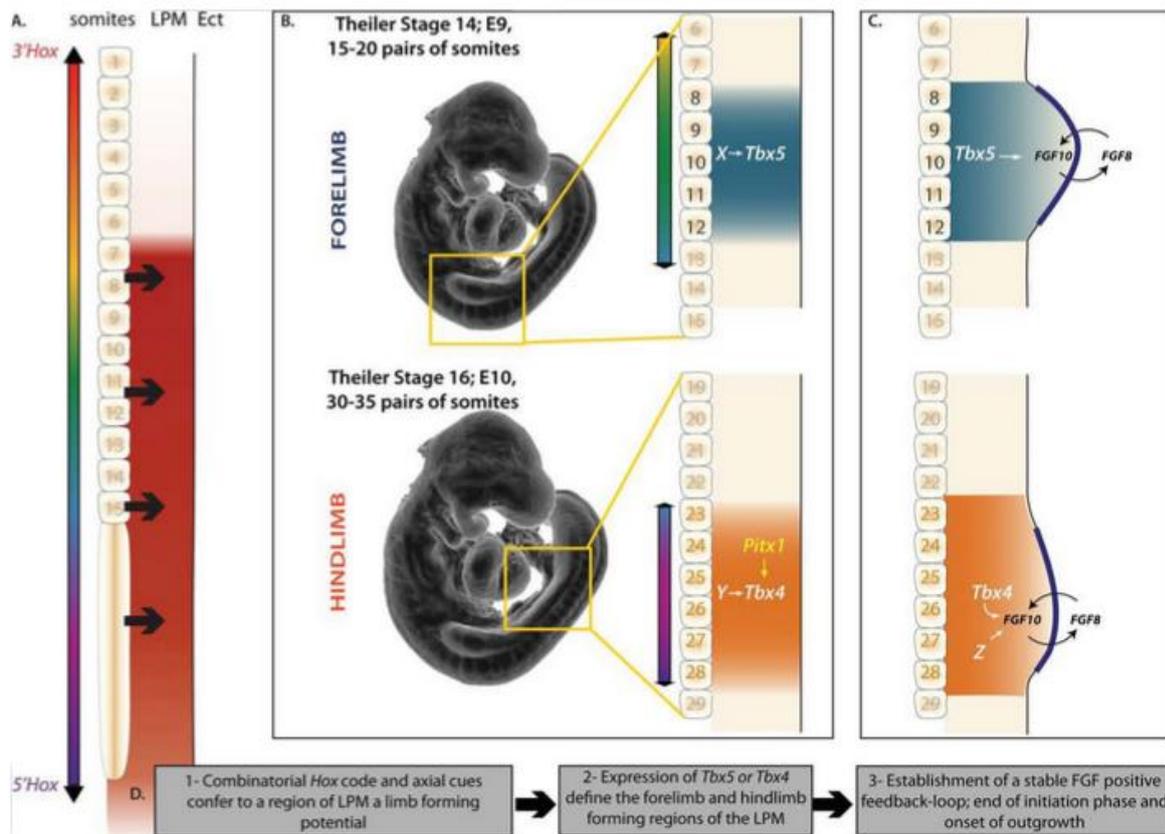


Figure 8: Schématisation de l'initiation du bourgeon de membre chez la souris. A- Le profil d'expression des gènes *Hox* dans le mésoderme latéral permet de déterminer l'identification du membre. B- Localisation de l'expression des deux morphogènes *Tbx5* dans les membres supérieurs et inférieurs respectivement. C- Initiation de l'expression de *fgf10* par les facteurs *Tbx* et établissement de la boucle de rétrocontrôle positif entre le mésoderme (*fgf10*) et l'ectoderme (*fgf8*). D- Chronologie des événements majeurs aboutissant à l'émergence du bourgeon de membre. (Duboc et Logan 2011)

2.ii-Croissance proximodistale et AER

L'AER est une structure morphologiquement dynamique et transitoire, située à l'extrémité du bourgeon du membre, essentielle à sa croissance (son ablation dans divers modèles animaux entraîne l'arrêt de croissance du bourgeon de membre) (Summerbell 1974; Rowe, Cairns, et Fallon 1982 ; Todt et Fallon 1987) ainsi qu'à sa différenciation proximo-distale (Xu et al. 1998 ; Kawakami et al. 2001). Elle assure le maintien, dans le mésenchyme sous-jacent, de la prolifération de cellules indifférenciées et en contrôle la migration, la différenciation et l'apoptose grâce à la sécrétion de facteurs de croissance et de molécules de signalisation. Les FGFs, en particulier FGF10 et FGF8, jouent un rôle essentiel, grâce à l'établissement d'une boucle de rétrocontrôle positif épithélio-mésenchymateuse (Crossley et Martin 1995 ; Xu et al. 1998). A titre d'exemple, des souris KO *Fgf10* *-/-* présentent une ébauche de bourgeon de membre, dépourvue de toute croissance (Sekine et

al. 1999), tandis que chez l'Homme, des variations perte-de-fonction hétérozygotes du gène *FGF10* provoquent des anomalies lacrymales, auriculaires, dentaires et digitales (Rohmann et al. 2006) (Figure 9-A). De même, les souris KO *Fgf8* $-/-$ arborent une absence totale de développement des membres.

De très nombreux autres acteurs sont impliqués au sein du réseau de signalisation de l'AER et régulent les signaux qui en émanent (Mills et al. 1999 ; Yang et al. 1999). Ainsi, TP63 régule indirectement l'expression de *FGF8* via les membres des familles *DLX* et *SP* (Figure 9-C). L'inactivation de *Tp63* chez la souris entraîne une réduction importante de l'expression de *Fgf8* et une altération de la formation de l'AER (Figure 9-B). Les variations perte-de-fonction du gène *TP63* chez l'Homme sont responsables de différentes pathologies, avec ou sans ectrodactylie, syndromiques ou non.



Figure 9 : Exemples de phénotypes chez des souris KO pour des gènes impliqués dans le développement de l'axe proximo- distal : A- Souris KO *Fgf10* $-/-$: absence d'AER et de développement de membre (Sekine et al. 1999). B- Souris KO *Tp63* $-/-$: diminution de l'expression de *FGF8* entraînant une altération de l'AER et l'absence du développement des membres (Mills et al. 1999). C- souris double KO *Dlx5* $-/-$ et *Dlx6* $-/-$: apparition de malformations crânio-faciales et d'extrémités fendues (Robledo et al. 2002).

Les protéines de la morphogénèse osseuse (*bone morphogenic proteins*, BMPs) jouent un rôle essentiel dans l'induction du cartilage et de l'ossification endochondrale nécessaires à la différenciation proximo-distale et à la modélisation du bourgeon. Elles sont aussi impliquées dans l'arrêt de la croissance du bourgeon et la formation des phalanges distales en modulant la voie des FGFs. L'inactivation précoce des *Bmps* chez l'embryon de poulet et de souris entraîne l'arrêt précoce de la croissance du membre, et l'absence d'AER mature (Pizette et Niswander 1999 ; Pizette, Abate-Shen, et Niswander 2001 ; Bandyopadhyay et al. 2006 ; Bénazet et al. 2009) (Figure 10). Enfin, la voie de signalisation WNT/ β caténine est également impliquée dans la maintenance de l'AER, avec notamment l'implication des protéines WNT, MSX et Sp8.

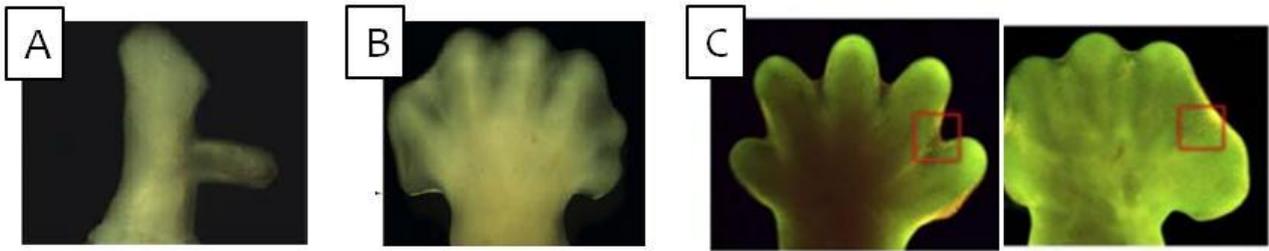


Figure 10: Exemples de phénotypes chez des souris dont l'expression des Bmps est dérégulée: A- l'absence d'expression de *Bmp4* lors de l'initiation du bourgeon entraîne l'absence d'expression de *Fgf8*. Par conséquent l'AER, et donc le membre, ne se développent pas. B- L'arrêt de l'expression des Bmps lors de la maturation du bourgeon du membre entraîne une surexpression de *Fgf8*, ce qui empêche la régression de l'AER et aboutit à l'apparition d'une polydactylie. C- L'inactivation des Bmps lors de la régression du bourgeon entraîne des syndactylies. (Bandyopadhyay et al. 2006)

2.iii- Polarisation prépostaxiale et ZPA

La ZPA est une structure mésenchymateuse située au bord postérieur du bourgeon de membre, essentielle à la différenciation antéro-postérieure (ou pré/post-axiale). Des études sur embryon de poulet ont démontré l'apparition de doigts surnuméraires en miroir lorsqu'il existe une expression ectopique de la ZPA sur le bord antérieur du bourgeon (Saunders, Gasseling, et Errick 1976). Par ailleurs, l'expression de *HAND2* et de certains gènes du cluster *HOX* permettent aux cellules de la ZPA d'exprimer spécifiquement le morphogène responsable de la polarisation antéro-postérieure, *SHH*, selon un gradient de concentration nécessaire à la différenciation des doigts. Des études similaires d'expression ectopique de *Shh* ont montré le même phénotype de main en miroir (Riddle et al. 1993), alors que l'inactivation de ce morphogène engendre l'absence de doigt, en dehors du pouce dont la différenciation est sous le contrôle de *GLI3* (Chiang et al. 2001). Une séquence régulatrice de *SHH*, la ZRS (*ZPA regulatory sequence*), située à un mégabase en amont de celui-ci, a été mise en évidence en 2003 (Lettice et al. 2003). Régulant l'expression de *SHH* spécifiquement au niveau du bourgeon de membre grâce à la formation d'une boucle chromatinienne, elle intervient donc également dans la différenciation de l'autopode (Lettice et al. 2014).

Le mécanisme d'action de la protéine SHH est complexe et fait intervenir de nombreux autres acteurs (ALX, FGF, ETS, GATA,...) pouvant agir directement sur *SHH* ou par l'intermédiaire de la ZRS. Pour exemple, une nouvelle séquence régulatrice de *SHH*, appelée la pré-ZRS, localisée 500pb en amont de la ZRS, a été décrite très récemment (Xiang et al.

2017 ; Potuijt et al. 2018). Enfin, un potentiel nouvel élément régulateur situé à 204 kb de *SHH* a été identifié chez une famille présentant des polydactylies préaxiales associées à une hypertrichose au niveau de la nuque (Florence Petit et al. 2016).

2.iv- Polarisation dorsoventrale et voie WNT

Le troisième axe de polarisation des membres, dorso-ventrale, est sous la dépendance de la voie de signalisation WNT, exprimée spécifiquement par l'ectoderme dorsal. Le principal acteur en est le facteur de transcription WNT7A dont l'expression génique est réprimée au niveau du territoire ventral par son antagoniste EN1 (engrailed-1) lui-même régulé par la voie des BMPs (Riddle et al. 1995). Une expression ectopique de Wnt7a chez la souris provoque l'apparition d'un phénotype dorso-dorsal, alors que son inactivation engendre un phénotype ventro-ventral (Cygan, Johnson, et McMahon 1997), tout comme chez les souris KO *En1* *-/-* (Haixu Chen et Johnson 2002). Un troisième gène de la voie Wnt, *LMX1B*, est indispensable pour l'initiation et la régulation du développement asymétrique de l'axe dorso-ventral. Sa régulation spatio-temporelle est gérée, notamment, grâce à l'expression de *WNT7A* au niveau du mésenchyme dorsal au début du développement des bourgeons de membres (Vogel et al. 1995). Ainsi, *LMX1B* façonne une frontière nette entre les parties dorsale et ventrale ; frontière qui sera maintenue tout au long du développement embryonnaire.

3- Etiologies des malformations des membres

Les causes des malformations des membres sont multiples.

Certaines sont secondaires à des facteurs externes et environnementaux (infectieux, chimiques, radiotoxiques, tératogènes...). Pour exemple, on peut citer le traitement par la Thalidomide (Vargesson 2019), dont l'affaire éclata en novembre 1961, ou la Dépakine, qui peut être responsable d'anomalies du rayon radial.

Dans d'autres cas, les malformations des membres ont pu être rattachées à des causes génétiques multifactorielles. La majorité de ces anomalies géniques sont des variations nucléotidiques d'une ou plusieurs paires de bases (SNVs, *Single Nucleotide Variations*), de variations en nombre de copies (CNV) de gènes et d'anomalies d'éléments régulateurs ou de perturbations des interactions entre éléments régulateurs et gènes.

Enfin, la variabilité d'expression intra-familiale et les défauts de pénétrance souvent observées dans ces malformations, plaident en faveur d'une transmission multifactorielle.

4- Classification des malformations des membres

On peut classer les malformations des membres en trois grandes catégories : (Manouvrier-Hanu, Holder-Espinasse, et Lyonnet 1999 ; Grzeschik 2002 ; Manouvrier-Hanu et Mezel 2010)

- Les anomalies réductionnelles ;
- Les structures surnuméraires, exceptionnellement proximales, il s'agit essentiellement des polydactylies ;
- Les anomalies de fusion exceptionnellement proximales, il s'agit essentiellement des syndactylies.

4.i- Anomalies réductionnelles

Les anomalies réductionnelles sont des anomalies déficitaires des membres. Elles peuvent être transversales ou longitudinales et plus ou moins proximales.

○ **Anomalies réductionnelles totales :**

- L'amélie correspond à l'absence complète d'un ou plusieurs membres. L'amélie des 4 extrémités (MIM #601360) est une pathologie autosomique récessive syndromique extrêmement rare, liée à des variations pathogènes du gène *WNT3*. En revanche, la cause de l'amélie non syndromique des deux membres supérieurs n'est pas connue.

○ **Anomalies réductionnelles transversales :**

- L'hémimélie transversale (Figure 11) d'un seul membre supérieur (ou Agénésie Transversale d'un Membre Supérieur, ATMS), récemment médiatisée sous le terme erroné de « bébés sans bras » est la plus fréquente des malformations réductionnelles des membres. Sa prévalence est estimée à 1,7/10 000 naissances. Elle est sporadique et attribuée à un accident vasculaire précoce au niveau de l'AER.



Figure 11 : Photographie d'hémimélie transversale d'un membre supérieur.

○ **Anomalies réductionnelles longitudinales :**

Les anomalies réductionnelles longitudinales correspondent au déficit de développement du bord pré ou post-axial du bourgeon de membre. Les plus fréquentes sont les anomalies préaxiales, radiales et tibiales.

- Anomalies préaxiales radiales :

Les anomalies radiales peuvent être uni ou bilatérales, plus ou moins sévères (limitées au pouce, avec hypo ou aplasie du radius, voire hypoplasie humérale). Elles sont très hétérogènes sur un plan étiologique et, le plus souvent, syndromiques. Parmi les très nombreuses causes des anomalies radiales, certaines pathologies présentent des phénotypes qui peuvent être chevauchants, d'où l'importance du diagnostic moléculaire pour orienter le suivi du patient. Parmi ces étiologies on peut citer :

- Des pathologies qui pourront être écartées par l'étude du caryotype (trisomie 13,...) et la recherche de fragilité chromosomique et/ou de signes hématologiques (Maladie de Fanconi (MIM #227850) ; maladie de Blackfan-Diamond (MIM #105650) ; et nombreux autres) ; le syndrome de Holt-Oram (HOS, MIM #142900) dans lequel les malformations radiales, toujours bilatérales mais souvent asymétriques, sont associées à des anomalies cardiaques de sévérité variable (cardiopathies congénitales et/ou troubles du rythme). Le HOS est lié à des mutations de *TBX5* (Clémence Vanlerberghe et al. 2019; Q. Y. Li et al. 1997).
- Le syndrome de Okihiro (MIM #607343), lié aux variations délétères de *SALL4*. Aux malformations rencontrées dans le HOS, il associe des anomalies oculaires (malformation de Duane, strabisme...), rénales, et auriculaires avec ou sans surdité ... (Figure 12)



Figure 12 : Exemple d'anomalie réductionnelle longitudinale radiale (aplasie du radius et du pouce) dans un cas de syndrome de Okihiro.

- Le syndrome Lacrimo-Auriculo-Dento-Digital (LADD, MIM #149730), associant anomalies digitales, dentaires, auriculaires et lacrymales, est dû à des mutations des gènes *FGF10*, *FGFR2* ou *FGFR3*.
- Le syndrome de Townes-Brocks (MIM #107480), lié aux anomalies de *SALL1*, est caractérisé par une imperforation anale, des oreilles dysplasiques, une surdité neurosensorielle et des malformations des pouces.
- Le syndrome de Nager (MIM #154400), lié aux mutations de *SF3B4*, associe une dysostose mandibulo-faciale très caractéristique aux anomalies radiales (Figure 13).

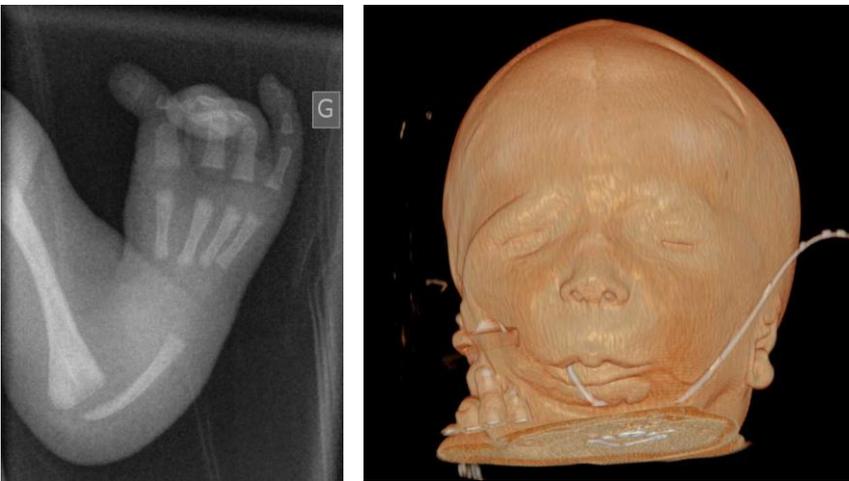


Figure 13 : Anomalie longitudinale radiale et dysostose mandibulofaciale dans le cadre d'un syndrome de Nager.

- Les mutations du gène *RECQL4* sont à l'origine de deux syndromes distincts à transmission autosomique récessive (homozygote, plus rarement hétérozygote composite) : le syndrome RAPADILINO (MIM #266280) associant des anomalies RADiales, PATellaires, des troubles digestifs de type Diarhées, une petite taille (Little) et un grand nez (NOse) ; tandis que le syndrome de Baller-Gerold (MIM #218600) est caractérisé par l'association d'une craniosténose aux anomalies radiales.
- Le syndrome Thrombopénie Aplasie Radiale (TAR, MIM #274000), est caractérisé par la présence pathognomonique des pouces malgré l'atteinte radiale bilatérale qui est associée à une thrombopénie (Figure

14). Le syndrome TAR est lié à des anomalies bialléliques du gène *RBM8A*, un allèle dit « nul », le plus souvent délété ou porteur d'une variation tronquante, et d'un allèle hypomorphe relativement fréquent dans la population générale.



Figure 14 : Main bote radiale avec pouce présent en cas de syndrome TAR.

- Enfin, certaines anomalies radiales ne sont pas liées à des anomalies génétiques, comme l'association VACTERL (*Vertebral-Anal-Cardiac-Tracheo-Esophageal-Renal/Radial-Limb*) et l'embryofetopathie au Valproate.
- Les anomalies préaxiales tibiales sont exceptionnelles. Cliniquement, elles sont responsables de pieds bots. Elles peuvent être, liées aux mutations « perte de fonction » de *PITX1*, associées à des polydactylies dans le syndrome de Werner (MIM #188740) lié à des variations de la ZRS ou encore rencontrées en association avec des mains ou pieds fendus et rentrent alors dans le cadre d'une « *Split Hand Foot malformation with Long bone Deficiency* » (SHFLD, MIM#612576) lié aux anomalies de *BHLHA9* qui sera évoqué ci-dessous dans le paragraphe consacré aux mains et pieds fendus.
- Les anomalies longitudinales postaxiales sont, elles aussi, beaucoup plus rares que les anomalies radiales.
 - Si elles atteignent les 4 membres, on évoquera l'achéiropodie (MIM #200500) (Figure 15), dont le nom n'est pas adapté, puisqu'elle est caractérisée par une atteinte longitudinale postaxiale sévère mais avec présence des premiers rayons (pouces et hallux). Cette pathologie

autosomique récessive exceptionnelle est due à une perte de fonction bi-allélique de la ZRS, le plus souvent par délétion intragénique du gène *LMBR1*.



Figure 15: Enfant atteint d'achéropodie.

- Dans le syndrome Ulnar Mammary ou cubito-mammaire (MIM #181450) le déficit postaxial atteignant les membres supérieurs est associé à une atteinte des glandes mammaires et apocrines et des anomalies génitales. Cette affection est liée à des variants pathogènes de *TBX3*.
- Les anomalies mésoaxiales sont parfois dénommées « ectrodactylies », notamment dans la littérature médicale anglo-saxonne. Le terme *Split Hand Foot Malformation (SHFM)* est cependant plus adapté. Elles sont caractérisées par l'absence d'un ou plusieurs rayons médians, d'une ou plusieurs extrémités (Figure 16) (Elliott, Evans, et Chudley 2005 ; Jindal, Parmar, et Kumar 2009 ; Keyal et al. 2011), pouvant aller jusqu'à une monodactylie. Elles peuvent toucher les mains et/ou les pieds, de façon uni ou bilatérale et peuvent présenter un caractère syndromique. Elles sont le plus souvent asymétriques. Très hétérogènes au plan moléculaire, elles sont actuellement classées en 7 sous-groupes en fonction de leur localisation génomique.



Figure 16: Photographies de mains fendues.

- SHFM1 (MIM #183600) : caractérisée par l'association de SHFM à une dysostose mandibulo-faciale et/ou une surdité neurosensorielle et liée à des anomalies des gènes *DLX5* et *DLX6*. Il s'agit généralement de délétions en 7q21, de remaniements génomiques de la région perturbant les interactions entre ces gènes et leurs éléments régulateurs (exons 15 et 17, appelés eExons pour « *enhancer exons* », du gène *DYNC111*), de délétions de ces derniers (Lango Allen et al. 2014) ou enfin, de mutations homozygotes de *DLX5*.
- SHFM2 (MIM #313350) : cette forme de SHFM n'a été décrite que dans une seule famille, dans laquelle elle semblait transmise sur un mode lié à l'X. Sa cause moléculaire n'est pas identifiée.
- SHFM3 (MIM #246560) : dans notre expérience, il s'agit de la forme la plus fréquente de SHFM. La malformation des extrémités y est, le plus souvent isolée, atteint habituellement les 4 extrémités, parfois de manière asymétrique. Sa forme la plus sévère est la monodactylie tétramélique. La SHFM3 est due à une duplication en tandem de taille variable du chromosome 10 (dup10q24), impliquant plusieurs gènes (*BTRC*, *FBXW4*, *FGF8*, *LBX1*) (de Mollerat et al. 2003 ; Holder-Espinasse et al. 2019).
- SHFM4 (MIM #605289) : cette forme de SHFM liée aux variations (SNVs et CNVs) du gène *TP63* est rare lorsque les malformations sont limitées aux extrémités. Les anomalies de ce gène sont cependant plus souvent responsables de pathologies syndromiques incluant ou non une ectrodactylie. Le plus fréquent est le syndrome EEC (*Ectrodactyly Ectodermal dysplasia and Cleft lip/palate syndrome*, MIM #604292) qui associe, avec une très importante variabilité d'expression, ectrodactylie, dysplasie ectodermique et fente labiopalatine. Parmi les « P63 pathies », on citera également : avec ectrodactylie le syndrome ADULT (*Acro-Dermato-Ungual-Lacrimal-Tooth*, MIM #103285) et le syndrome *Limb Mammary* (LMS, MIM #603543) ; sans ectrodactylie : les syndromes de Rapp-Hodgkin (MIM #129400) et ankyloblépharon-anomalies ectodermiques-fente labiopalatine (AEC ou Hay-Wells, MIM #126260).

- SHFM5 (MIM #606708) : les délétions de l'ensemble du cluster *HOXD* (localisé en 2q31) ont été impliquées dans cette forme très rare et sévère de SHFM. Le spectre phénotypique peut cependant être voisin des formes sévères de synpolydactylie, qui est liée aux anomalies du gène *HOXD13*.
- SHFM6 (MIM #225300) : cette forme rare, liée à des anomalies bi-alléliques de *WNT10B*, est transmise sur un mode autosomique récessif.
- Les *Split Hand Foot Malformation Long Bone Deficiency* (SHFLD, MIM #119100), regroupent un spectre très hétérogène de malformations réductionnelles des membres pouvant être limitées à une main fendue, une forme « typique » de SHFM, ou associer ectrodactylie et anomalies des os longs (tibia le plus souvent mais aussi radius) (Figure 17). De pénétrance incomplète et grande variabilité d'expression intrafamiliale, ces anomalies sont génétiquement hétérogènes. Une des causes moléculaires correspond à des duplications ou triplications de tailles variables localisées en 17p13 impliquant notamment le gène *BHLHA9* (F. Petit et al. 2014). Les autres causes restent à identifier.

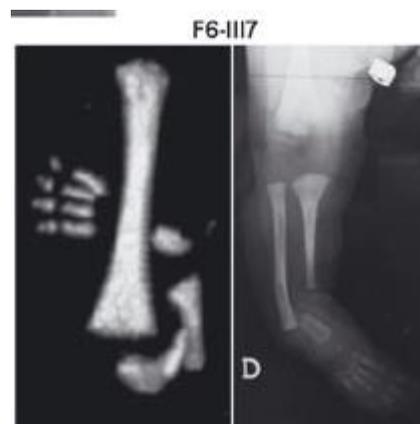


Figure 17 : SHFLD par délétion *BHLHA9*. (Petit et al. 2014)

- D'autres causes plus rares de SHFM isolées ou syndromiques ont été plus récemment identifiées. Parmi elles, le syndrome de Hartsfield (MIM #615465), associant holoprocéphalie, ectrodactylie et fente labiopalatine, est lié à des variations hétérozygotes du gène *FGFR1*, le syndrome « Dysplasie ectodermique – ectrodactylie – dystrophie maculaire » est rattaché à des variations bi-alléliques de *CDH3* (MIM

#225280), et enfin des formes isolées de SHFM rattachées à des variations autosomiques dominantes de *EPS15L1* (Umair et al. 2018) et autosomiques récessives de *ZAK* (Flöttmann et al. 2018).

- Anomalies longitudinales de classification difficile :

Un aspect de déficit longitudinal pré et/ou postaxial, pouvant parfois évoquer une ectrodactylie peut être rencontré dans le syndrome de Cornelia de Lange (MIM #122470, #300590, #300882, #61079, #614701). Il faut penser à cette hypothèse si l'anomalie des membres est associée à un retard de croissance, une dysmorphie typique avec hirsutisme...

- Anomalies réductionnelles intercalaires :

Celles-ci sont exceptionnelles, il s'agit essentiellement de la phocomélie, dans laquelle le segment acromélique du membre supérieur est appendu directement à un segment rhizomélique rudimentaire voire absent. Cette malformation peut correspondre à un équivalent d'atteinte réductionnelle radiale et peut être retrouvée en cas de syndrome de Holt-Oram, Okihiro, TAR, ..., et d'embryofetopathie de la Thalidomide.

On peut classer ici également, même si les malformations des membres y sont souvent encore plus sévères que la phocomélie, les pathologies liées aux variations bi-alléliques de *WNT7A* : Schinzel phocomelia ou syndrome de Al-Awadi / Raas-Rothschild (MIM #276820) et syndrome de Fuhrmann (MIM #228930).

- Anomalies réductionnelles distales :

- La plus fréquente des anomalies réductionnelles distales est la maladie des brides amniotiques, qui n'a pas de caractère génétique (Figure 18). De même, peut être citée ici la symbrachydactylie, attribuée à un accident vasculaire, et qui peut s'intégrer dans un syndrome de Poland (associée à une agénésie homolatérale du muscle pectoral), également sporadique.



Figure 18 : Maladie des brides amniotiques.

- Le principal diagnostic différentiel de ces affections est le syndrome d'Adams-Oliver caractérisé par l'association d'une anomalie réductionnelle transverse au niveau des doigts associée à une aplasie du vertex, de diagnostic parfois difficile. Cette affection est génétiquement très hétérogène. Les différents types 1 (MIM # 100300), 2 (MIM #614210), 3 (MIM #614814), 4 (MIM #615297), 5 (MIM #616028) et 6 (MIM #616589) sont respectivement liés aux variations des gènes *ARHGAP31*, *DOCK6*, *RBPJ*, *EOGT*, *NOTCH1* et *DLL4*.
- Les brachydactylies peuvent être intégrées dans ce paragraphe, car certaines d'entre elles sont associées à un aspect d'amputation distale des doigts. Elles regroupent un large spectre de pathologies très hétérogènes au plan clinique et génétique caractérisées par la brièveté d'un ou plusieurs segments osseux de l'autopode (Figure 19) (David et al. 2016). Selon la classification de Bell effectuée en 1951 on distingue :

- Les brachydactylies de type A (BdA), affectant les phalanges médianes, dont il existe 7 sous types. Les plus fréquentes sont la BdA1 (MIM #112500) classiquement liée aux variations de *IHH*, mais dont il existe des formes rattachées à des variations de *BMPR1B* ou *GDF5*; la BdA2 (MIM #112600), également génétiquement hétérogène, pouvant être due à des variations de *BMPR1B*, *GDF5* ou des duplications de la région ECR2 (séquence régulatrice de *BMP2*); la BdA3, correspondant à la brachymésophalangie des 5^{èmes} doigts, est fréquente dans la population générale et rencontrée dans de nombreuses pathologies syndromiques (T21 par exemple)
- Les brachydactylies de type B (BdB) sont caractérisées par l'atteinte des phalanges distales et parfois médianes voire proximales des quatre extrémités. Elles constituent le principal diagnostic différentiel de la maladie des brides amniotiques. Elles sont génétiquement hétérogènes. La forme la plus fréquente (BdB1, MIM #113000) est secondaire aux variations de *ROR2*. Lorsque la BdB est associée à un symphalangisme (BdB2, MIM #611377), elle est rattachée à des variations de *NOG*.
- Les brachydactylies de type C (BdC, MIM #113100) sont caractérisées par l'atteinte des phalanges médianes des rayons II à V, avec relatif respect du 4^{ème} rayon, aspect de polyphalangie et atteinte du 1^{er} métacarpien. Le gène en cause est *GDF5*.
- Les brachydactylies de type D (BdD) affectent la phalange distale du pouce lui conférant un aspect de « moignon ». Elles peuvent être isolées (MIM #113200), et sont alors rattachées à des variations de *HOXD13*; ou retrouvées dans de nombreux syndromes malformatifs (Syndrome de Rubinstein Taybi par exemple)
- Les brachydactylies de type E (BdE), touchent les métacarpiens et ou métatarsiens et sont souvent associées à une petite taille. Elles sont rencontrées dans de nombreux syndromes (syndrome de

Turner, syndrome d'Albright...). Lorsqu'elles semblent isolées, elles sont génétiquement hétérogènes et peuvent être liées à des variations de *PTHLH*, *HOXD13*, *HDAC4*, *PDE3A* (chercher alors une hypertension).

➤ Enfin, citons dans ce groupe des brachydactylies, les syndromes Tricho-Rhino-Phalangiens (TRPS) de type 1 et 2 (MIM #190350 et #190351). Le type 1 est caractérisé par l'association d'une brachydactylie atteignant les phalanges et les métacarpiens /tarsiens avec épiphyses en cône et arthrose précoce, avec des cheveux rares et fins et un nez bulbeux. Il est lié aux variations de *TRPS1*. Ils ne doivent pas être confondus avec le syndrome de Langer-Giedion, ou tricho-rhinophalangien de type 2, qui est un syndrome microdélétionnel associant les signes du TRPS à des exostoses et, fréquemment, une déficience intellectuelle.

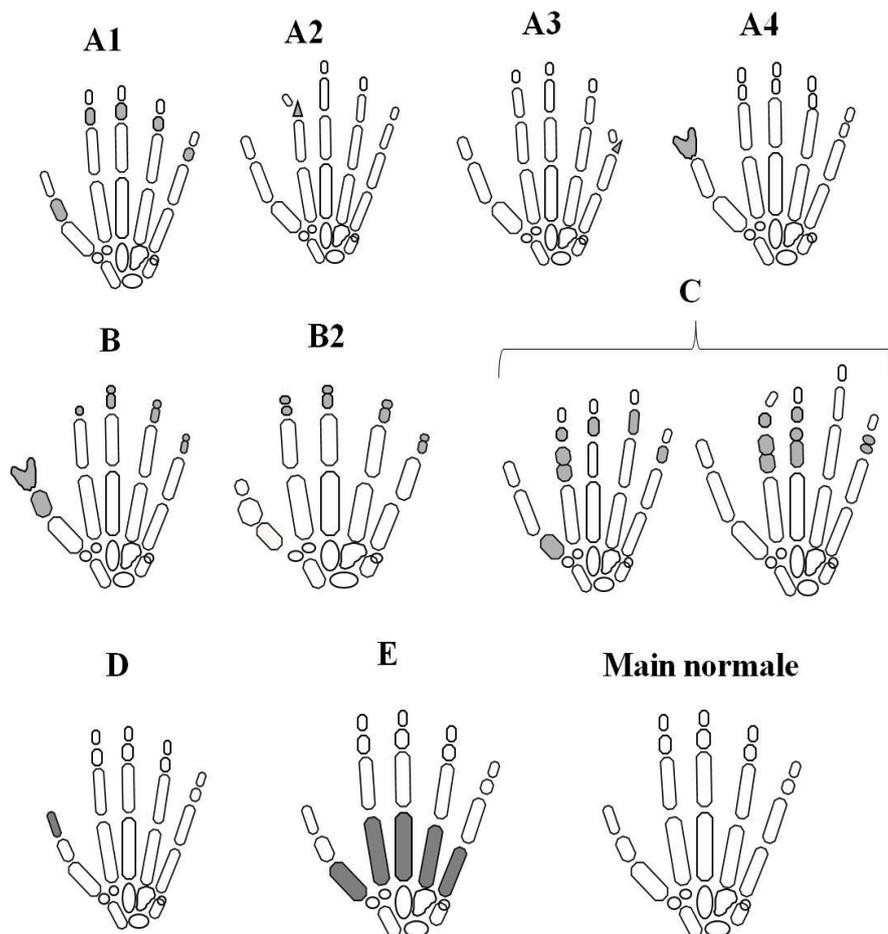


Figure 19 : Classification des différents types de Brachydactylies selon Tentamy.

- Les anomalies réductionnelles de la face dorsale des membres atteignent essentiellement les ongles et les rotules (même si la tête radiale est, elle aussi souvent concernée).

Les anomalies de la rotule (hypo ou aplasie) sont rencontrées dans de nombreux syndromes. Parmi ceux-ci, l'anomalie de la rotule est au premier plan dans deux pathologies transmises sur un mode autosomique dominant.

- Le syndrome Nail-Patella (MIM #161200) dû aux anomalies de *LMX1B* est caractérisé par une dysplasie des ongles avec lunule triangulaire, des rotules hypoplasiques ou absentes, des exostoses des ailes iliaques, une dysplasie des coudes et, parfois une néphropathie glomérulaire et/ou un glaucome à angle ouvert (Ghoumid et al. 2016; C. Vanlerberghe et al. 2017).
- Le syndrome coxo-podo-patellaire, encore appelé syndrome de la petite rotule (MIM #147891) associée à l'atteinte des rotules, une absence, un

retard ou une irrégularité de l'ossification des branches ischio-pubiennes et des anomalies des orteils. Il est lié aux variants délétères de *TBX4* (C. Vanlerberghe et al. 2017).

4.ii- Les structures surnuméraires

- **Les structures surnuméraires proximales** sont très exceptionnelles. On les rencontre, par exemple, dans le syndrome *Disorganization-like*. En revanche,
- **les structures surnuméraires distales**, affectant l'autopode, ou polydactylies, sont des malformations fréquentes (Figure 20) (Malik 2014). Elles peuvent être pré-axiales de type 1 (duplication d'un pouce à 2 phalanges), type 2 (duplication d'un pouce triphalangé), type 3 (duplication de l'index) ; post-axiales de type A (5^{ème} doigt surnuméraire bien développé) et type B (*post-minimus*) ou mésoaxiales. Enfin, l'aspect de polydactylie « en miroir » et la polysyndactylie de Haas (MIM #186000) sont très exceptionnels.

Les polydactylies sont rencontrées dans de très nombreux syndromes mais peuvent également être isolées. Les gènes qui en sont responsables sont souvent caractérisés par une hétérogénéité allélique. Par exemple, les variations délétères de *TBX5*, impliqué dans le syndrome de Holt-Oram peuvent être responsables au niveau des extrémités d'anomalies réductionnelles radiales ou de pouces triphalangés ; les variations de *GLI3* peuvent être responsables de polydactylies pré et/ou postaxiales dans le cadre du syndrome de Greig (MIM #175700), de polydactylies mésoaxiales dans le cadre d'un syndrome de Pallister-Hall (MIM #146510) ou de simples polydactylies postaxiales de type A ou B (MIM #174200). Enfin, les anomalies de la ZRS peuvent être responsables de pouces triphalangés, polydactylies préaxiales, polydactylies en miroir et polydactylie de Haas.

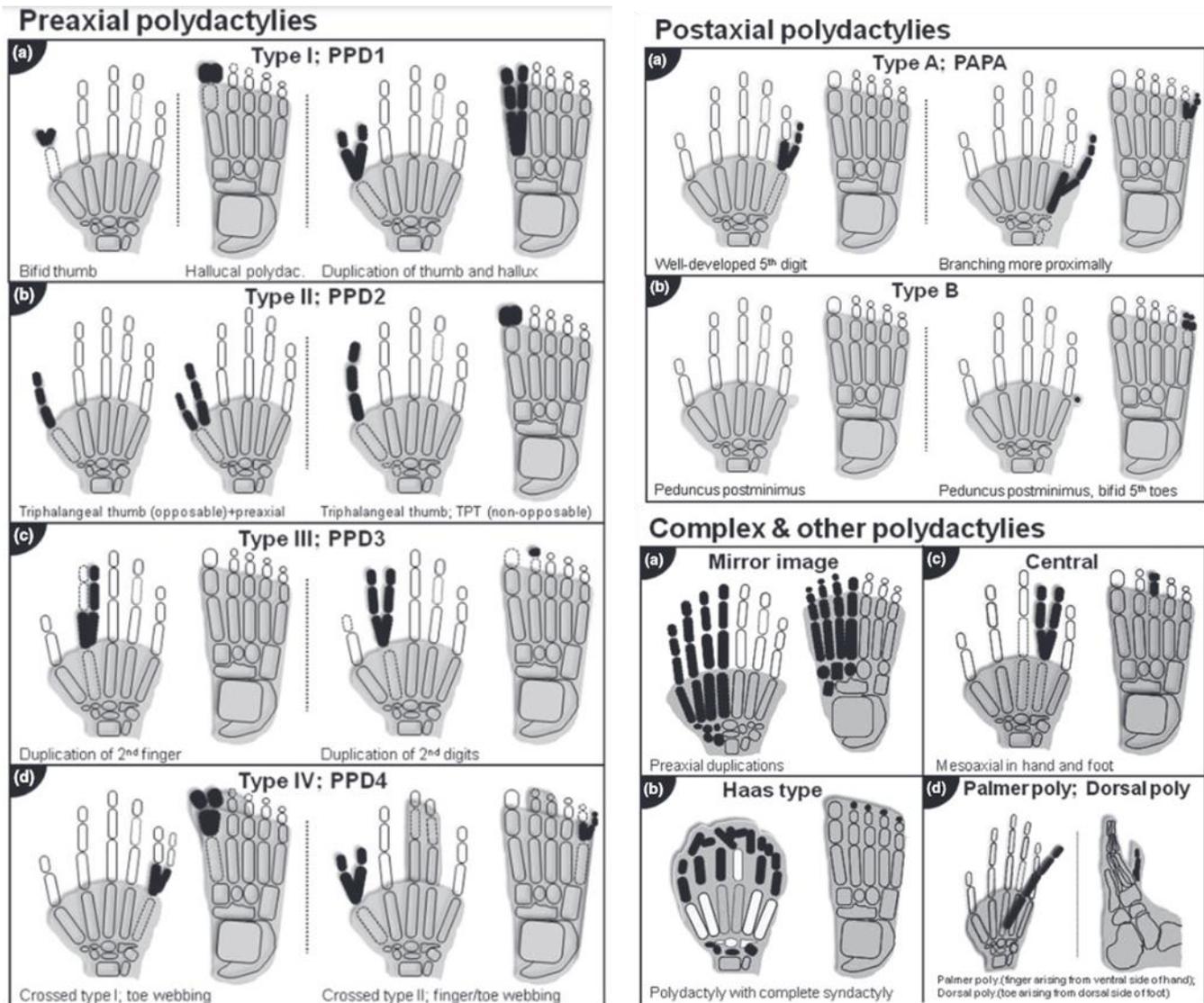


Figure 20: Classification des différents types de polydactylies d'après Malik, 2014.

4.iii- Les Anomalies de fusion

○ Anomalies de fusion proximales

Tout comme les malformations surnuméraires, les anomalies de fusion sont très rarement proximales. Peuvent, cependant, être citées la sirénomélie (qui, en l'état actuel des connaissances n'a pas de *substratum* moléculaire) ; la synostose huméro-radiale, qui peut être isolée ou syndromique (associée à une craniosténose en cas de syndrome d'Antley Bixler (MIM #207410 et #201750) respectivement liés aux anomalies des gènes *FGFR2* et *POR*) ; la synostose radio-cubitale, qui est un équivalent d'anomalie radiale (Figure 21).



Figure 21 : Radiographie d'une synostose huméro-radiale à gauche, et d'une synostose radio-ulnaire dans le cas d'un syndrome de Holt-Oram à droite.

○ Anomalies de fusion distales

Au niveau de l'autopode, les fusions peuvent concerner les rayons entre eux (syndactylies) ou les phalanges d'un même rayon (symphalangisme), pouvant aussi s'étendre aux os du carpe ou du tarse (synostoses carpaux et/ou tarsiennes)

- Les syndactylies peuvent, selon la classification de Winter, être pré, post ou méso-axiales ou globales (Figure 22).
 - Les syndactylies préaxiales sont des équivalents d'atteinte radiale ;
 - Les syndactylies mésoaxiales peuvent correspondre à des équivalents de SHFM. Cependant, on citera dans ce groupe essentiellement la synpolydactylie (MIM #186000) liée à une anomalie très particulière de *HOXD13* associée à une expansion de polyalanines au niveau protéique ;
 - Les syndactylies postaxiales peuvent être isolées ou syndromiques :
 - Les variants pathogènes de *GJA1* peuvent être responsables d'une forme isolée (syndactylie de type 3, MIM #186100) ou syndromique dans le cadre du syndrome oculo-dento-digital de transmission autosomique dominante ou récessive (MIM #164200 et #257850).
 - Le syndrome de Timothy (MIM #601005), qui associe une syndactylie postaxiale à des troubles du rythme (QT long) et parfois une déficience intellectuelle, une comitialité, des hypoglycémies, ..., est lié aux variations pathogènes de *CACNA1C*.

- Lorsque la syndactylie postaxiale concerne les métacarpiens, il peut s'agir d'une syndactylie de type V (MIM #186300) liée à des variations pathogènes de *HOXD13* ou du syndrome de fusion des métacarpiens IV et V (MF4, MIM #309630) rattaché aux anomalies de *FGF16*.
- Parmi les syndactylies totales et/ou complexes on citera :
 - La syndactylie de Cenani Lenz (MIM #212780) ou syndactylie de type 6 est une pathologie autosomique exceptionnelle liée aux variations de *LRP4* ;
 - Des syndactylies complètes en « moufles » et « chaussettes », plus ou moins associées à des polydactylies, peuvent être isolées et liées à des variations gain de fonction sévères de la ZRS, ou syndromiques dans le cadre d'acro-céphalo-polysyndactylies, comme le syndrome d'Apert (MIM #101200).
 - Les symphalangismes de type A et B (MIM #185800 et #615298) sont caractérisés par la fusion progressive des phalanges avec perte de l'espace interarticulaire et de la mobilité des doigts. Ils sont respectivement liés à des anomalies des gènes *NOG* et *GDF5*. Le symphalangisme peut être associé à des synostoses du carpe et du tarse dans le cadre du syndrome de coalition carpo-tarsienne (MIM #186570) lié aux anomalies de *NOG*. Enfin, les anomalies peuvent s'étendre à l'ensemble du squelette y compris aux osselets (responsable d'une surdité) dans le cadre du syndrome des synostoses multiples (MIM #186500 ; #610017 ; #612961 et #617898) qui est génétiquement très hétérogène et peut être lié aux variations délétères de *NOG*, *GDF5*, *FGF9* et *GDF6*.

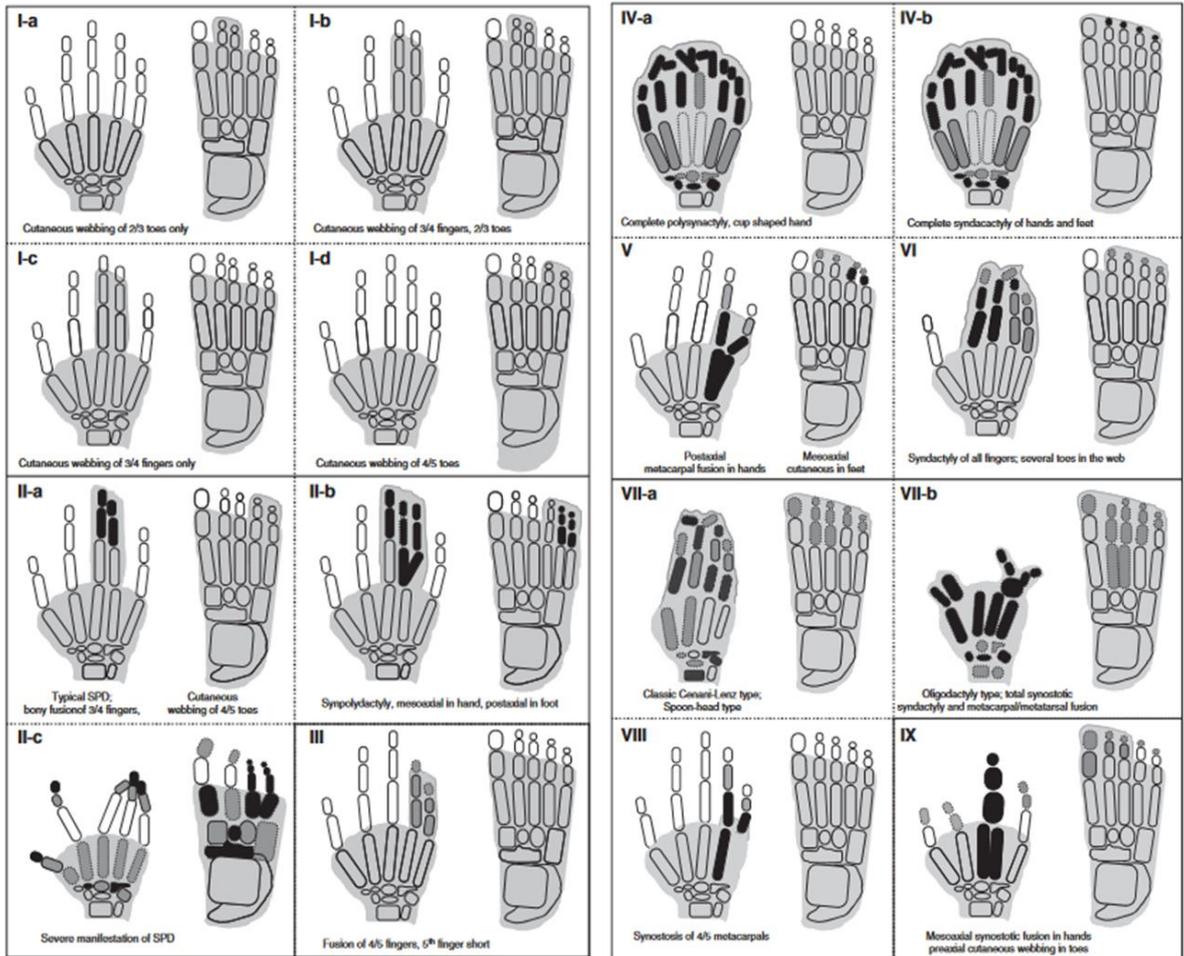


Figure 22 : Classification des différentes syndactylies d'après Malik, 2012

TRAVAIL DE THESE

1- Objectifs

Impliquée depuis plus de 20 ans dans l'identification des anomalies génétiques responsables de malformations des membres isolées ou syndromiques, notre équipe a constitué une cohorte nationale de plus de 1200 patients « cas index ». Une anomalie moléculaire a pu être identifiée dans environ 1/3 des cas, grâce à la mise en place d'analyses moléculaires orientées par l'expertise clinique. Il s'agissait le plus souvent d'analyses réalisées par séquençage Sanger de façon séquentielle en ciblant le ou les gènes décrits comme impliqués dans la pathologie. Les CNVs n'étaient étudiés que pour un nombre restreint de gènes en fonction des techniques d'analyses disponibles au laboratoire (MLPA, qPCR). Ainsi, chez près de 1000 patients « cas index », porteurs de syndromes rares impliquant des anomalies des membres, le déterminisme moléculaire restait à découvrir.

En mettant à profit cette cohorte exceptionnelle de patients et les progrès des analyses du génome, mon travail de thèse, (dont la stratégie est schématisée en Figure 23), avait deux objectifs :

- D'une part un objectif fondamental : l'identification de nouveaux gènes impliqués dans le développement des membres. Pour cela, nous avons utilisé à la fois une stratégie de type « gènes candidats » (de par les modèles animaux, leur territoire d'expression et/ou leur implication dans une voie de signalisation participant au développement des membres) et des études pangénomiques (ACPA et analyse d'exome). Les gènes ainsi identifiés ont ensuite été validés grâce à des études fonctionnelles ;
- D'autre part un objectif de recherche translationnelle, visant à établir un panel performant utilisable en routine pour le diagnostic moléculaire des malformations des membres.

Nous présenterons ce travail selon le plan suivant :

Après un premier chapitre consacré au matériel et méthodes utilisés (constitution des cohortes de patients, technologies mises au point), nous détaillerons l'ensemble des résultats qui nous ont permis non seulement d'établir un panel NGS efficace dans le cadre du diagnostic moléculaire des malformations des membres mais également d'identifier des

variants dans des gènes non décrits en pathologie humaine. Puis, nous présenterons les différentes études fonctionnelles réalisées sur ces gènes candidats. Enfin, nous discuterons l'apport des nouvelles technologies d'analyse du génome dans l'étude du développement des membres et des pathologies associées.

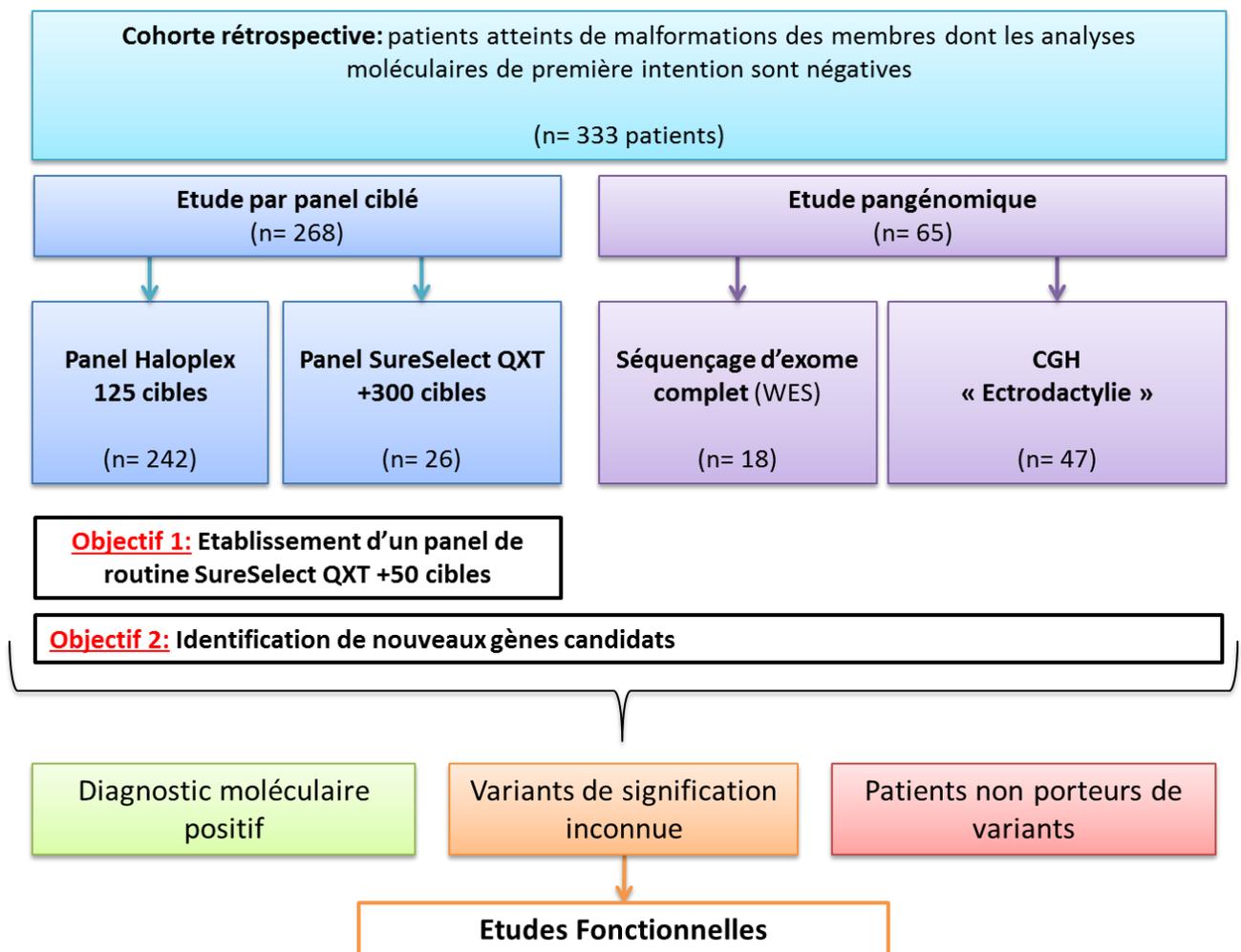


Figure 23: Schématisation de la stratégie du travail de thèse.

2- Matériel et Méthodes

2.i- Cohortes de patients

La sélection des patients a été réalisée sur des critères phénotypiques stricts. Les dossiers devaient être complets : consentement permettant l'analyse NGS, communication des données cliniques et iconographiques (photographies et/ou radiographies) permettant d'établir un tableau clinique parfaitement détaillé. Les patients pour lesquels le dossier clinique était incomplet mais également ceux dont l'échantillon d'ADN n'était pas disponible, ou lorsque celui-ci était de trop mauvaise qualité, ont été exclus de l'étude.

Un premier travail a consisté à établir une classification phénotypique des patients en grands groupes de pathologies. Nous avons choisi de ne pas utiliser la classification « anatomique » décrite dans le chapitre précédent, mais d'y intégrer les notions plus récentes sur la mise en place du bourgeon de membre selon ses trois axes de développement. Ainsi, sept groupes de pathologies ont été retenus :

- Anomalies isolées ou syndromiques ;
- Ectrodactylies : regroupant les anomalies réductionnelles mésoaxiales isolées ou syndromiques ;
- Autres anomalies réductionnelles : regroupant les amélies, hémimélies transversales longitudinales postaxiales, phocomélie et anomalies distales (Syndrome d'Adams Oliver) ;
- Polydactylies y compris la synpolydactylie ;
- Brachydactylies y compris le syndrome tricho-rhino-phalangien ;
- Anomalies de fusion (syndactylies et symphalangismes),
- Anomalie patellaire.

Trois cohortes ont ensuite pu être établies :

- Dans la cohorte « rétrospective » ont été sélectionnés des patients dont les dossiers avaient été reçus entre 2000 et 2014 au laboratoire de diagnostic moléculaire de biochimie et biologie moléculaire du CHU de Lille – UF8923 Génétique des Maladies Rares et des Syndromes Malformatifs – et dont les analyses moléculaires de première intention étaient négatives.

Cette cohorte était composée de 286 patients :

- Quatre-vingt-six patients (30,1%) atteints d' « Anomalie Radiale » adressés en première intention pour une analyse des gènes *TBX5* et/ou *SALL4* et/ou *SALL1* ou *SF3B4*.
- Quatre-vingt patients (28%) porteur d' « ectrodactylie » adressés initialement pour analyse du gène *TP63*, et/ou des duplications *BHLHA9* et/ou dup10q24.32.
- Cinquante-quatre patients (18,9%) atteints de « Brachydactylies » adressés en première intention pour analyse d'un des 7 gènes responsables de brachydactylie étudiés au laboratoire (*GDF5*, *HOXA13*, *IHH*, *NOG*, *PTHLH*, *ROR2*, *WNT5A*).
- Quarante patients (14%) atteints d' « Anomalie Réductionnelle » adressés en première intention pour analyse des gènes *TBX3*, *PITX1*, *WNT7A* avec ou sans *a priori*.
- Neuf patients (3,1%) atteints de syndactylie, symphalangisme ou maladie des synostoses multiples adressés initialement pour analyse des gènes *FGF16*, *GDF5*, *GLI3*, *HOXD13* et *NOG*.
- Cinq patients (1,7%) atteints d'anomalies des rotules adressés en première intention pour analyse des gènes *LMX1B* et *TBX4*.
- Douze patients (4,2%) présentant un tableau clinique complexe ne permettant pas de les classer dans l'une des catégories phénotypiques précédentes et qui ont donc été classés dans une catégorie « Polymalformatif ».

Cette cohorte a été étudiée dans le cadre de la première partie du travail (objectif translationnel) visant à identifier de nouveaux gènes et à améliorer la « rentabilité » du diagnostic moléculaire. Ces patients ont bénéficié d'une analyse par NGS d'un panel de 125 cibles et/ou 300 cibles et/ou d'exome complet ;

- La cohorte « Ectrodactylie », composée de 47 patients, suivait les mêmes objectifs, mais était spécifique de patients porteurs de mains et/ou pieds fendus. Ces patients, chez lesquels l'analyse par séquençage et/ou qPCR était négative, ont été sélectionnés sur des critères phénotypiques stricts : présence d'au moins une extrémité atteinte, d'une agénésie ou hypoplasie d'un rayon central, ou d'une monodactylie, ou d'une syndactylie cutanée ou osseuse mésoaxiale, ou d'une

syndactylie cutanée ou osseuse 1-2 et/ou 4-5. Ces patients ont bénéficié d'une analyse par CGH pangénomique enrichie sur les zones d'intérêts déjà décrites comme associées aux pieds et mains fendus.

- La cohorte « prospective » visait à évaluer la part translationnelle de notre travail. Elle regroupe 351 patients dits « tout venant », dont les prélèvements ont été reçus entre février 2016 et mars 2019 au laboratoire de diagnostic moléculaire. Aucune analyse moléculaire, en dehors d'une CGH pangénomique, n'avait été réalisée auparavant. Ces patients ont bénéficié d'une analyse par NGS d'un panel diagnostique de 48 à 63 cibles établi au terme des investigations réalisées sur les deux cohortes précédentes.

2.ii-Analyse moléculaire par panels ciblés

Création des panels de gènes

Les panels de gènes ont été créés grâce à une revue large de la littérature utilisant les sites PubMed (*US National Library of Medicine*, <http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), et OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>), avec utilisation d'une liste de mots-clés (*limb development, AER, ZPA, signaling pathway...*), ainsi que de nombreux termes cliniques (*polydactyly, brachydactyly,...*).

Outre les gènes étudiés précédemment au laboratoire en pratique hospitalière, par séquençage Sanger et/ou MLPA et/ou qPCR (*BHLHA9, BTRC, GDF5, HOXA13, HOXD13, IHH, LMX1B, NOG, PITX1, PTHLH, RBM8A, ROR2, SALL1, SALL4, SF3B4, TBX3, TBX4, TBX5, TP63* et la *ZRS*), nous souhaitons identifier les gènes « candidats » soit non encore connus en pathologie humaine, soit non décrits en cas de malformations des membres, mais impliqués dans une voie de signalisation connue au cours du développement des bourgeons de membre, soit impliqués dans un modèle animal comportant des malformations des membres, soit dont le territoire d'expression concernait les bourgeons de membre. La liste de ces gènes ainsi que les arguments nous ayant amenés à les sélectionner est en annexe 1 (page 171).

Les gènes sélectionnés ont été identifiés par leur séquence de référence selon la nomenclature internationale HGVS (*Human Genome Variation Society*). Les séquences de

référence des cibles ou leurs coordonnées chromosomiques (Hg19) ont été saisies dans le logiciel SureDesign (<https://earray.chem.agilent.com/suredesign/home.htm>) afin de définir les sondes. Celles-ci ont été choisies de façon à obtenir des fragments cibles de 150 paires de bases (pb) permettant ainsi le séquençage des exons entiers et de leurs parties introniques flanquantes.

Au total, dans un premier temps, 2 panels comportant chacun plus de 100 gènes ont été élaborés et sont nommés comme suit :

- Panel Haloplex 125, utilisant la technologie Haloplex (Illumina) pour la préparation de la librairie (PCR-amplicon) ; Ce panel comporte 122 gènes codant des protéines (facteurs de transcription, facteurs de croissance...), 2 régions régulatrices (*BS1*, *ZRS*) ainsi qu'un miRNA (*MIR17HG*). Au total, 97 cibles sont associées à une pathologie malformative humaine (OMIM) et 28 n'ont été décrites que dans des modèles animaux. A partir de ce panel, 15 134 sondes de capture ont été élaborées permettant ainsi le séquençage de 670 065 pb.
- Panel SureSelect +300, utilisant la technologie SureSelect QXT (Agilent, capture). Ce panel comporte 365 cibles. Il reprend la quasi intégralité des cibles du panel 125 (n=102). Parmi les 243 cibles supplémentaires, 202 ont une référence OMIM, 8 sont rapportées comme impliquées dans des déséquilibres génomiques associés à des malformations des extrémités et 13 sont décrites dans des modèles animaux. Ont également été ajoutés, 20 gènes présents dans les cascades signalétiques du développement des membres mais dont le rôle n'était pas encore clairement défini. A partir de ce panel, 53 849 sondes de capture ont été élaborées permettant ainsi le séquençage de 1 833 000 pb.

Dans le cadre de l'objectif de recherche translationnelle ayant pour but d'améliorer le diagnostic moléculaire des malformations des membres, nous avons déduit des résultats obtenus avec ces deux panels, un panel de gènes « SureSelect + 50 », utilisant la technologie SureSelect QXT, comprenant de 48 à 63 gènes sélectionnés pour leur pertinence diagnostique.

Préparation des bibliothèques et séquençage haut débit

Lorsqu'un prélèvement sanguin était disponible, l'ADN génomique a été extrait à partir de 300 µl de sang total grâce au kit B1K (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) sur le robot Chemagic Star (Perkin Elmer – Hamilton, Reno, Nevada, USA) selon les recommandations du fournisseur. Cependant, dans la majorité des cas, seul de l'ADN déjà extrait par un laboratoire extérieur était disponible.

Les ADNs extraits ont été dosés par spectrophotométrie grâce au kit « Quant-iT PicoGreen» (Life technologies) selon le protocole du fournisseur, sur un spectrophotomètre Safas (Safas, Monaco) et normalisés à une concentration de 5ng/µL dans de l'eau stérile. La capture des régions cibles a été réalisée avec les réactifs du kit Haloplex (Agilent) ou SureSelect QXT (Agilent). Les manipulations ont été réalisées selon les recommandations du fournisseur, de façon automatisée sur robot Bravo *automated liquid handling platform* (Agilent).

Les ADNs des patients ont ensuite été combinés pour former la bibliothèque et l'ensemble a été de nouveau dosé avec le kit High sensitivity DNA Analysis (Agilent) sur le Bioanalyzer (Agilent). La bibliothèque a été normalisée à une dilution finale de 6 pM.

Le séquençage des bibliothèques Haloplex 125 et SureSelect +50 a été réalisé en 2 x 150-bp *paired-end* sur le séquenceur MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) selon les recommandations du fournisseur. Nous avons utilisé la puce *standard flowcell* (Illumina) pour le séquençage de 4 Gb, avec le kit Miseq V2 reagent (Illumina). Tandis que les bibliothèques SureSelect +300 ont été séquencées sur le NextSeq 550 (Illumina) sur des *flowcell* MidOutput pour un séquençage de 62Gb.

Analyse bioinformatique

Les données brutes de séquençage ont été converties en fichiers « fastq » pour être ensuite alignées sur le génome de référence humain (version hg19, *Genome Reference Consortium* GRCh37) avec l'aligneur *Burrows-Wheeler* (BWA, dernière version au moment de l'analyse). Le traitement post-alignement des données (tri, recalibration des scores de qualité des bases, réalignement autour des insertions/délétions et données de couverture et profondeur) a été réalisé à l'aide de Picard Tools (dernière version au moment de l'analyse) et *Genome Analysis Tool Kit* (GATK, dernière version au moment de l'analyse). L'appel des variants a été réalisé au moyen de l'outil HaplotypeCaller de GATK, permettant l'obtention

des fichiers « vcf ». Ces fichiers ont ensuite été importés dans le logiciel DVD (Bioinformatique, CHU-Lille), qui annote et permet la visualisation des variants de séquence, patient par patient. Des filtres ont été mis en place afin d'éliminer les variants localisés dans les régions très introniques (au-delà de +/-25pb), synonymes, dont la fréquence allélique dans la population humaine est élevée (à partir des bases de données 1000 Genomes (<http://www.1000genome.org>), NHLBI *Exome Sequencing Project* (ESP, <http://evs.washington.edu>) ou dbSNP (Build 137, NCBI)) ou présents chez des témoins. Les séquences des variants sélectionnés ont ensuite été inspectées visuellement (fichier BAM) grâce au logiciel Alamut (Version 2.5.0 ; alamut.interactive-biosoftware.com) ou IGV (*Integrative Genomics Viewer*). La technologie du panel SureSelect QXT permet en plus l'analyse des CNVs. Pour cela, une suite bioinformatique a été développée utilisant deux outils : CNVkit et Canoe.

La pertinence des variants candidats a été évaluée en fonction :

- De l'implication possible du gène dans la pathologie présentée par le patient déterminée lors d'une discussion clinico-biologique reposant sur les bases de données Pubmed, OMIM, et sur une recherche bibliographique : mode de transmission apparent (ou possible) de la pathologie en comparaison du statut homozygote ou hétérozygote du variant, territoire d'expression du gène, pathologie humaine déjà connue en lien avec les mutations du gène, modèles animaux ;
- De l'absence du variant dans les bases de données en population générale « Exac Browser » (<http://exac.broadinstitute.org>), GnomAD Exome et Genome ([Varsome, https://varsome.com/](https://varsome.com/)) ;
- De la pathogénicité du variant prédite par les logiciels Mutation Taster, Polyphen-2 et SIFT ;
- De son score CADD (*Combined Annotation Dependent Depletion*) permettant d'évaluer l'effet délétère du variant sur la protéine, uniquement pour les faux sens ;
- Des critères ACMG;
- De l'étude de la ségrégation familiale, lorsque les prélèvements étaient disponibles.

Validation des variants de séquence et des variants en nombre de copies

Les variations de séquence identifiées en NGS et ayant passé les différents filtres ont été vérifiées par séquençage Sanger. Les variations de nombre de copies géniques ont, quant à elles, été validées par PCR quantitative ou MPLA (MRC-Holland). Les amorces, sens et anti-

sens, utilisées pour la validation ont été choisies grâce au logiciel Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).

Concernant les SNVs, après PCR, les produits amplifiés ont été purifiés avec le kit Exosap-iT (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) selon les recommandations du fournisseur et séquencés sur le séquenceur ABI Prism 3130XL Genetic Analyser (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Les résultats de séquençage ont été analysés par le logiciel SeqScape v3.0 (Life technologies) en comparaison avec la séquence de référence.

Concernant les CNVs, les PCR quantitatives ont été réalisées *via* le kit PowerSybergreen (Thermofischer Scientific) selon les recommandations du fournisseur et analysées sur l'appareil QantStudio 7 (Thermofischer). La quantification des cibles a été normalisée sur un gène de référence, *RPPH1*. Le nombre de copies relatif a été déterminé par la méthode de calcul des DeltaDelta de Ct en utilisant un échantillon contrôle normal comme référence.

2.iii- Etude des variations du nombre de copies géniques et des remaniements par puce CGH enrichie

Une puce ADN 400Kb à façon, enrichie au niveau des gènes et éléments régulateurs d'intérêts impliqués dans les ectrodactylies, a été créée grâce à une revue approfondie de la littérature (Tableau 1). Neuf gènes et trois régions intergéniques ont été sélectionnés, ainsi que 50 miRNAs dont un site de fixation est localisé sur l'un des gènes ou éléments régulateurs impliqués dans ce phénotype. Ces 50 miRNAs ont été identifiés grâce à la base de données TargetScanHuman miRNA (http://www.targetscan.org/vert_72/) disponible sur UCSC.

Au total, 33 317 sondes couvrent nos zones d'intérêt avec un espacement moyen des sondes de 95pb. Les 371 809 restantes sur les 400 000 disponibles, dont 15 000 sondes contrôles, sont réparties uniformément sur le génome.

L'expérience s'est déroulée selon les recommandations du fournisseur *via* le kit de marquage CGH labelling Kit – Enzo (Life). Les résultats ont été interprétés *via* le logiciel CytoGenomics (Agilent). Deux filtres de résolution différente ont été utilisés : le premier impose que 10 sondes successives présentent l'évènement (duplication ou délétion) dont le *log ratio* doit être inférieur à - 0,62 en cas de délétion et supérieur à 0,43 en cas de duplication, le second n'impose que 3 sondes successives.

Tableau 1 : Liste des cibles et de leurs coordonnées génomiques incluses dans le design à façon de la CGH enrichie « ectrodactylie ».

Zone d'intérêt	Chr (hg19)	Start	Stop	Syndrome (OMIM)/ (bibliographies)
TP63	3	189344000	189622000	ADULT syndrome (OMIM#103285), Ectrodactyly ectodermal dysplasia and cleft lip/palate syndrome 3 (OMIM#604292), Hay-Wells syndrome (OMIM#106260), Limb-mammary syndrome (OMIM#603543), Orofacial cleft 8 (OMIM#618149), Rapp-hodgkin syndrome (129400), Split-and/foot malformation 4 (OMIM#605289)
HAND2	4	174442000	174453000	(Russell et al. 1998; Charité et al. 2001; Tamura, Amano, et Shiroishi 2014)
SNX3	6	108528000	108585000	(Vervoort et al. 2002; Viljoen et Smart 1993; Niedrist, Lurie, et Schinzel 2009; Hudson et al. 2014)
7q21	7	95396000	96659000	Pieds et mains fendus avec surdité (OMIM#220600)
FGFR1	8	38263000	38327500	Syndrome de Harsfield (OMIM#315465), Hypogonadisme hypogonadotrope (OMIM#147950), Syndrome de Jackson-Weiss (OMIM#123150), Syndrome de Pfeiffer (OMIM#101600)
dup10q	10	103108000	103540000	Split-hand/foot malformation 3, duplication 10q (OMIM#246560)
CDH3	16	68673000	68735000	Syndrome Ectodermal dysplasia - ectrodactyly - macular (OMIM#225280)
BHLHA9	17	1168000	1176000	Split-hand/foot malformation with long bone deficiency 3 (OMIM#612576)
RASAL3	19	15528000	15665000	Translocation 4-19 interrompant le gène RASAL3 chez un patient atteint d'ectrodactylie (identifiée au laboratoire)
PORCN	x	48363000	48381000	Focal dermal hypoplasia (OMIM#305600)
FGF13	x	137709000	138289000	Syndrome de Kallman (OMIM#147950)
50 miRNAs dont un site de fixation est localisé sur l'une de ces 11 cibles d'intérêts (TargetScanHuman miRNA)				
mir15, mir25, mir32, mir195, mir326, mir330, mir363, mir367, mir424, mir497, mir506, mir103-1, mir103-2, mir106a, mir106b, mir10a, mir10b, mir124-1, mir124-2, mir124-3, mir125a, mir125b-1, mir125b-2, mir130a, mir130b, mir135a1, mir135a2, mir135b, mir15b, mir16_1, mir16_2, mir19a, mir19b1, mir19b2, mir301a, mir301b, mir302a, mir302b, mir302c, mir302d, mir302f, mir376a1, mir376a2, mir376b, mir376c, mir92a1, mir92a2, mir92b, mir24-1, mir24-2				

2.iv- Séquençage d'Exome Complet (WES)

Dix-huit familles ont pu bénéficier d'un séquençage d'exome complet. Celui-ci a été réalisé par la plateforme de séquençage haut débit IntegraGen. Les librairies ont été préparées avec le kit NEB Ultra (New England Biology). Le kit de capture utilisé était le kit Agilent SureSelect *Clinical Research Exome*. Le séquençage a été réalisé sur un HiSeq4000 d'Illumina. L'alignement des séquences et l'annotation des variants ont été réalisés *via* les logiciels ERIS et SIRIUS mis à disposition par Integragen. En 2019, grâce à notre équipe de bioinformatique, une réanalyse avec le logiciel Dragen a été effectuée incluant les mises à jour des bases de données utilisées pour l'interprétation. Différents filtres ont été appliqués grâce au logiciel FilterAll (Bioinformatique, CHU-Lille) afin de faciliter la sélection des variants. Ainsi, ont pu être éliminés les variants introniques, synonymes, les variants présents avec une fréquence allélique importante dans les bases de données (1000 Genomes <http://www.1000genome.org> ou NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) <http://evs.washington.edu>) et également présents dans la base interne Integragen regroupant les données de 150 exomes d'individus sains. Nous avons ensuite réalisé, selon la pertinence, une recherche de variants *de novo*, liés à l'X, autosomiques dominants, hétérozygotes composites et/ou homozygotes.

2.v- Analyses fonctionnelles

Constructions plasmidiques

Chaque plasmide a été sélectionné en fonction de l'étude à mener. La liste détaillée de ces plasmides est disponible dans le tableau 2. Tous les plasmides ont été séquencés dans leur intégralité.

Tableau 2 Catalogue des plasmides utilisés pour les études fonctionnelles.

Nommé	Plasmide	Référence	Contient	Étude
LEF1	pCMV6	Origene (n°RG208663)	cDNA <i>LEF1</i> WT (NM_016269), tag GFP	Western blot, dosage dual luciferase
	pEGFP-C2 (Don équipe allemande)			
βCat	pcDNA3.1	Addgene (n°16828)	cDNA bêta caténine WT	Dosage dual luciferase
promSALL4	pLightSwitch	Switchgear Genomics (n°S712151)	Promoteur minimal <i>SALL4</i> WT, gène rapporteur Renilla Luciferase	Dosage dual luciferase
promTBX5	pLightSwitch	SwitchGear Genomics	Promoteur <i>TBX5</i> WT	Dosage dual luciferase
PCAS2	don		Promoteur minimal, exon 1 et 2 de la serpine	Épissage <i>ex vivo</i>
PGL3_Fir	pGL3	Promega (n°E1761)	Promoteur minimal SV40, gène rapporteur de la Firefly Luciferase	Dosage dual luciferase
PGL3_Ren	pRL-TK	Addgene (n°27163)	Promoteur minimal SV40, gène rapporteur de la Renilla Luciferase	Dosage dual luciferase
HDAC4	pcDNA3	Addgene (n°30485)	cDNA <i>HDAC4</i> WT	Western blot

Mutagenèse dirigée

Les variants de signification inconnue ont été introduits dans les constructions plasmidiques pertinentes par mutagenèse dirigée à l'aide du kit *Quick Change II Site Directed Mutagenesis* (Agilent) selon les recommandations du fournisseur. Les amorces ont été sélectionnées grâce au site Primer X (<http://www.bioinformatics.org/primerx/>) (Tableau 3). Les clones comportant le plasmide muté ont été sélectionnés par PCR sur clone puis séquencés par technique Sanger. Chaque clone positif a ensuite fait l'objet d'une extraction plasmidique *via* le kit Maxiprep (Macherey Nagel) selon les recommandations du fournisseur.

Tableau 3 : Séquence des amorces créées pour la mutagenèse dirigée. (5'→3')

Gène	Variants	Amorce F	Amorce R
LEF1 (NM_016269)	c.928A>G	CTGAATGCTTTTATGTTATACGTGAAAGAAATGAG AGCGAATG	CATTCGCTCTCATTCTTTTCACGTATAACATAAAAAGCATT CAG
	c.433G>T	CAAATAAAGTGCCCGTGTGCAGCCATCCCATGC	GCATGGGATGGCTGCAACACGGGCACCTTTATTG
HDAC4 (NM_006037)	c.699C>G	GTCCTGGGAATGTAGGACGCCAAAGATG	CATCTTTGGCGTCTACATTCCCAGGAC
	c.1679T>G	CAGGAGCTGCTCTGCAGACAGCAAGCC	GGCTTGCTGTCTGCAGAGCAGCTCCTG
	c.1257dup	CACATGGTCTTAAGTGGAGCAGCCG	CGGCTGCTCCAGTTAAGACCATGTG
	c.2399insC	GTGGTCCGCCCCCTGGACACCATGCG	CGCATGGTGTCCAGGGGGGGCGGACCAC
	c.2565C>T	CTACAGCGACCCTAGCGTCCTGTAC	GTACAGGACGCTAGGGTCGCTGTAG
	c.942C>T	GCCACCCACCCCTTCTGGGGGCTAC	GTAGCCCCAAGAAGGGTGGGGTGGC
	c.2458G>A	CTTCAACTCCGTGGCCATGGCAGCCAAGCTTC	GAAGCTTGGCTGCCATGGCCACGGAGTTGAAG

Epissage *ex-vivo*

Les tests d'épissage *ex-vivo* ont été réalisés par la technique du « mini-gène », où la séquence d'intérêt est clonée dans le vecteur pCAS comme décrit précédemment dans les études du cancer (Gaildrat et al. 2010) (Figure 24).

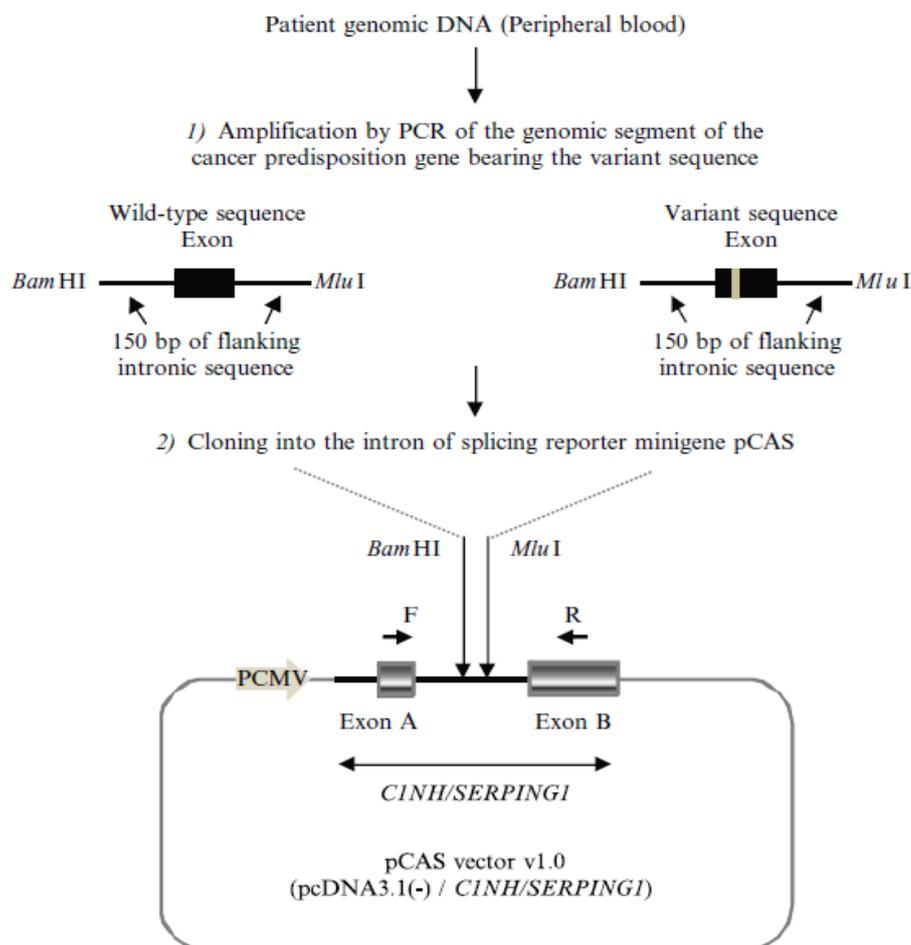


Figure 24 : Schématisation du minigène PCAS permettant la réalisation de test d'épissage *ex vivo*. (Gaildrat, 2010)

Une PCR est réalisée *via* le kit TaqGold (Thermofischer), selon les recommandations du fournisseur, sur l'ADN du patient porteur du variant d'épissage d'intérêt. Les amorces spécifiques sont conçues de part et d'autre de l'exon à étudier afin de contenir les sites d'épissage grâce au site Primer Blast. Elles sont complétées en 5' du site de restriction aux enzymes BamH1 (amorce sens) et Mlu1 (antisens) pour permettre la digestion des amplicons par ces dernières (Tableau 4). Le produit de PCR, après vérification qualitative sur gel d'agarose 2%, est ensuite purifié grâce au kit *Nucleospin Gel and PCR clean-up* (Macherey Nagel). Les fragments et le plasmide (pCAS) sont digérés par les enzymes BamH1 et Mlu1 (*New England Biolabs*) selon les recommandations du fournisseur. Le plasmide ainsi ouvert est ensuite déphosphorylé via le kit *Rapid DNA dephospho and ligation* (Roche). Puis, les amplicons purifiés et digérés sont ligués au plasmide ouvert déphosphorylé grâce à ce même kit. Les produits de ligation sont transformés par choc thermique à 42°C durant 45 secondes dans des bactéries compétentes XL1 Blue (Agilent). Les plasmides ayant correctement

intégré l'insert sont sélectionnés par PCR-séquence sur clones. Enfin, les plasmides contenant le variant sont extraits avec le kit Maxiprep (Macherey Nagel) et dosés au Nanodrop.

L'étude des transcrits est réalisée après transfection des constructions dans des cellules HeLa. Après 48h de transfection, les cellules sont lavées deux fois au PBS puis trypsinées afin d'obtenir un culot cellulaire. Ce culot est ensuite lavé au PBS 1X avant l'extraction d'ARN suivant le protocole du kit nucleospin RNA II (Macherey Nagel). L'ARN est alors dosé en vue de réaliser une *reverse transcription* grâce au kit SuperScript VILO (Invitrogen). Le cDNA est amplifié grâce aux amorces situées dans les exons de la serpine G1 du minigène à l'aide du kit AmpliTaqGold (Applied Biosystem). Enfin, les produits amplifiés ont été purifiés et séquencés comme expliqué précédemment.

Tableau 4 : Séquence des amorces dessinées pour la création du plasmide d'épissage *ex-vivo*.

Gène	Séquence de référence	Exon	Amorce sens (5'-3')	Amorce antisens (5'-3')
<i>HDAC4</i>	NM_006037	4	AGTTTGTGGGCAAGAGGGG	CACTCAGCACCGTCCTC

Transfections transitoires

Toutes les transfections ont été réalisées avec le kit Effecten de Qiagen. Les différentes mises au point selon les tests fonctionnels réalisés et types cellulaires utilisés sont répertoriées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Détails des conditions de transfection cellulaire utilisées selon les tests fonctionnels réalisés.

Etude	Lignée cellulaire	Plaque	Incubation	Plasmide	Quantité plasmide	Vol. Enhancer (μL)	Vol. Effecten reagent (μL)
Western Blot	HEK293T	6 puits	48h	<i>LEF1</i> WT/mut	1 μg	8	25
				Ou <i>HDAC4</i> WT/mut			
Dual luciférase	HEK293T	48 puits	48h	<i>LEF1</i> wt/mut	100ng	1,2	4
				βcat	100ng		
				+/. prom <i>SALL4</i> ou prom <i>TBX5</i> ou enh_ <i>TBX5</i>	100ng		
				+/. PGL3	30ng		
Épissage ex vivo	Hela	12 puits	48h	PCAS2 +/. insert	1μg	2,4	6

Western Blot

Les protéines totales des lignées cellulaires ont été extraites *via* un tampon de lyse contenant des inhibiteurs de protéases. Les fractions protéiques nucléaires et cytoplasmiques ont, quant à elles, été extraites *via* le kit *NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* (ThermoFischer). Tous les lysats protéiques ont été dosés en *triplicat* à l'aide du kit Pierce™ BCA protein Assay (ThermoFischer) sur le Mithras (plateforme Interaction moléculaire – université de Lille 2). La séparation électrophorétique des Western Blot a été réalisée avec 10 à 20µg de protéines totales sur des gels NuPAGE™ Novex™ 4-12% Bis-Tris Protein (ThermoFischer). La dilution dans 5mL de lait 5% des anticorps primaires est disponible en tableau 6. Les bandes immunoréactives ont été visualisées grâce au kit SuperSignal™ West Pico chemiluminescent substrate au LAS4000 et sur l'I-Bright de ThermoFischer. Une détection de la tubuline et de la lamine a été effectuée de la même façon. Chaque expérience a été réalisée en *triplicat*.

Tableau 6 : Liste des anticorps utilisés pour la réalisation des Western Blots et leur dilution.

Anticorps	Catalogue	Espèce	Dilution
Anti GFP	ThermoFischer MA5-15256	souris	1/250
Anti Lamin	ThermoFischer PA5-19468	lapin	1/500
Anti tubuline	Abcam ab6046	lapin	1/2000
Anti HDAC4	ThermoFischer PA5-29103	lapin	1/1000
Anti Lapin	SantaCruz SC-2357	souris	1/5000
Anti Souris	ThermoFischer A27022	lapin	1/5000

Test « Gène Rapporteur » par dosage dual luciférase

La Firefly luciférase et la Renilla luciférase ont été dosées en *triplicat* suivant les recommandations du kit Pierce™ Renilla-Luciférase Dual Assay (ThermoFischer) sur le Glomax (Promega). Les résultats du dosage de la Renilla luciférase (pLight-Switch) ont été normalisés sur l'efficacité de transfection *via* le dosage de la Firefly luciférase émise par PGL3. Puis les ratios ont été normalisés sur la condition sauvage.

3- Résultats des analyses par panels ciblés « recherche »

3.i- Cohorte rétrospective

Au total 268 patients, présentant des malformations des membres touchant les divers axes du développement ont été étudiés par panels ciblés 125 ou +300 (Tableau 7).

Tableau 7: Répartition phénotypique des patients de la cohorte rétrospective ayant bénéficié d'un séquençage par panels ciblés 125 ou +300. Les patients ayant bénéficié d'un WES ne sont pas comptabilisés dans ce tableau. (En nombre, n)

Phénotype	Cohorte Haloplex 125 (n)	%	Cohorte SS+300 (n)	%	Total	%
Anomalie radiale	75	31,0	7	26,9	82	30,6
Ectrodactylie	68	28,1	7	26,9	75	28,0
Brachydactylie	49	20,2	3	11,5	52	19,4
Anomalie réductionnelle	35	14,5	4	15,4	39	14,6
Anomalie de fusion	7	2,9	2	7,7	9	3,4
Polymalformatif	5	2,1	3	11,5	8	3,0
Hypo/aplasie rotule	3	1,2	0	0,0	3	1,1
Total	242		26		268	

3.ii- Distribution et interprétation des variants de la cohorte rétrospective

L'analyse des variants a été réalisée pour chacun des 268 patients et a permis de détecter au total 114 255 variants avec, en moyenne, 253 variants par patient concernant le panel Haloplex « 125 » et 986 variants pour le panel SureSelect « +300 ». Suite à l'application des différents filtres de sélection de variants détaillés dans le matériel et méthodes, 50 variants pour 43 patients ont été retenus. Parmi ces 50 variants, 49 sont des variants nucléotidiques (98%) et un seul est une variation en nombre de copies (2%).

Quatorze variants ont pu être classés comme pathogènes (C5, 28%), 10 comme probablement pathogènes (C4, 20%) et 26 sont de signification inconnue (C3, 52%). Ces 50 variants et leurs conséquences protéiques sont décrits dans les tableaux 8 et 9. La

répartition des gènes présentant un variant d'intérêt selon le groupe phénotypique est disponible dans le tableau 10.

Au total, 23 variants de classe 5 et 4 sur les 24 identifiés nous ont permis de porter un diagnostic moléculaire chez 21 patients, permettant ainsi d'améliorer de 7,8% le « rendement diagnostique » (21/268).

Aucun des 26 VSI identifiés n'a été rapporté dans la littérature. Dix-neuf d'entre eux sont considérés comme très fortement suspects du fait des prédictions de leur effet au niveau protéique et de l'implication du gène dans le développement des membres en concordance avec le phénotype du patient. Il s'agit, pour la plupart, de variants localisés dans des gènes déjà décrits en pathologie humaine (*BMPR1B*, *DLX5*, *DLX6*, *FGF16*, *FGFR1*, *FGFR3*, *HDAC4*, *HOXA13*, *HOXD10*, *RECQL4*, *SALL1*, *TBX3* et *WNT10B*). Trois sont localisés dans des gènes décrits en pathologie mais ne permettent d'expliquer qu'une partie du phénotype du patient (*LRP6*, *RUNX2*, *TBX22*). Enfin, quatre sont localisés dans des gènes impliqués dans les voies de signalisation mises en jeu lors du développement des membres mais non décrits jusqu'à présent en pathologie malformative chez l'Homme : *FMN1*, *FGF4*, *LEF1* et *TBX2*.

Concernant l'impact prédit de ces VSI sur la protéine :

- Vingt-trois sont des faux sens prédits délétères par divers logiciels de prédictions dont 21 présentent un CADD score supérieur à 20. Les deux variants faux sens dont le CADD score est inférieur à 20 touchent un acide aminé très conservé et sont prédits délétères par un des trois logiciels utilisés. Le premier est localisé dans le domaine tyrosine kinase du gène *FGFR3*, déjà décrit dans le cadre d'anomalies du développement chez l'Homme ; tandis que le second a été identifié dans le gène *FMN1*, gène encore non décrit en pathologie humaine mais dont le rôle dans le développement des membres semble important ;
- Trois variants provoquent de probables anomalies d'épissage tels que le changement prédit du site accepteur de l'exon 3 du gène *DLX5*, les changements prédits des sites donneurs des exons 2 du gène *FGF16* et 1 du gène *LRP6*.

Tableau 8 : Liste des patients de la cohorte rétrospective pour lesquels un diagnostic moléculaire a pu être établi. (HTZ : hétérozygote ; HMZ : homozygote ; HéM : hémizyote ; HTZ comp. : hétérozygote composite ; ND : non déterminé ; critères ACMG : PVS1 : variant nul dans un gène où ce mécanisme est décrit en pathologie, PS2 : de novo validé ; PM2 : absent des bases de données de populations générales, PM3 : variant détecté en trans d'un second variant C4/C5 dans le cadre de pathologie récessive, PM5 : autre substitution faux sens pathogène déjà décrite à la même position, PP3 : de multiples sources (conservation, évolution, prédictions...) apportent des arguments en faveur de la pathogénicité du variant ; PP5 : une source fiable a identifié ce variant comme pathogène mais les preuves ne sont pas suffisantes ; BP1 : variant faux sens localisé dans un gène dont les mutations tronquantes sont essentiellement associées à une pathologie)

Patient	Groupe Phénotypique	Gène / élément régulateur	Zygotie	Type	Changement cDNA/gDNA	Changement protéique	Classe ACMG	Critères ACMG	Score CADD pour les faux sens C3	Références (PMID#)	Prédiction (logiciels)	Conservation interspèces	Domaine protéique	Ségrégation familiale	Remarque
NGS_Halo-022	Brachydactylie	<i>BMPR1B</i>	HTZ	SNV	c.1457G>A	p.(Arg456Gln)	4	PM2 PM5 PP3 PP5	ND	16957682	Délétère (3/3)	Très conservé	/	Ségrège chez la sœur atteinte	
NGS_Halo-073	Brachydactylie	<i>BMPR1B</i>	HTZ	SNV	c.779-2A>C	p.(?)	5	PVS1 PM2 PP3	ND	Nouveau	Saut probable exon 10	/	/	ND	
NGS_300-001	Anomalie Radiale	<i>FANCA</i>	HéM	SNV	c.3391A>G	p.(Thr1131Ala)	4	PM2 PM3 PP3 PP5 BP1	26,9	Nouveau	Délétère (2/3)	Très conservé	Fanconi anaemia group A protein	Hérité père asymptote	Syndrome transmis sur un mode autosomique récessif
		<i>FANCA</i>	HéM	CNV	c.(?-276)_(428-?)del	p.(?)	5	/	ND	Nouveau	/	/	/	Hérité mère asymptote	
NGS_Halo-169	Anomalie Radiale	<i>FGF10</i>	HTZ	SNV	c.577C>T	p.(Ala193*)	5	PVS1 PM2 PP3 PP5	ND	15654336	Codon STOP prématuré	/	/	ND	
NGS_Halo-107	Ectrodactylie	<i>FGFR1</i>	HTZ	SNV	c.1445T>A	p.(Val482Glu)	4	PS2 PM1 PM2 PP3	ND	Nouveau	Délétère (3/3)	Très conservé	Tyrosine Kinase	<i>De novo</i>	
NGS_Halo-114	Brachydactylie	<i>FGFR1</i>	HTZ	SNV	c.731C>G	p.(Pro244Arg)	4	PM1 PM2 PP3 PP5	ND	7874169	Délétère (2/3)	Très conservé	Fibroblast growth Factor	ND	
NGS_Halo-154	Ectrodactylie	<i>FGFR1</i>	HTZ	SNV	c.1834C>G	p.(Arg622Gly)	4	PM1 PM2 PM5 PP3 PP5	ND	Nouveau	Délétère (3/3)	Très conservé	Tyrosine Kinase	ND	
NGS_Halo-212	Anomalie Radiale	<i>FGFR2</i>	HTZ	SNV	c.1942G>A	p.(Ala648Thr)	4	PM1 PM2 PP3 PP5	ND	16501574	Délétère (3/3)	Très conservé	Tyrosine Kinase	Hérité maternel	

NGS_Halo-106	Anomalie de Fusion	<i>GLI3</i>	HTZ	SNV	c.600delC	p.(Tyr200*)	4	PVS1 PM2	ND	Nouveau	Codon STOP prématuré	/	/	Hérité maternel	
NGS_Halo-029	Brachydactylie	<i>GNAS</i>	HTZ	SNV	c.1096G>A	p.(Ala366Thr)	4	PM1 PM2 PM5 PP3	ND	21525160	Délétère (3/3)	Très conservé	Guanine nucleotide binding protein alpha	ND	
NGS_Halo-079	Brachydactylie	<i>HDAC4</i>	HTZ	SNV	c.1257dupA	p.(Leu420Thrfs*112)	5	PVS1 PS2 PM2	ND	Nouveau	Codon STOP 112 positions en aval	/	/	<i>De novo</i>	
NGS_Halo-090	Brachydactylie	<i>HDAC4</i>	HTZ	SNV	c.699C>G	p.(Tyr233*)	5	PVS1 PM2 PP3	ND	Nouveau	Codon STOP prématuré	/	/	ND	
NGS_Halo-224	Brachydactylie	<i>HOXD13</i>	HTZ	SNV	c.917G>A	p.(Arg306Gln)	4	PM1 PM2 PM5 PP3 PP5	ND	22374128	Délétère (3/3)	Très conservé	Homeobox	ND	
NGS_Halo-219	Ectrodactylie	<i>HOXD13</i>	HMZ	SNV	c.496A>T	p.(Lys166*)	5	PVS1 PM2 PP3	ND	Nouveau	Codon STOP prématuré	/	/	Hérité mère asymptote	Les variations délétères retrouvées à l'état homozygote engendrent un phénotype plus sévère concordant avec la clinique.
		<i>HOXD13</i>	HMZ	SNV	c.496A>T	p.(Lys166*)	5	PVS1 PM2 PP3	ND	Nouveau	Codon STOP prématuré	/	/	Hérité père asymptote	
NGS_Halo-095	Ectrodactylie	<i>IRF6</i>	HTZ	SNV	c.454C>T	p.(Gln152*)	5	PVS1 PS2 PM1 PM2 PP3 PP5	ND	Nouveau	Codon STOP prématuré	/	/	<i>De novo</i>	
NGS_Halo-020	Anomalie Réductionnelle	<i>NIPBL</i>	HTZ	SNV	c.2030_2031del	p.(Arg677Thrfs*3)	4	PVS1 PM2	ND	Nouveau	Codon STOP 3 positions en aval	/	/	ND	
NGS_Halo-104	Anomalie Réductionnelle	<i>NIPBL</i>	HTZ	SNV	c.1711A>T	p.(Lys571*)	5	PVS1 PS2 PM2 PP3	ND	Nouveau	Codon STOP prématuré	/	/	<i>De novo</i>	
NGS_Halo-181	Anomalie Réductionnelle	<i>NIPBL</i>	HTZ	SNV	c.3832A>T	p.(Lys1278*)	5	PVS1 PS2 PM2 PP3	ND	Nouveau	Codon STOP prématuré	/	/	<i>De novo</i>	
NGS_Halo-032	Polymalformatif	<i>TFAP2B</i>	HTZ	SNV	c.583C>T	p.(Gln195*)	5	PVS1 PM2 PP3	ND	Nouveau	Codon STOP prématuré	/	/	Hérité maternel	

NGS_Halo-197	Ectrodactylie	<i>TP63</i>	HTZ	SNV	c.1963C>T	p.(Arg655*)	5	PVS1 PS2 PM2 PP3	ND	Nouveau	Codon STOP prématuré	/	/	<i>De novo</i>	
NGS_Halo-216	Ectrodactylie	<i>WNT10B</i>	HTZ comp.	SNV	c.817dupG	p.(Ala273Glyfs*1 4)	5	PVS1 PM2 PM3	ND	Nouveau	Codon STOP 14 positions en aval	/	/	Hérité mère asympto	Syndrome transmis sur un mode autosomique récessif
			HTZ comp.	SNV	c.746G>T	p.(Cys249Phe)	3	PM2 PM3 PP3	ND	Nouveau	Délétère (3/3)	Très conservé	Wnt	Hérité père asympto	

Tableau 9 : Liste des patients de la cohorte rétrospective présentant un variant d'intérêt mais dont le diagnostic moléculaire n'a pu être établi de façon certaine. (HTZ : hétérozygote ; HMZ : homozygote ; HÉM : hémizygote ; HTZ comp. : hétérozygote composite ; ND : non déterminé ; critères ACMG : PVS1 : variant nul dans un gène où ce mécanisme est décrit en pathologie, PS2 : de novo validé ; PM2 : absent des bases de données de populations générales, PM3 : variant détecté en trans d'un second variant C4/C5 dans le cadre de pathologie récessive, PM5 : autre substitution faux sens pathogène déjà décrite à la même position, PP3 : de multiples sources (conservation, évolution, prédictions...) apportent des arguments en faveur de la pathogénicité du variant ; PP5 : une source fiable a identifié ce variant comme pathogène mais les preuves ne sont pas suffisantes ; BP1 : variant faux sens localisé dans un gène dont les mutations tronquantes sont essentiellement associées à une pathologie, BP4 : plusieurs sources de prédictions ne suggèrent aucun impact sur la production de la protéine)

Patient	Groupe Phénotypique	Gène / élément régulateur	Zygotie	Type	Changement cDNA/gDNA	Changement protéique	Classe ACMG	Critères ACMG	Score CADD pour les faux sens C3	Références (PMID#)	Prédiction (logiciels)	Conservation interespèces	Domaine protéique	Ségrégation familiale	Remarque
NGS_Halo-015	Brachydactylie	<i>BMPR1B</i>	HMZ	SNV	c.335G>A	p.(Arg112Gln)	3	PM2 PM3 PP3	29	Nouveau	Délétère (3/3)	Très conservé	/		Phénotype plus sévère en présence de variant pathogène homozygote
NGS_Halo-059	Ectrodactylie	<i>DLX5</i>	HTZ	SNV	c.541-3C>G	p.(?)	3	PM2 BP4	ND	Nouveau	Changement prédit au site accepteur 3pb en aval fortement probable (-99,5%)	/	/	Hérité mère asymptote	Pénétrance incomplète décrite (Robledo, 2002)
NGS_Halo-228	Ectrodactylie	<i>DLX5</i>	HTZ	SNV	c.421A>G	p.(Arg141Gly)	3	PM2 PP3	27,6	Nouveau	Délétère (3/3)	Très conservé	Homeobox	Hérité père asymptote	Pénétrance incomplète décrite (Robledo, 2002)
NGS_Halo-061	Ectrodactylie	<i>DLX6</i>	HTZ	SNV	c.170C>T	p.(Ser57Leu)	3	PM2 PP3	23,8	Nouveau	Délétère (2/3)	Faiblement	/	ND	

NGS_Halo-053	Anomalie de Fusion	<i>FGF16</i>	HTZ	SNV	c.378G>A	p.(?)	3	PM2	ND	Nouveau	Changement prédit au site donneur 1 pb en aval probable (-23%)	/	/	ND	
NGS_Halo-117	Brachydactylie	<i>FGF4</i>	HTZ	SNV	c.598A>T	p.(Thr200Ser)	3	PM2 PP3	24,5	Nouveau	Délétère (2/3)	Très conservé	Fibroblast Growth Factor	ND	
NGS_Halo-075	Ectrodactylie	<i>FGFR1</i>	HTZ	SNV	c.1900C>A	p.(Leu644Ile)	3	PM1 PM2 PP3	25,8	Nouveau	Délétère (2/3)	Très conservé	Tyrosine Kinase	ND	
NGS_Halo-112	Ectrodactylie	<i>FGFR1</i>	HTZ	SNV	c.437A>G	p.(Tyr146Cys)	3	PM1 PM2	27,5	Nouveau	Délétère (2/3)	Très conservé	Fibroblast Growth Factor	ND	
NGS_Halo-238	Anomalie Radiale	<i>FGFR3</i>	HTZ	SNV	c.1504C>T	p.(Pro502Ser)	3	PM1 PM2 PP3	19,47	Nouveau	Délétère (1/3)	Très conservé	Tyrosine Kinase	ND	
NGS_Halo-118	Anomalie Réductionnelle	<i>FMN1</i>	HTZ	SNV	c.889G>A	p.(Glu297Lys)	3	PM2 BP1 BP4	16	Nouveau	Délétère (1/3)	Très conservé	/	ND	
NGS_Halo-045	Anomalie Radiale	<i>HDAC4</i>	HTZ	SNV	c.1763T>G	p.(Leu588Arg)	3	PM2 PP3	25,8	Nouveau	Délétère (3/3)	Très conservé	Histone deacetylase	Hérité maternel sympto	
NGS_Halo-091	Brachydactylie	<i>HOXA13</i>	HTZ	SNV	c.610G>A	p.(Ala204Thr)	3	PM2 BP4	22,9	Nouveau	Délétère (2/3)	Moyennement	Hox	Hérité maternel sympto	
NGS_Halo-082	Ectrodactylie	<i>HOXD10</i>	HTZ	SNV	c.646G>A	p.(Val216Met)	3	PM2 PP3	23,1	Nouveau	Délétère (1/3)	Très conservé	/	ND	
NGS_Halo-050	Anomalie Radiale	<i>LEF1</i>	HTZ	SNV	c.928A>G	p.(Met310Val)	3	PM2 PP1 PP3	25,9	Nouveau	Délétère (3/3)	Très conservé	High Mobility Group	Hérité paternel sympto	
NGS_Halo-151	Polymalformatif	<i>LRP6</i>	HTZ	SNV	c.55G>A	p.(?)	3	PM2 PP3	ND	Nouveau	Changement prédit au site donneur 1 pb en aval (-99,6%)	/	/	Hérité maternel sympto	Saut d'exon 1 confirmé par étude de transcrit sur prélèvement du patient

NGS_Halo-066	Anomalie Radiale	<i>RECQL4</i>	HTZ	SNV	c.1705-1G>A	p.(?)	5	PVS1 PM2 PP3	ND	17372760	Saut exon 11 très probable, changement site accepteur 1pb en aval (-100%)	/	/	ND	Syndrome transmis sur un mode autosomique récessif : seconde anomalie en trans non identifiée
NGS_Halo-230	Anomalie Radiale	<i>RECQL4</i>	HMZ	SNV	c.1595C>T	p.(Pro532Leu)	3	PM2 PM3 PP3 BP1	23,9	Nouveau	Délétère (1/3)	Très conservé	DNA helicase	Hérité mère asymptote	
		<i>RECQL4</i>	HMZ	SNV	c.1595C>T	p.(Pro532Leu)	3	PM2 PM3 PP3 BP1	23,9	Nouveau	Délétère (1/3)	Très conservé	DNA helicase	Hérité père asymptote	
NGS_Halo-166	Brachydactylie	<i>RUNX2</i>	HTZ	SNV	c.58G>T	p.(Asp20Tyr)	3	PM2 PP3	34	Nouveau	Délétère (2/3)	Très conservé	Transcription Factor RUNX	ND	
NGS_Halo-116	Anomalie Radiale	<i>SALL1</i>	HTZ	SNV	c.3496A>G	p.(Ile1166Val)	3	PM2 BP1	23,4	Nouveau	Délétère (1/3)	Très conservé	Zinc finger	ND	
NGS_Halo-025	Anomalie Radiale	<i>TBX2</i>	HTZ	SNV	c.430G>A	p.(Gly144Ser)	3	PM2 PP3	33	Nouveau	Délétère (1/3)	Très conservé	Tbox	ND	
NGS_Halo-182	Anomalie Radiale	<i>TBX22</i>	HTZ	SNV	c.505C>G	p.(His169Asp)	3	PM1 PM2 PP3	21,3	Nouveau	Délétère (3/3)	Très conservé	Tbox	Lié à l'X	
NGS_Halo-061	Ectrodactylie	<i>TBX3</i>	HTZ	SNV	c.1297C>A	p.(Pro413Thr)	3	PM2 PP3	22,9	Nouveau	Délétère (3/3)	Très conservé	/	ND	
NGS_Halo-019	Ectrodactylie	<i>WNT10B</i>	HMZ	SNV	c.949T>A	p.(Phe317Ile)	3	PM2 PM3 PP3	28,4	Nouveau	Délétère (3/3)	Très conservé	Wnt	Hérité mère asymptote	
		<i>WNT10B</i>	HMZ	SNV	c.949T>A	p.(Phe317Ile)	3	PM2 PM3 PP3	28,4	Nouveau	Délétère (3/3)	Très conservé	Wnt	Hérité père asymptote	

Tableau 10 : Rendement diagnostique selon le groupe phénotypique de la cohorte rétrospective. (NB : nombre de patients)

Phenotype	Patients (Nb)	%	Patient avec un diagnostique moléculaire (Nb)	Rendement diagnostique (%)	Gènes impliqués (Nb patients)	Patient sans diagnostique moléculaire mais présentant un variant d'intérêt (Nb)	%	Gènes impliqués (Nb patients)
Anomalie Radiale	82	30,6	3	3,7	<i>FANCA (1), FGF10 (1), FGFR2 (1)</i>	8	9,8	<i>FGFR3 (1), HDAC4 (1), LEF1 (1), RECQL4 (2), SALL1 (1), TBX2 (1), TBX22 (1)</i>
Ectrodactylie	75	28,0	6	8,0	<i>FGFR1 (2), HOXD13 (1), IRF6 (1), TP63 (1), WNT10B (1)</i>	8	10,7	<i>DLX5 (2), DLX6 (1), FGFR1 (2), HOXD10 (1), TBX3 (1), WNT10B (1)</i>
Brachydactylie	52	19,4	7	13,5	<i>BMPR1B (2), FGFR1 (1), GNAS (1), HDAC4 (2), HOXD13 (1)</i>	4	7,7	<i>BMPR1B (1), FGF4 (1), HOXA13 (1), RUNX2 (1)</i>
Anomalie Réductionnelle	39	14,6	3	7,7	<i>NIPBL (3)</i>	1	2,6	<i>FMN1 (1)</i>
Anomalie de Fusion	9	3,4	1	11,1	<i>GLI3 (1)</i>	1	11,1	<i>FGF16 (1)</i>
Hypoplasie Patellaire	3	1,1	0	0,0		0	0,0	
Polymalformatif	8	3,0	1	12,5	<i>TFAP2B (1)</i>	1	12,5	<i>LRP6 (1)</i>
Total	268		21	7,8		23	8,6	

Au total, ces deux panels « recherche » nous ont permis :

- 1) Soit d'identifier une anomalie dans un gène déjà connu en pathologie humaine, permettant d'aboutir au diagnostic moléculaire expliquant l'ensemble du phénotype du patient ;
- 2) Soit d'identifier une anomalie permettant de suspecter un diagnostic sans pouvoir le confirmer (VSI ou variant hétérozygote dans un gène connu pour être responsable de pathologies autosomiques récessives) ;
- 3) Soit de rattacher l'anomalie à une variation d'un gène qui n'était connu en pathologie humaine que par son implication dans un syndrome microdélétionnel ;
- 4) Soit d'identifier un « nouveau gène ».

Les résultats obtenus en 1) et 2) nous ont permis de répondre à notre objectif translationnel (définition d'un « panel de diagnostic en routine des malformations des membres »). Les résultats obtenus en 3) et 4) ont participé à nos projets plus fondamentaux qui seront repris en détail dans le chapitre 7.

- **Identifications de variants délétères permettant d'aboutir au diagnostic moléculaire expliquant l'ensemble du phénotype du patient**

- Syndrome LADD et mutations de *FGF10* et *FGFR2*

Nous avons pu poser le diagnostic de syndrome LADD chez deux patientes adressées initialement pour analyse des gènes *TBX5* et *SALL4*.

La première patiente, NGS_Halo-169, présente des pouces triphalangés en abduction associés à une communication inter auriculaire. L'analyse NGS a permis de mettre en évidence un variant présent à l'état hétérozygote dans le gène *FGF10* engendrant l'apparition d'un codon stop prématuré (c.577C>T p.(Ala193*)). Les critères ACMG classent ce variant comme pathogène. Malheureusement, nous n'avons pas pu réaliser de ségrégation familiale en l'absence des prélèvements parentaux.

La seconde patiente, NGS_Halo-212, est née avec une hypoplasie bilatérale des pouces et une dysplasie des pavillons des oreilles. Nous avons identifié chez elle un variant présent à l'état hétérozygote dans le gène *FGFR2* (c.1942G>A), responsable de l'apparition d'un faux sens (p.(Ala648Thr)) au sein du domaine Tyrosine kinase de la protéine FGFR2. Ce variant touche un acide aminé très conservé et est absent des bases de données en population générale. Les trois logiciels de prédiction utilisés classent ce variant comme

délétère (SIFT, Polyphen2, MutationTaster). Ce variant est hérité de la mère asymptomatique, mais la grande variabilité d'expression connue dans le syndrome LADD pourrait expliquer cet apparent défaut de pénétrance chez la maman.

- Mutation de *TP63* en cas de SHFM isolée

Chez le patient NGS_Halo-197, atteint de SHFM strictement isolés (Figure 25), nous avons identifié un variant *de novo* de *TP63* (c.1963C>T) engendrant l'apparition d'un codon stop prématuré (p.(Arg655*)). *TP63* étant majoritairement impliqué dans les ectrodactylies syndromiques, ce patient n'avait bénéficié que de l'analyse des duplications de *BHLHA9* et dup10q24.32.



Figure 25: Radiographies et photographies des 4 extrémités du patient NGS_Halo-197 porteur de pieds et mains fendus isolés.

- Mutations de *FGFR1*

- *FGFR1* et SHFM

Nous avons identifié deux variants de classe 4 (c.1445T>A p.(Val482Glu) ; c.1834C>G p.(Arg622Gly)) ainsi que deux variants de classe 3 (c.1900C>A p.(Leu644Ile) ; c.437A>G p.(Tyr146Cys)) chez quatre patients atteints d'ectrodactylie. Tous sont des variants faux sens prédits délétères par au moins deux des trois logiciels de prédiction utilisés, retrouvés à l'état hétérozygote. Ils touchent des acides aminés conservés et sont localisés dans des domaines fonctionnels importants (Tyrosine kinase pour les trois premiers, FGF pour le quatrième). Leurs scores CADD sont supérieurs à 20 (respectivement 32 ; 26,9 ; 25,8 et 27,5). Aucun n'a été décrit dans la littérature et tous sont absents des bases de données en population générale. *FGFR1* est principalement associé aux syndromes syndrome d'Hartsfield et de Pfeiffer, et n'a été rapporté dans le cadre des ectrodactylies que très récemment (Simonis et al. 2013 ; Villanueva et al. 2015 ; Ohtaka et al. 2017). Il n'était donc pas analysé en première intention au laboratoire chez des patients ne présentant pas un phénotype compatible avec les syndromes d'Hartsfield ou de Pfeiffer. Or, face à ce résultat, il nous semble primordial désormais d'inclure l'analyse de ce gène chez des patients atteints de SHFM.

- *FGFR1* et aspect de symphalangisme

Un variant de *FGFR1*, c.731G>G, a été identifié à l'état hétérozygote, chez le patient NGS_Halo-114, qui présente un symphalangisme familial et une craniosténose (Figure 26). Il engendre l'apparition d'un faux sens (p.(Pro244Arg)) prédit délétère par 2 des logiciels utilisés (MutationTaster, Polyphen2). Son score CADD est supérieur à 20 (31). Il est de plus localisé dans le domaine tyrosine kinase de *FGFR1*. Ce variant avait déjà été décrit dans la littérature comme associée au syndrome de Pfeiffer (Muenke et al. 1994). Après un retour minutieux sur le dossier clinique du patient, ce variant classé comme probablement pathogène, nous paraît responsable de son phénotype.



Figure 26 : Radiographies des mains et des pieds du patient NGS_Halo-114 porteur d'un symphalangisme familial.

- Mutations de *WNT10B*

Nos analyses NGS nous ont permis d'identifier quatre variants dans le gène *WNT10B* chez deux patients (figure 27).

Le premier, NGS_Halo-216 présente un tableau SHFM des quatre membres. Il est porteur de deux variants à l'état hétérozygote composite : l'un de classe 5 (c.817dupG, p.(Ala273Glyfs*14)) responsable d'un décalage du cadre de lecture engendrant l'apparition d'un codon stop 14 positions en aval ; le second de classe 3 (c.746G>T, p.(Cys249Phe)) localisé dans le domaine Wnt de la protéine, responsable de l'apparition d'un faux sens prédit délétère par les 3 logiciels de prédiction utilisés (SIFT, Polyphen2, Mutationtaster) et dont le score CADD est supérieur à 20 (29,1). Il touche un acide aminé très conservé et est absent des bases de données en population générale.

Le second patient, NGS_Halo-019 présente une ectrodactylie des quatre extrémités. Il est porteur d'un variant faux sens (c.949T>A, p.(Phe317Ile)), retrouvé à l'état homozygote, prédit délétère par les 3 logiciels de prédiction utilisés. Il est, de plus, localisé dans le domaine Wnt de la protéine et son score CADD est supérieur à 20 (28,4). L'étude de la ségrégation a permis de mettre en évidence le variant, à l'état hétérozygote, chez le frère du *propositus* également atteint mais d'un phénotype moins sévère (atteinte distale des métatarses) et chez ses parents asymptomatiques. Ceci suggère l'existence d'une éventuelle pénétrance incomplète ou de l'intervention d'autres facteurs (Ugur et Tolun 2008 ; Brunelle et al. 2019).

WNT10B est décrit comme impliqué dans les SHFM à transmission autosomique récessive (Brunelle et al. 2019), il était donc étudié principalement en cas de consanguinité.

Or ces deux patients sont issus d'unions ne se connaissant pas de lien de parenté, *WNT10B* n'avait pas été analysé en première intention. Il semble donc intéressant de réaliser l'analyse de ce gène chez des patients atteints de SHFM. L'identification de ces variants a permis la publication de l'article « *WNT10B variants in split hand/foot malformation : report of three novel families and review of the literature* » dans le journal *American Journal of Medical Genetics* (Brunelle et al. 2019).

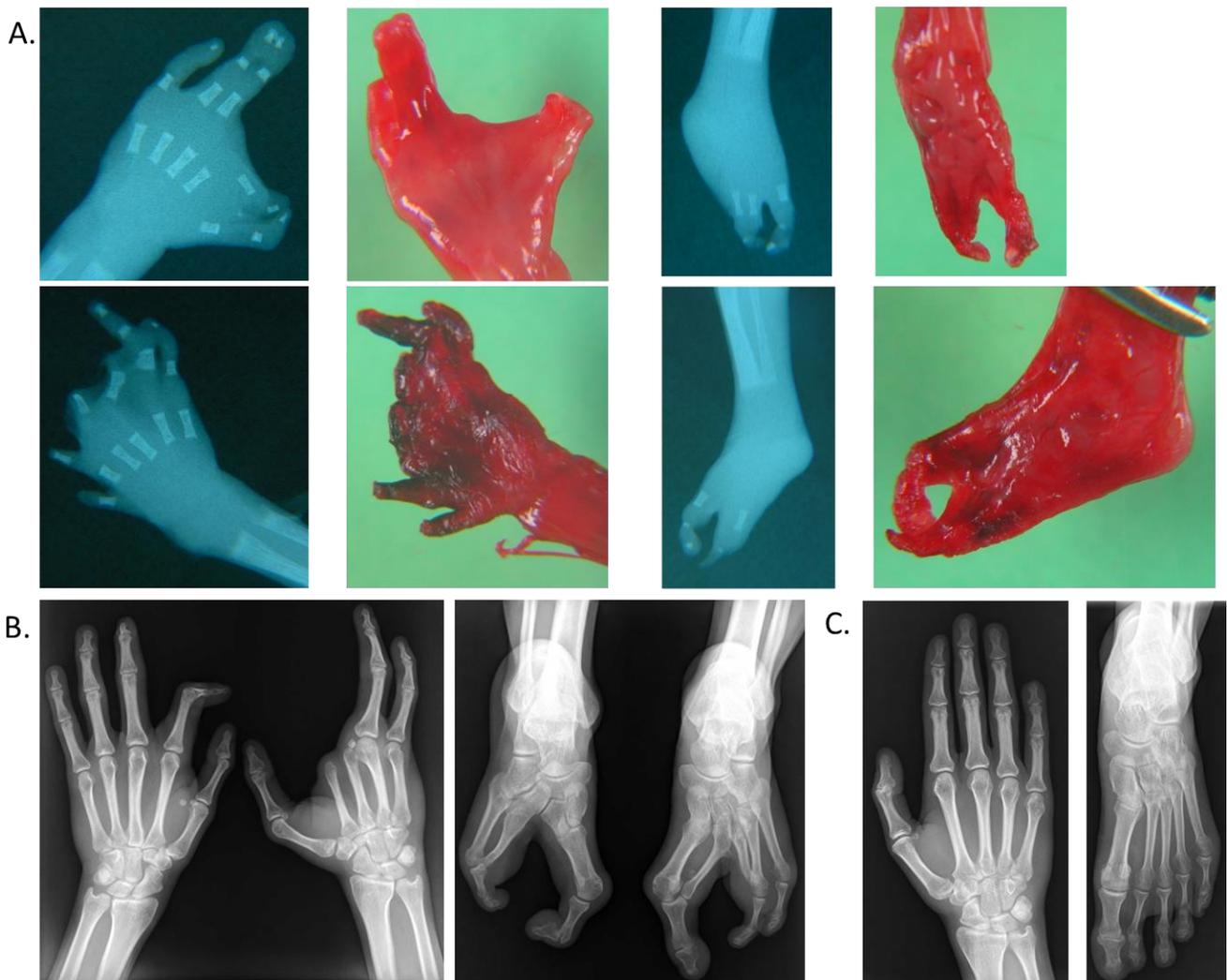


Figure 27 A. Radiographies et photographies des 4 extrémités du patient NGS_Halo-216, fœtus atteint d'ectrodactylies sévères des quatre membres. B et C. Radiographies des pieds et mains du patient NGS_Halo-019 (B) et de son frère (C).

- Mutation de *IRF6*

Un variant du gène *IRF6* a été identifié chez le patient NGS_Halo-095, présentant une polydactylie postaxiale des mains, des syndactylies mésoaxiales des quatre extrémités, une fente labiale et un ankyloblépharon. Celui-ci est porteur d'un variant de classe 5 (c.454C>T), *de novo*, retrouvé à l'état hétérozygote, responsable de l'apparition d'un codon stop 152 positions en aval (p.(Gln152*)). Le phénotype de ce patient peut être en partie rattaché à la mutation identifiée. Cependant, la polydactylie n'a jamais été décrite chez les patients porteurs de variations de *IRF6*. Il s'agit probablement d'une association fortuite.

- Mutations de *BMPR1B*

Chez 3 patients présentant des brachydactylies (NGS_Halo-022 : BDA2, 073 : brachydactylie non classable et 015 : BDC), nous avons identifié des variants prédits délétères dans le gène *BMPR1B*.

Le premier est un variant faux sens (c.1457G>A, p.(Arg456Gln)) de classe 4, retrouvé à l'état hétérozygote. Il touche un acide aminé très conservé et est absent des bases de données en population générale. Il est prédit délétère par les 3 logiciels de prédiction utilisés (MutationTaster, SIFT, Polyphen2). Son score CADD est supérieur à 20 (33). Il n'a été retrouvé dans la base GnomAD que 4 fois sur 247 878 allèles analysés. Une étude de la ségrégation a montré qu'il ségrége chez la sœur du *propositus* également atteinte. Enfin, il a déjà été décrit dans la littérature comme associé à une brachydactylie de type C/symphalangisme ou une brachydactylie A2 (Lehmann et al. 2006).

Le second est un variant intronique (c.779-2A>C) localisé au bord de l'exon 10 dont les logiciels prédisent un probable saut (MaxEnt, NNSPLICE, SSF). Ce variant n'a jamais été décrit dans les bases de données en population générale. Les critères ACMG classent ce variant comme probablement pathogène.

Le dernier variant (c.335G>A) a été retrouvé à l'état homozygote. Il est responsable de l'apparition d'un faux sens (p.(Arg112Gln)) prédit délétère par les 3 logiciels utilisés et dont le score CADD est supérieur à 20 (29). Ce variant n'a jamais été décrit dans les bases de données en population générale. Les critères ACMG classent ce variant comme de signification inconnue.

- Mutations de *GNAS*

Chez la patiente NGS_Halo-029 présentant une petite taille à début anténatal, des mains et des pieds extrêmement courts avec des épiphyses en cônes au niveau de la 2^{ème} phalange de l'index, associée à une brachymétacarpie et une brachytéléphalangie, a été identifié un variant de classe 4 dans le gène *GNAS*. Ce variant (c.1096G>A), retrouvé à l'état hétérozygote, est responsable de l'apparition d'un faux sens prédit délétère par les 3 logiciels de prédiction utilisés (MutationTaster, SIFT, Polyphen2) et dont le score CADD est supérieur à 20 (31). Il touche un acide aminé très conservé et est localisé dans le domaine *Guanine nucleotide binding protein alpha* de la protéine. Il avait déjà été décrit dans la littérature chez un patient présentant une pseudohypoparathyroïdie de type 1a avec une testotoxicose (Joseph, Shoemaker, et Germain-Lee 2011). Une autre mutation touchant le même acide aminé a également été décrite comme causale d'une ostéodystrophie héréditaire d'Albright associée à un canal carpien (Nakamoto et al. 1996).

- Mutations de *HOXD13*

Nous avons identifié des variants de classe 4 et 5 dans le gène *HOXD13* chez deux patients.

La première, NGS_Halo-224 présentant une brachydactylie A2 atypique, est porteuse d'un variant (c.917G>A) retrouvé à l'état hétérozygote. Il touche un acide aminé très conservé et engendre l'apparition d'un faux sens (p.(Arg306Gln)) prédit délétère par les 3 logiciels de prédiction utilisés (MutationTaster, SIFT, Polyphen2). Son score CADD est supérieur à 20 (33). Il touche un acide aminé très conservé et est localisé dans le domaine de liaison à l'ADN de la protéine. Ce variant de classe 4 a déjà été décrit dans la littérature au sein d'une famille présentant une syndactylie de type 1C (B. Wang et al. 2012; Dai et al. 2014).

Le second patient, NGS_Halo-219 présente une ectrodactylie atypique des quatre membres (Figure 28), mais plus sévère au niveau des membres supérieurs, dans un contexte de consanguinité. Il est porteur d'un variant (c.496A>T), retrouvé à l'état homozygote, engendrant l'apparition d'un codon stop prématuré 166 positions en aval (p.(Lys166*)).

Les variations délétères de *HOXD13* sont essentiellement responsables de la synpolydactylie de type 1. Il s'agit alors d'une expansion de poly-Alanines. Les mutations ponctuelles sont, quant à elles, associées à des brachydactylies (type D et E) ainsi qu'à des

syndactylies de type 5. Elles sont habituellement transmises sur un mode autosomique dominant, mais de rares formes autosomiques récessives ont été décrites. Dans ce cas, les parents hétérozygotes étaient peu ou asymptomatiques (Kurban et al. 2011 ; Low, Newbury-Ecob, et Newbury-Ecob 2012 ; Ibrahim et al. 2016).



Figure 28 : Photographies et radiographie des mains et pieds du patient NGS_Halo-219. Notez l'ectrodactylie atypique des quatre membres, plus sévère au niveau des membres supérieurs.

- Mutations de NIPBL

Chez 3 fœtus polymalformés (NGS_Halo-020, 104 et 181) présentant des anomalies réductionnelles sévères des membres supérieurs (Figure 29), nous avons identifié des variants tronquants, dont deux *de novo*, dans le gène *NIPBL*. Ce résultat permettait de poser le diagnostic de syndrome de Cornelia de Lange, caractérisé par un retard de croissance pré et postnatal, une dysmorphie faciale caractéristique avec hirsutisme, un déficit intellectuel de sévérité variable, des anomalies réductionnelles variables des extrémités et parfois des malformations associées (diaphragmatiques, cardiaques, rénales...). Cette hypothèse pouvait être évoquée cliniquement chez ces patients mais était néanmoins délicate étant donné que tous ces fœtus étaient très jeunes.

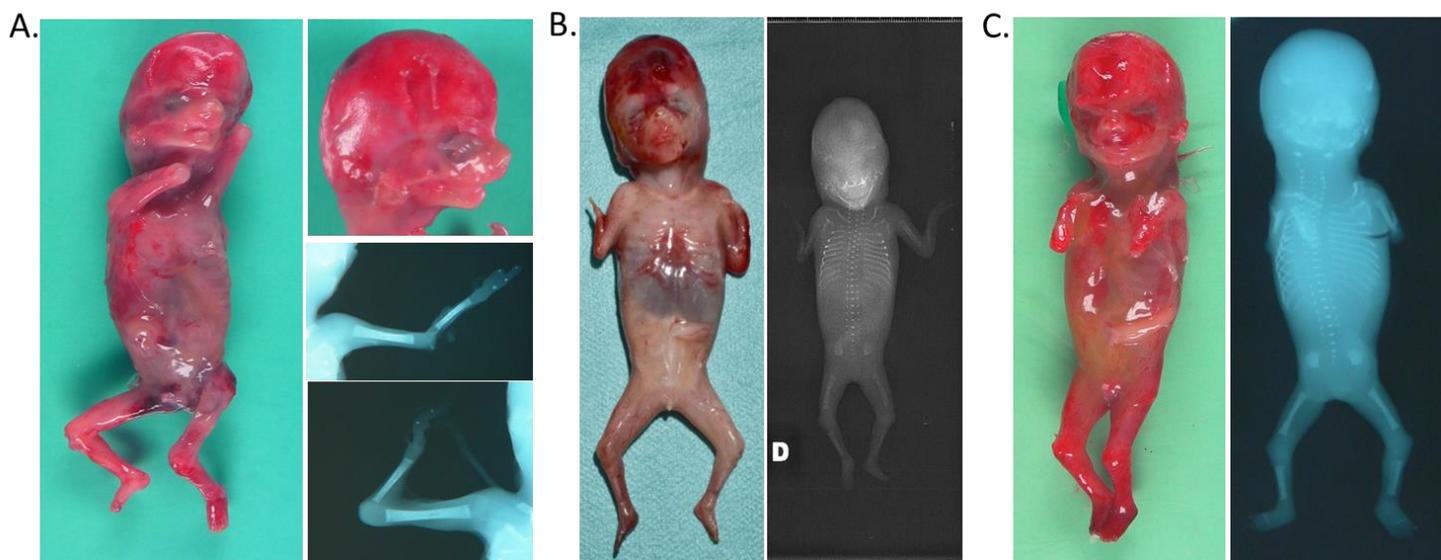


Figure 29 : Photographies et radiographies des foetus NGS_Halo-020 (A), 104 (B) et 181 (C), porteurs d'anomalies réductionnelles sévères.

- Mutation de *GLI3*

La patiente NGS_Halo-106 avait été adressée pour syndactylies des quatre extrémités avec polydactylie préaxiale bilatérale des pieds et agénésies dentaires multiples (Figure 30). Devant ce tableau clinique, un syndrome de Greig, impliquant le gène *GLI3*, avait été évoqué avec réserve puisque la patiente ne présentait pas de macrocéphalie. L'analyse par NGS nous a permis d'identifier une délétion d'une paire de base, c.600delC, entraînant un décalage du cadre de lecture et donc l'apparition d'un codon stop prématuré dans le gène *GLI3*, confirmant l'hypothèse diagnostique.

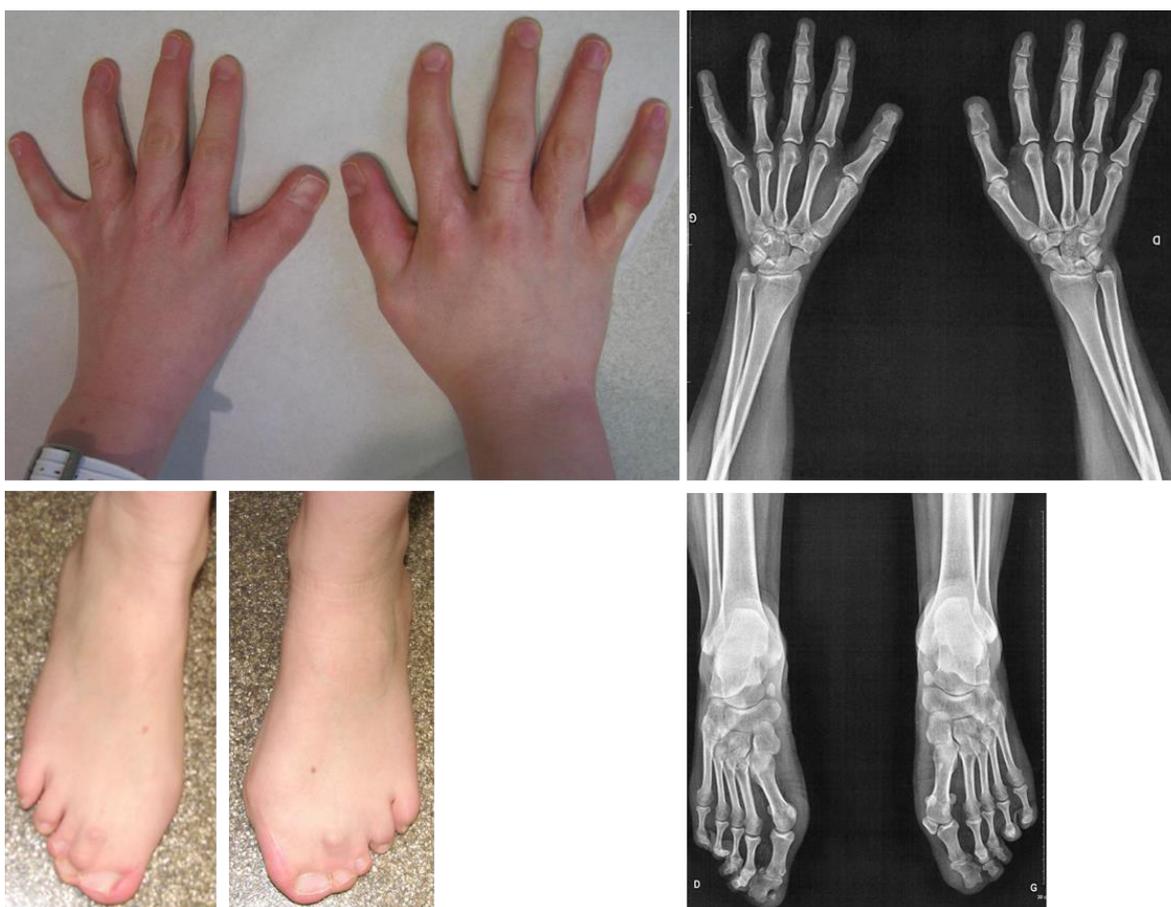


Figure 30: Photographies et radiographies des extrémités de la patiente NGS_Halo-106 porteuse de syndactylies des mains (opérées), de polydactylies préaxiales bilatérales et syndactylies des pieds.

- Mutation de *TFAP2B*

Le patient NGS_Halo-032 avait été adressé pour un tableau polymalformatif associant une anomalie des 5^{èmes} rayons des membres supérieurs, à titre d'agénésie à gauche et d'hypoplasie à droite, une cardiopathie, une fente labiale gauche et une atrésie de l'œsophage. Sa mère présentait les mêmes anomalies des membres associées à une petite taille et des anomalies dentaires. Nous avons identifié chez ces deux patients un variant « non-sens » de *TFAP2B* (c.(583C>T) ; p.(Gln195*)). Ce résultat moléculaire a permis d'établir le diagnostic de syndrome CHAR chez l'enfant et sa mère.

- Mutations de *FANCA*

Le patient NGS_300-001 présente une hypoplasie du pouce droite, un pouce bifide à gauche, une CIV, une dysplasie des oreilles et un possible trouble de l'audition à gauche. Face à ce tableau clinique les gènes *SALL1* et *SALL4* avaient été analysés en première intention mais étaient revenus négatifs. L'étude du panel +300 nous a permis d'identifier,

chez ce patient, deux évènements en *trans* dans le gène *FANCA*. Le premier est un variant nucléotidique de classe 4 (c.3391A>G), prédit délétère par 2 des 3 logiciels utilisés (MutationTaster, Polyphen2). Son score CADD est supérieur à 20 (25,9). Il touche un acide aminé très conservé et est localisé dans le domaine fonctionnel de la protéine. Il a déjà été décrit dans la littérature chez un patient atteint d'anémie de Fanconi (Levrant et al. 1997). Le second, situé en *trans*, est un CNV emportant les exons 1 à 5 du gène. *FANCA* est impliqué dans l'anémie de Fanconi, de transmission autosomique récessive, caractérisée par des anomalies du rayon radial associées à une pancytopénie progressive et une aplasie médullaire. L'identification de ces deux variants a permis d'établir le diagnostic moléculaire chez cet enfant.

- **Suspensions diagnostiques**

- Variants de signification inconnue en cohérence avec le phénotype : *DLX5* /6

Nous avons identifié chez deux patients un variant de signification inconnue dans le gène *DLX5*.

Le premier concerne le patient NGS_Halo-059 qui présente un SHFM des 4 extrémités (Figure 31-B). Il est porteur d'un variant (c.541-3C>G) retrouvé à l'état hétérozygote. D'après les logiciels de prédiction utilisés ce variant provoque un probable saut de l'exon 3 du gène *DLX5* (MaxEnt, NNSPLICE). Ce variant n'a jamais été décrit dans les bases de données en population générale. L'étude de la ségrégation familiale a permis de mettre en évidence la présence du variant chez le neveu atteint, ainsi que chez son demi-frère et sa mère asymptomatiques.

Le second concerne la patiente NGS_Halo-228 qui présente une ectrodactylie de la main gauche (Figure 31-A). Elle est porteuse d'un variant (c.421A>G) retrouvé à l'état hétérozygote, responsable de l'apparition d'un faux sens (p.(Arg141Gly)) prédit délétère par 2 des 3 logiciels utilisés (MutationTaster, Polyphen-2). Son score CADD est supérieur à 20 (27,6). Ce variant n'a jamais été décrit dans les bases de données en population générale. L'étude de la ségrégation familiale a permis de mettre en évidence la présence du variant chez son père asymptomatique.

Enfin, nous avons identifié un variant de signification inconnue, retrouvé à l'état hétérozygote, dans le gène *DLX6* chez le patient NGS_Halo-061 atteint d'une micromésomélie des membres inférieurs avec légère incurvation des tibias, une absence de

péroné à droite et une ectrodactylie des pieds. Ce variant (c.170C>T) engendre l'apparition d'un faux sens (p.(Ser57Leu)) prédit délétère par 2 des 3 logiciels utilisés (MutationTaster, Polyphen-2). Son score CADD est supérieur à 20 (23,8). Ce variant n'a jamais été décrit dans les bases de données en population générale. L'étude de la ségrégation familiale n'a pu être réalisée faute de prélèvements parentaux disponibles.

Le SHFM1 est lié à des anomalies des gènes *DLX5* et *DLX6* situés en 7q21, qu'il s'agisse de remaniements génomiques emportant ces deux gènes, ou responsables de leur dérégulation, mais aussi d'anomalies homo ou hétérozygotes de *DLX5*. Pour ces trois patients nous pensons donc qu'il existe soit une pénétrance incomplète du variant soit un second événement localisé en *trans* encore non identifié à ce jour.

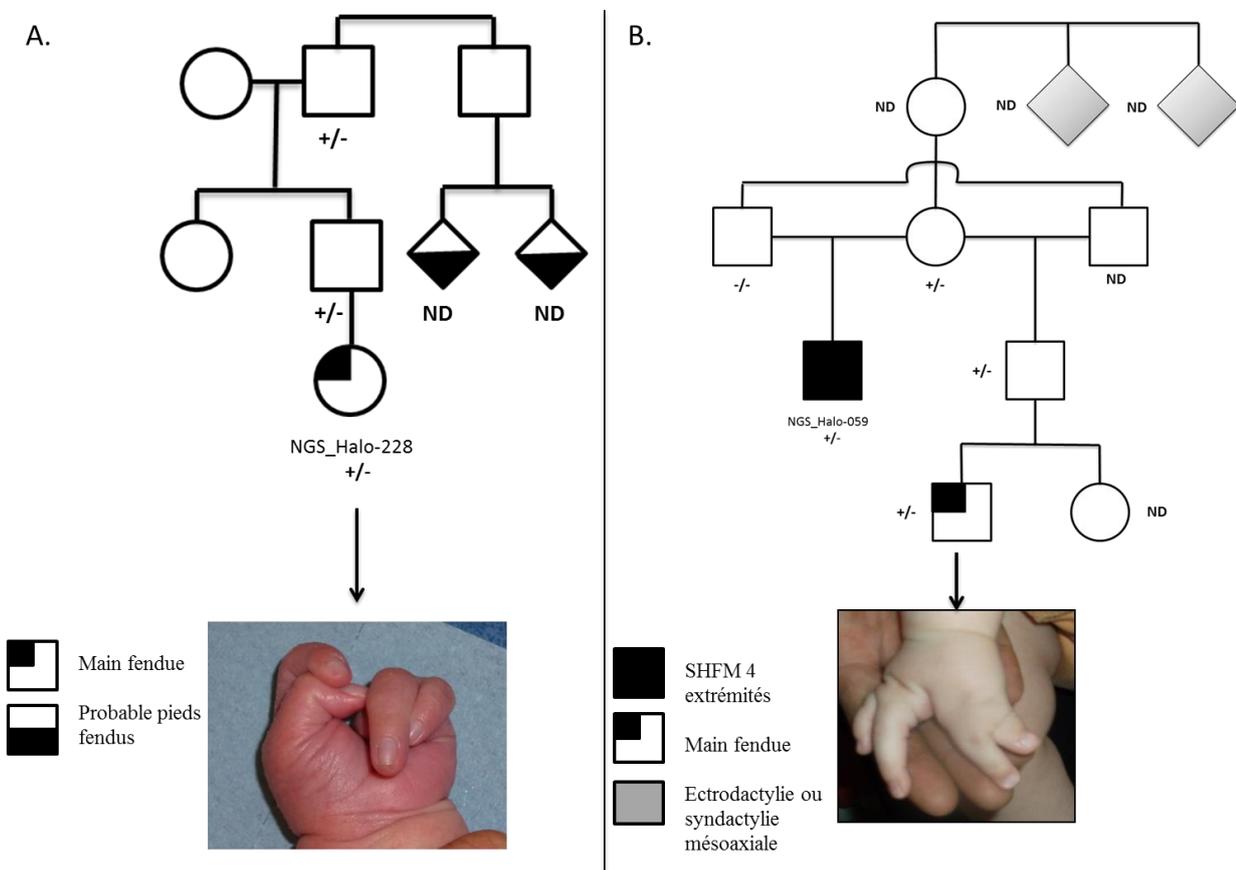


Figure 31 : Arbres généalogiques des patients NGS_Halo-228 (A) et NGS_Halo-059 (B), porteurs de VSI dans le gène *DLX5*. A- Notez la ségrégation du variant c.421A>G chez le père asymptotique du patient NGS_Halo-228 porteur d'une ectrodactylie de la main gauche. B- Notez la ségrégation du variant c.541-3C>G du patient NGS_Halo-059 porteur d'une SHFM des 4 extrémités chez son neveu atteint d'une ectrodactylie de la main droite, ainsi que chez son demi frère et chez sa mère asymptotiques. L'histoire familiale semble montrer l'existence d'antécédent d'ectrodactylie ou de syndactylie mésoaxiale chez les fœtus décédés de sa grand-mère maternelle. (-/- absence du variant, +/- présence du variant à l'état hétérozygote, ND patient non testé à ce jour)

- Un seul variant identifié dans un gène responsable de pathologie autosomique récessive : Suspicion de syndrome lié à *RECQL4*

Chez le patient, NGS_Halo-066, présentant une hypoplasie bilatérale des pouces, une dysplasie spondylo-costale, une hernie diaphragmatique et des oreilles discrètement dysplasiques, nous avons mis en évidence un variant de classe 5 (c.1705-1G>A) dans le gène *RECQL4*. Les variants de celui-ci sont responsables d'anomalies radiales syndromiques dans le cadre des syndromes RAPADILINO, Baller-Gérold et Rothmund Thompson, qui sont transmis sur un mode autosomique récessif. Les logiciels de prédiction utilisés (MaxEnt, NNSPLICE, SSF) prédisent un probable saut de l'exon 11. Bien que certains éléments du phénotype du patient sont présents dans les pathologies liées aux variants de *RECQL4*, et que les autres analyses génétiques se soient révélées normales (recherche de cassures, caryotype, CGH, panel « dysplasie spondylocostales »), nous ne pouvons retenir l'hypothèse de l'implication de ce variant en l'absence de second événement (SNV ou CNV) en *trans*.

- **Mise en évidence de variants dans un gène qui n'était jusqu'à présent décrit que dans le cadre de remaniements génomiques : Brachydactylie et gène *HDAC4***

Parmi les patients atteints de brachydactylie de type E, sans remaniement génomique (ACPA normale), nous avons identifié chez deux d'entre eux, NGS_Halo079 et NGS_Halo-090 (Figure 32), des variants de classe 5 du gène *HDAC4* (c.1257dupA et c.699C>G). Ces variants engendrent l'apparition d'une protéine tronquée dépourvue de son domaine fonctionnel (respectivement, décalage du cadre de lecture engendrant l'apparition d'un codon stop 112 positions en aval p.(Leu420Thrfs*112) et apparition d'un codon stop prématuré p.(Tyr233*)). L'haploinsuffisance de *HDAC4*, n'était connue que dans le cadre des délétions localisées en 2q37 responsables de BDE syndromique associée à une déficience intellectuelle dans le cadre du syndrome d'Albright. Nous avons donc souhaité étudier l'impact de nos différents variants sur la protéine. Pour cela, une étude fonctionnelle de ces variants, détaillée dans la partie consacrée aux débouchés fondamentaux de notre travail, a été réalisée.

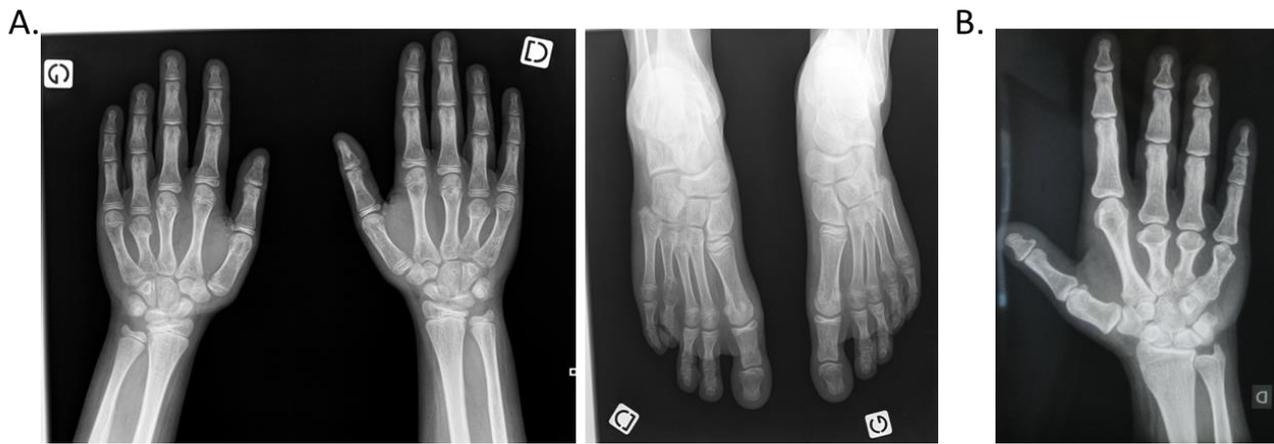


Figure 32: Radiographies des extrémités du patient NGS_Halo-079 (A) et NGS_Halo-90 (B) présentant une brachydactylie de type E.

○ Identification de nouveaux gènes

▪ Variant du gène *LEF1*

Chez le patient NGS_Halo-050, porteur d'une anomalie radiale bilatérale et d'une cardiopathie congénitale à type de foramen ovale avec CIA, et ses apparentés atteints, nous avons identifié un variant (c.928A>G) du gène *LEF1*, que nous avons intégré dans ces panels en raison de son implication dans la voie de signalisation de TBX5/SALL4. Ce variant engendre l'apparition d'un faux sens (p.(Met310Val)) localisé dans le domaine HGM-Box de la protéine. Il est prédit délétère par les 3 logiciels utilisés (SIFT, MutationTaster, Polyphen-2) et son score CADD est supérieur à 20 (25,9). Ce variant est absent des bases de population générale. Les critères ACMG classent ce variant comme de signification inconnue.

▪ Variant du gène *FGF4*

Chez le patient NGS_Halo-117, présentant une brachydactylie de type B, nous avons identifié un variant du gène *FGF4* que nous avons intégré dans ces panels en raison de son implication dans la voie de régulation des FGFs. La variation identifiée est un « faux-sens » (c.598A>T, p.(Thr200Ser)) localisé dans le domaine FGF. Il est prédit délétère par 2 des logiciels utilisés (MutationTaster, Polyphen-2) et présente un score CADD supérieur à 20 (24,5). Ce variant est absent des bases de population générale. Les critères ACMG classent ce variant comme de signification inconnue.

▪ Variant du gène *FMN1*

Chez le patient NGS_Halo-118, porteur d'une anomalie réductionnelle, nous avons identifié un VSI du gène *FMN1*, qui n'est actuellement pas décrit en pathologie humaine mais est impliqué dans la régulation des BMPs. Ce variant (c.889G>A) est responsable de

l'apparition d'un faux sens (p.(Glu297Lys)) touche un acide aminé très conservé. Il est prédit délétère par Polyphen-2 et son score CADD est égal à 16. Il n'a, à ce jour, été rapporté que 6 fois sur 138 086 allèles testés dans GnomAD. Les critères ACMG classent ce variant comme de signification inconnue.

Les pathologies de ces trois gènes n'étaient pas connues chez l'Homme. Ils font partie des débouchés fondamentaux de ce travail, qui seront détaillés dans le chapitre 7-« Débouchés fondamentaux : nouveaux gènes candidats ».

3.iii- Comparaison de la technologie Haloplex versus SureSelectQXT

La comparaison des deux technologies de séquençage, par PCR-amplicon (Haloplex) *versus* par capture (SureSelect QXT), montre une meilleure qualité de séquençage pour la seconde (seulement 81% des gènes sont couverts à plus de 98% à 30X pour la technologie Haloplex, contre 98% pour la technologie SureSelect QXT) (Figure 33-B). Cette dernière crée également moins d'artefacts de séquençage (moins d'une dizaine d'artefacts probables par patient pour la technologie SureSelect contre une vingtaine pour la technologie Haloplex ; la visualisation subjective des alignements montre des reads de meilleure qualité). Elle permet également d'obtenir une meilleure homogénéité de profondeur et de couverture inter échantillons ce qui est crucial pour la détection de CNVs (Figure 33-A). Nous avons alors pu développer et valider un outil bioinformatique capable de détecter les CNVs issus de séquençage haut débit par capture. Ainsi, nous pouvons étudier la variation du nombre de copies de l'intégralité des gènes proposés dans notre catalogue d'analyse. Ceci nous a permis de détecter un CNV d'importance (délétion du gène *FANCA*).

L'augmentation du nombre de cibles de 125 à plus de 300 nous a permis seulement la détection deux variants supplémentaires (1 SNV et 1 CNV dans le gène *FANCA*, décrits précédemment page 92).

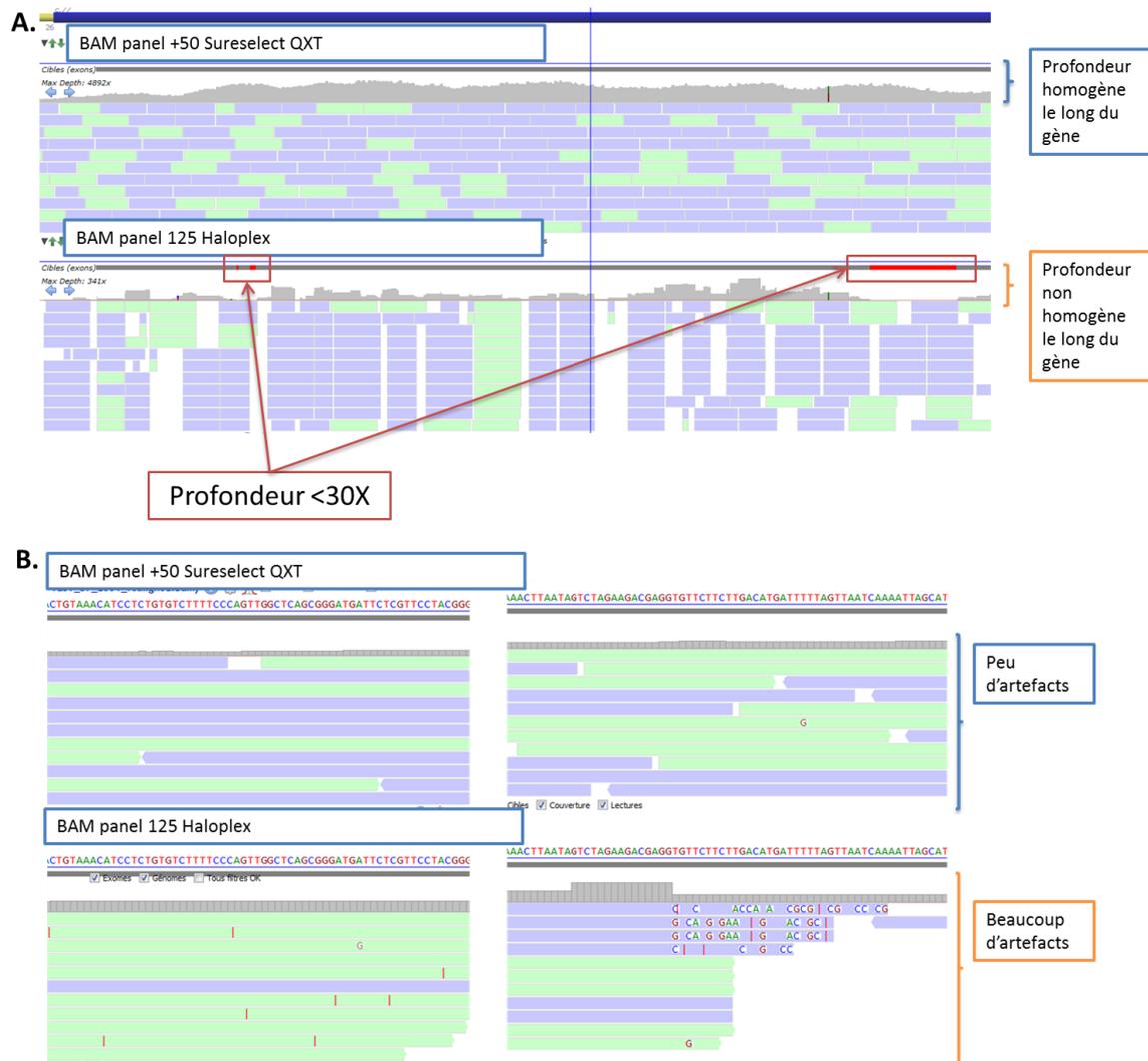


Figure 33 : Exemple de lecture de séquence permettant d'évaluer les deux techniques de préparation de librairie haloplex versus SureSelect QXT. A- Notez la meilleure couverture et la meilleure homogénéité de profondeur du panel SureSelect. B- Notez la présence de nombreux artefacts avec la technologie Haloplex.

4- Résultats des analyses pangénomiques par CGH enrichie

4.i- Cohorte de patients

Parmi notre cohorte de 362 patients atteints d'ectrodactylies isolées ou syndromiques, nous avons pu établir un diagnostic moléculaire chez 161 d'entre eux (44,5%). Parmi les 201 patients sans anomalie moléculaire identifiée (analyses des gènes *TP63*, *BHLHA9*, du10q, *WNT10B* voire, pour certains cas, *PITX1*, *HOXD13*, *WNT7A* et la *ZRS*), 47 patients (Tableau 11) ont bénéficié d'une analyse par CGH enrichie sur les zones d'intérêt associées à ce phénotype décrites dans le tableau 1.

Tableau 11 : Description du phénotype et des analyses moléculaires réalisées chez les patients ayant bénéficiés d'une étude par CGH enrichie. (Les analyses moléculaires de couleur [bleue](#) ont été réalisées en parallèle de l'étude par CGH ciblée)

Patient	Phénotype	Catégorie	Analyses moléculaires
CGH01	Main fendue unilatérale, ongle circulaire	SH unilat	qPCR <i>BHLHA9</i>
CGH02	Main fendue unilatérale, avant-bras hypoplasique	SH unilat	qPCR <i>BHLHA9</i>
CGH03	Pieds fendus	SF	qPCR <i>BHLHA9</i> , Sanger <i>PITX1</i>
CGH04	Main fendue isolée	SH unilat	qPCR <i>BHLHA9</i> , Sanger <i>TP63</i>
CGH05	Ectrodactylie unilatérale, agénésie péroné droit, aspect pied fendu gauche	SHFLD	qPCR <i>BHLHA9</i>
CGH06	Ectrodactylie main et pied gauche	SHFM	qPCR <i>BHLHA9</i>
CGH07	SHFLD	SHFLD	qPCR <i>BHLHA9</i>
CGH08	Main fendue isolée	SH unilat	qPCR <i>BHLHA9</i>
CGH09	Ectrodactylie, agénésie fibula gauche	SHFLD	qPCR <i>BHLHA9</i> , panel Haloplex
CGH10	SHFLD	SHFLD	qPCR <i>BHLHA9</i>
CGH11	Mains fendues, anomalie tibiale	SHFLD	qPCR <i>BHLHA9</i> , panel Haloplex
CGH12	Mains fendues	SH	qPCR <i>BHLHA9</i>
CGH13	SHFM	SHFM	qPCR <i>BHLHA9</i> , Sanger <i>HOXD13</i> et <i>ZRS</i>
CGH14	SHFLD	SHFLD	qPCR <i>BHLHA9</i>
CGH15	Ectrodactylie, agénésie tibiale unilatérale, anomalie radiale unilatérale	SHFLD	qPCR <i>BHLHA9</i>
CGH16	Hypoplasie fémorale bilatérale, agénésie du péroné gauche, aspect de pied fendu à gauche	SHFLD	qPCR <i>BHLHA9</i> , panel Haloplex
CGH17	Ectrodactylie, hémimélie longitudinale membre inférieur	SHFLD	qPCR <i>BHLHA9</i>
CGH18	Mains fendues	SH	qPCR <i>BHLHA9</i>

CGH19	SHFM	SHFM	qPCR <i>BHLHA9</i> , panel SureSelect +300
CGH20	Ectrodactylie	SHFM	qPCR <i>BHLHA9</i> , Sanger <i>TP63</i>
CGH21	SHFM	SHFM	qPCR <i>BHLHA9</i>
CGH22	SHFM	SHFM	qPCR <i>BHLHA9</i> et dup10q, Sanger <i>TP63</i> , WES
CGH23	Aspect pieds fendus, anomalie des os long	SHFLD	Sanger <i>PITX1</i>
CGH24	Main fendue unilatérale	SH unilat	Sanger <i>TP63</i>
CGH25	Main fendue, agénésie tibiale	SHFLD	qPCR <i>BHLHA9</i> , Sanger <i>TP63</i> , WES
CGH26	Main fendue	SH unilat	qPCR <i>BHLHA9</i> , sanger <i>TP63</i> , panel SureSelect +300
CGH27	Aspect pieds et mains fendus	SHFM	Sanger <i>TP63</i>
CGH28	Ectrodactylie main droite unilatérale	SH unilat	Sanger <i>TP63</i>
CGH29	SHFM syndromique	SHFMD	Sanger <i>TP63</i>
CGH30	Mains fendues bilatérales asymétriques	SH	qPCR dup10q, Sanger <i>TP63</i>
CGH31	SHFM sévère	SHFM	Sanger <i>TP63</i>
CGH32	SHFM	SHFM	qPCR <i>BHLHA9</i> , Sanger <i>TP63</i>
CGH33	EEC	EEC	Sanger <i>TP63</i> , panel Haloplex
CGH34	EEC	EEC	qPCR <i>BHLHA9</i> , sanger <i>TP63</i> , panel Haloplex
CGH35	Main fendue unilatérale	SH unilat	qPCR <i>BHLHA9</i> , panel Haloplex
CGH36	SHFM	SHFM	qPCR <i>BHLHA9</i> et dup10q
CGH37	Ectrodactylie, agénésie fibula, hémimélie transversale des membres supérieurs	SHFLD	qPCR <i>BHLHA9</i> , sanger <i>WNT7A</i> , panel SureSelect +300
CGH38	SHFLD	SHFLD	qPCR <i>BHLHA9</i>
CGH39	SHFM, surdité	SHFMD	qPCR <i>BHLHA9</i>
CGH40	Pieds fendus, agénésie péroné	SHFLD	qPCR <i>BHLHA9</i> , panel SureSelect +300
CGH41	Ectrodactylie des deux mains, hémimélie longitudinale externe gauche	SHFM	qPCR <i>BHLHA9</i>
CGH42	ectrodactylie	SHFM	qPCR <i>BHLHA9</i>
CGH43	SHFLD	SHFLD	qPCR <i>BHLHA9</i>
CGH44	Main fendue unilatérale, surdité, anomalie des oreilles	SHFMD	qPCR <i>BHLHA9</i>
CGH45	Ectrodactylie, surdité, anomalie des oreilles	SHFMD	qPCR <i>BHLHA9</i>
CGH46	Mains fendues	SH	qPCR <i>BHLHA9</i>
CGH47	Pieds fendus, malformation oreille interne	SHFMD	qPCR <i>BHLHA9</i>

Ces 47 patients ont été classés en 7 groupes distincts selon leur phénotype : SHFM (atteinte des 4 extrémités, n=12), SF/SF (atteinte de deux ou trois extrémités qu'il s'agisse des mains ou des pieds, n=5), SH (atteinte d'une seule main, n=8), SHFMD (SHFM associée à une surdité, n=5), SHFLD (n=15) et EEC (n=2) (Figure 34).

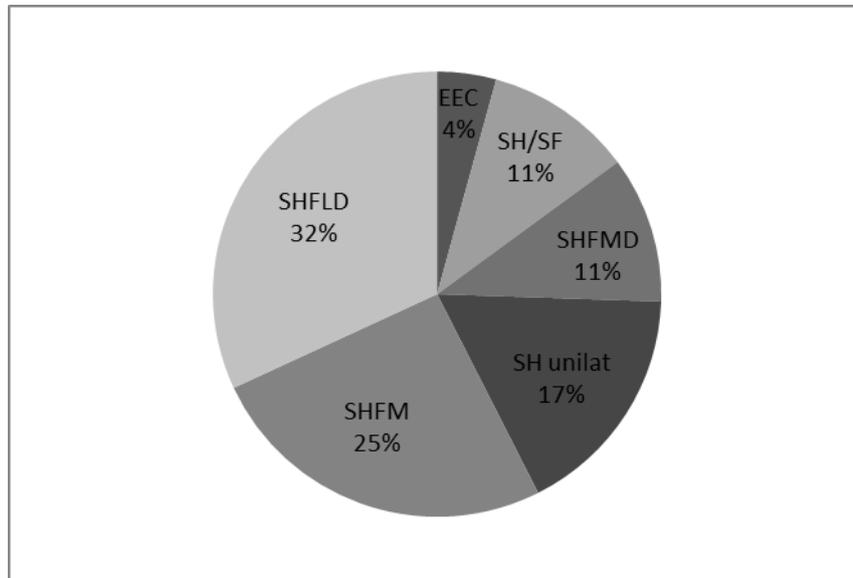


Figure 34: Distribution des patients de la cohorte ectrodactylie selon leur catégorie phénotypique.

4.ii- Analyse des résultats

Au total, nous avons pu détecter *via* le logiciel CytoGenomics (Agilent) 568 événements, 276 gains (48,6%) et 292 pertes de matériel génomique (51,4%). Après application du filtre qualité sur le *ratio* ($\log_2 > +0,58$ pour une duplication, < -1 pour une délétion) 165 CNVs ont pu être conservés : 2 duplications localisées sur 2 zones différentes et 163 délétions localisées sur 50 zones différentes. Cependant, après consultation des bases de données de population générale telle que DGV et Decipher, ainsi qu'une recherche bibliographique, aucun remaniement chromosomique déséquilibré d'intérêt n'a été mis en évidence avec une résolution moyenne d'environ 2000 pb (paramètre à 10 sondes consécutives) et 550pb (paramètre à 3 sondes consécutives) (Figure 35).

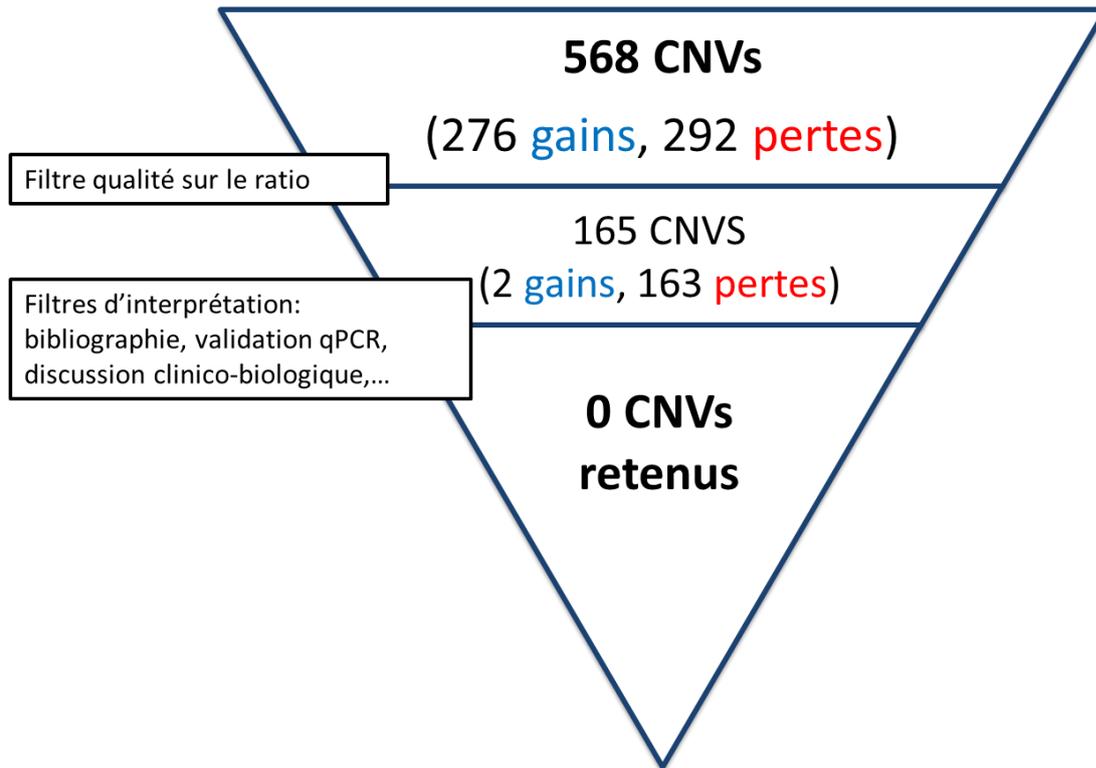


Figure 35 : Distribution des CNVs identifiés par CGH enrichie.

5- Résultats des analyses pangénomiques par séquençage d'exome complet (WES)

5.i- Cohorte de patients

Dix-huit patients ont bénéficié d'un WES (Figure 36, Tableau 12). Parmi ces 18 patients, seize familles ont pu être analysées en *trio* (proband-père-mère). Concernant la famille 11, les deux enfants atteints ont été analysés ainsi que la mère atteinte et le père sain. Enfin, les deux fils atteints de la famille 12 ainsi que leur grand-mère saine ont été étudiés.

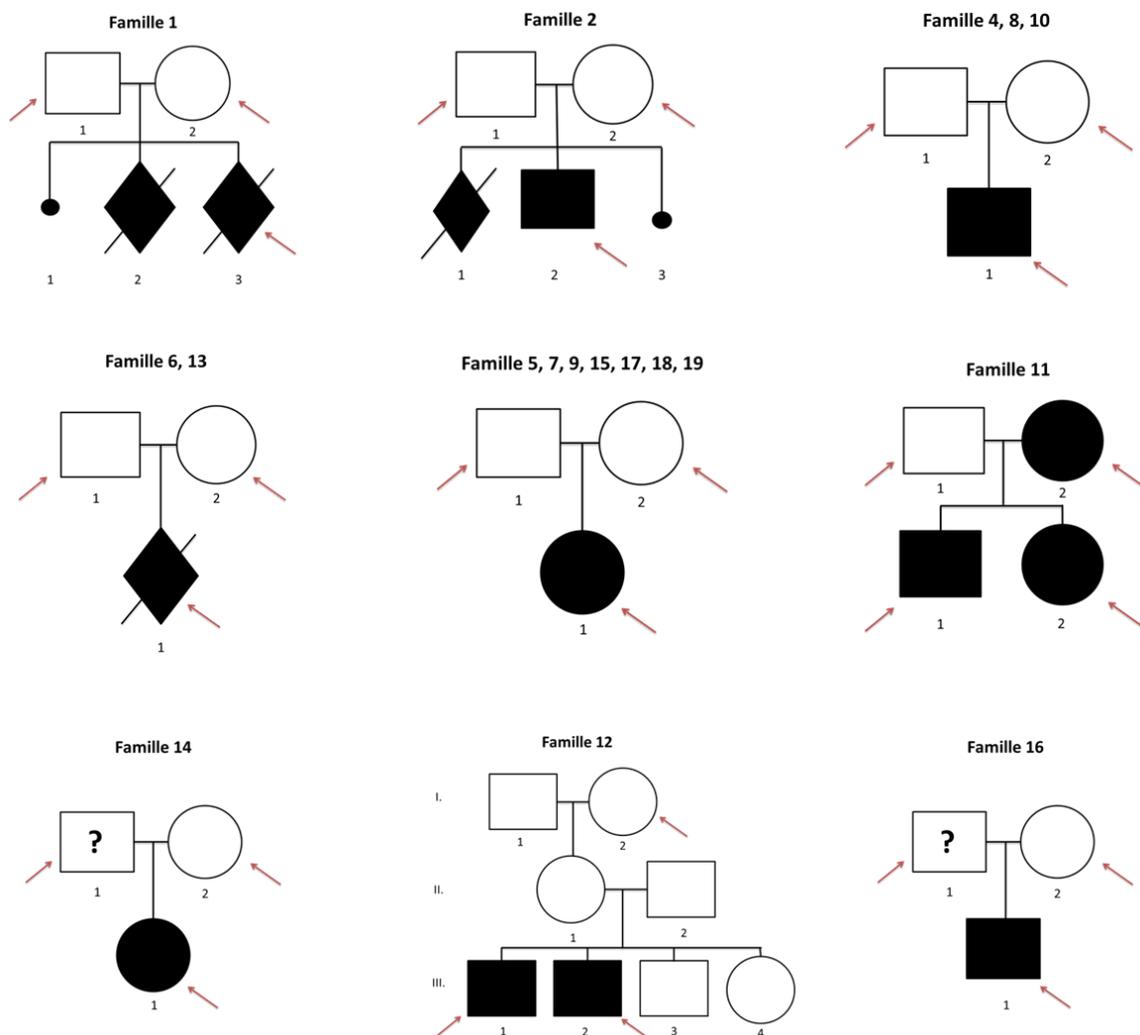


Figure 36 : Arbres généalogiques des familles ayant bénéficié d'un WES. Les patients symptomatiques sont représentés par une figure noire pleine. Les patients dont le phénotype reste douteux par un point d'interrogation « ? ». Les échantillons analysés sont signalés par une flèche rouge.

Tableau 12 : Phénotype du cas index de chaque famille ayant bénéficié d'un WES et analyse moléculaire réalisée en premières intentions.

Famille	Analyse primaire	Catégorie	Phénotype
1	<i>WNT7A</i>	Anomalie Réductionnelle	Malformation de membre inférieur : agénésie du fémur droit, hypoplasie de l'aile iliaque droite, hexadactylie pré axiale de la main droite sous forme d'un bourgeon surnuméraire, associée à un 2 ^{ème} doigt en griffe et une clinodactylie des 5 ^{èmes} doigts, rein en fer à cheval, nez plat, grandes oreilles (l'autre fœtus était également polymalformé)
2	<i>TP63</i>	Ectrodactylie	SHFM des 4 extrémités d'aspect inhabituel
4	<i>TP63</i>	Ectrodactylie	Ectrodactylie
5	<i>SALL4, SALL1</i>	Anomalie Radiale	Polydactylie préaxiale droite, anus antéposé, persistance du canal artériel, strabisme convergent, développement psychomoteur normal mais avec lenteur, fistule du 3 ^{ème} arc branchial gauche, anomalie du rachis cervical
6	Panel	Polymalformatif	Hygroma cervical, amélie des membres supérieurs, absence de membre inférieur droit, ébauche de membre inférieur gauche, minéralisation rachidienne faible
7	<i>SALL4</i>	Anomalie Radiale	Tableau typique de syndrome d'Okhiro
8	<i>GDF5</i>	Brachydactylie	Brachydactylie de type C au niveau des mains, mais aspect anormal des orteils avec élargissement et écartement en éventail (évoquant syndrome Oto Palato Digital)
9	<i>TBX5</i>	Anomalie Radiale	Atteinte bilatérale du rayon préaxial (pouce absent à gauche et rudimentaire à droite), tétralogie de Fallot
10	<i>TP63</i>	Ectrodactylie	Hypoplasie du péroné et ectrodactylie
11	<i>TBX4</i>	Hypoplasie Patellaire	Hypoplasie bilatérale des rotules responsable de troubles de la statique des genoux, allongement bilatéral du col fémoral, élargissement bilatéral de l'espace entre les 1 ^{ers} et 2 ^{nds} orteils, anomalie bilatérale des 4 ^{èmes} et 5 ^{èmes} rayons, micrognathie modérée, fusion des vertèbres T8-T9. A noter que la mère présente une hypoplasie rotulienne bilatérale
12	<i>TP63</i>	Ectrodactylie	Chez le cas 1 : Ectrodactylie bilatérale des mains et du pied gauche Chez le cas 2 : ectrodactylie bilatérale des mains et du pied droit associées à une paralysie faciale

13	<i>GDF5, PITX1</i>	Polymalformatif	Agénésie bilatérale des péronés, angulation fémorale, hexadactylie pré-axiale des pieds avec syndactylie, dysostose costo vertébrales (surtout thoracique médiane et basse et lombaire), anomalie pulmonaire (défaut de la segmentation avec seulement deux lobes à droite)
14	<i>TBX4</i>	Hypoplasie Patellaire	Hypoplasie patellaire bilatérale, hypertension pulmonaire et CIA
15	<i>PTHLH, HOXD13, HDAC4, GNAS</i>	Brachydactylie	Brachydactylie bilatérale de type D et E (brachymétabrapie III-IV à gauche et IV à droite) pouces courts et larges, hallux larges, front proéminent et myopie
16	<i>PTHLH, HOXD13, HDAC4, GNAS, EFTUD2</i>	Polymalformatif	Raccourcissement acro et rhizomélique des membres, macrocrairie, asymétrie faciale, oreille droite dysplasique, front large, oreille gauche décollée, palais ogival, extrémités courtes, clinodactylie des 5 ^{èmes} doigts, surdité de perception sévère à droite moyenne à gauche A noter que le père et le frère auraient également des extrémités courtes
17	<i>BHLHA9</i>	Ectrodactylie	Agénésie des deux membres inférieurs (aspect de moignon à droite avec 1 seul orteil et de moignon en avant de l'articulation du genou gauche)
18	Panel	Polymalformatif	Anomalies extrémités (mains : courtes et ongles concaves, 1 ^{er} doigt élargi, pieds : courts, implantation proximale du I, brachym�tarsie 3 ^{�me} doigt à gauche, « <i>sandal gap</i> »), dysplasie rénale, CIV, ankyloblépharon, anus antéposé, dyskinésie trachéale, retard croissance, dysmorphie, anomalie dentaire, surdité, scoliose, pectus excavatum
19	<i>TBX5</i>	Anomalie Radiale	Agénésie radiale bilatérale, anomalie cervicale, rein en fer à cheval et artère ombilicale unique

5.ii- Performance du WES

La réalisation du WES dans ces 18 familles a permis de générer des résultats avec un score qualité >Q30 moyen de 95,71% et une couverture moyenne des gènes de 87,88% à 25X (Tableau 13).

Tableau 13 : Etude qualitative des WES réalisés. Score qualité moyen supérieur à Q30 et couverture moyenne >25X en pourcentage de chaque échantillon séquencé.

Famille	Patient	Atteint (O: oui, N:non)	Score qualité moyen >Q30 (%)	Couv. moyenne >25X (%)	Famille	Patient	Atteint (O: oui, N:non)	Score qualité moyen >Q30 (%)	Couv. moyenne >25X (%)
1	Cl	O	96	84	10	Cl	O	97,1	94
	Mère	N	96,4	84		Mère	N	96,6	88
	Père	N	96,4	85		Père	N	97	94
2	Cl	O	96,5	86	11	Cl	O	95,6	84
	Mère	N	95,7	86		Sœur	O	96,3	89,5
	Père	N	96,1	85		Mère	O	96,3	89,3
				Père		N	96,2	89,1	
4	Cl	O	96,4	83	12	Cl	O	95,6	89
	Mère	N	96,5	86		Frère	O	95,2	85
	Père	N	96,3	83		Grand-mère	N	95,4	86
5	Cl	O	97,2	94	13	Cl	O	96,4	88,8
	Mère	N	96,4	95		Mère	N	95,7	87,2
	Père	N	96,1	95		Père	N	95,1	85,3
6	Cl	O	97,2	91	14	Cl	O	95,9	89
	Mère	N	97,4	95		Mère	N	95,8	87,4
	Père	N	97,2	95		Père	O	96	82,7
7	Cl	O	97,3	94	15	Cl	O	96,1	88,8
	Mère	N	97,2	94		Mère	N	95,8	86,5
	Père	N	97,4	94		Père	Doute	95,8	87,4
8	Cl	O	96,8	89	16	Cl	O	96	91,5
	Mère	N	96,3	91		Mère	N	96	91,4
	Père	N	95,5	87		Père	Doute	96,1	92,6
9	Cl	O	96,7	91	Moyenne			95,71	87,88
	Mère	N	97	94					
	Père	N	97,2	91					

5.iii- Distribution et interprétation des variants issus du WES

Les WES réalisés ont permis d'identifier au total 1 081 293 variants pour les 18 cas index étudiés avec, en moyenne, 60 151 variants par patient. Après application des filtres bioinformatiques, nous avons retenu au total 175 variants *de novo*, 49 homozygotes, 74 hétérozygotes composites, 25 liés au chromosome X et 204 transmis sur un mode autosomique dominant (Tableau 14). Enfin, après étude bibliographique, discussion clinico-biologique et validation Sanger, nous avons retenu 2 variations nucléotidiques dans 2 gènes d'intérêt et ce pour 2 patients (Figure 37). Aucun des deux n'a déjà été décrit dans la littérature. Ces deux variants, de classe 4 (*PUF60*) et 5 (*EYA1*), ont permis d'établir un diagnostic moléculaire pour ces 2 patients.

En revanche, faute d'outils bioinformatiques adaptés nous n'avons, à ce jour, détecté aucun CNV de façon fiable.

La liste complète des variants et leur interprétation est disponible dans le tableau 15.

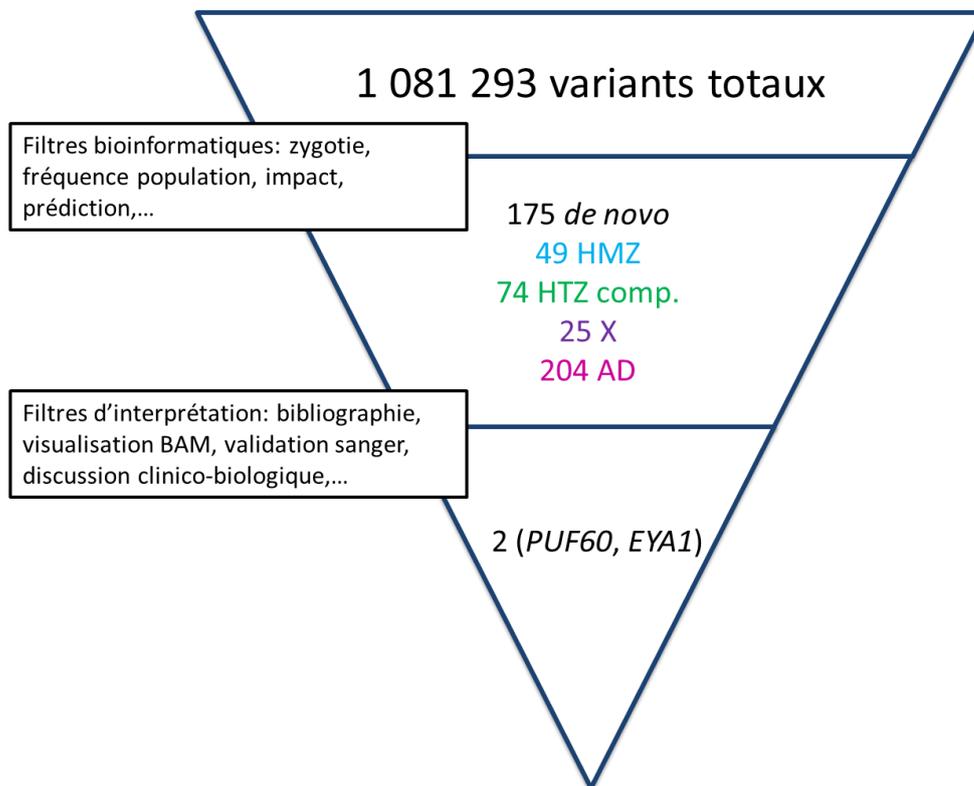


Figure 37 : Distribution globale des variants identifiés par WES avant et après applications des différents filtres. *De novo* (en noir), *HMZ* (en bleu): homozygote, *HTZ comp* (en vert): Hétérozygote composite, *X* (en violet) : lié au chromosome X, *AD* (en rose) : transmission autosomique dominante.

Tableau 14 : Distribution des variants identifiés par WES et des gènes retenus dans les 18 familles analysées. Nombre de variants totaux appelés et analysés selon différents modes de transmission : *De novo* (en noir), **HMZ** (en bleu): homozygote, **HTZ comp** (en vert): Hétérozygote composite, **X** (en violet) : lié au chromosome X, **AD** (en rose) : transmission autosomique dominante.

Famille	Catégorie phénotypique	Nb variants totaux chez le CI	<i>De novo</i>	HMZ	HTZ comp.	Lié à l'X	AD	Gènes retenus
1	Anomalie Réductionnelle	54926	10	2	5	ND	ND	/
2	Ectrodactylie	54229	10	1	8	3	ND	/
4	Ectrodactylie	53655	12	1	6	1	ND	/
5	Anomalie Radiale	58729	12	1	5	ND	ND	<i>PUF60</i>
6	Polymalformatif	55915	12	1	10	ND	ND	/
7	Anomalie Radiale	57358	17	0	5	ND	ND	/
8	Brachydactylie	70924	9	1	4	12	ND	/
9	Anomalie Radiale	69621	12	1	3	ND	ND	/
10	Ectrodactylie	83380	9	3	7	4	ND	/
11	Hypoplasie Patellaire	54783	ND	ND	ND	ND	34	/
12	Ectrodactylie	40756	ND	ND	ND	2	ND	/
13	Polymalformatif	58179	9	4	4	ND	ND	/
14	Hypoplasie Patellaire	56819	ND	ND	ND	0	129	/
15	Brachydactylie	59001	16	3	4	ND	ND	/
16	Polymalformatif	62936	11	1	0	3	41	<i>EYA1</i>
17	Ectrodactylie	65075	10	23	7	ND	ND	/
18	Polymalformatif	63455	10	3	3	ND	ND	/
19	Anomalie Radiale	61552	16	4	3	ND	ND	/
Moyenne		60151	12	3	5	4	68	

Tableau 15 : Détails et interprétation des variants identifiés par WES (HTZ : hétérozygote)

Patient	Groupe Phénotypique	Gène	Zygotie	Changement cDNA/gDNA	Changement protéique	Classe ACMG	Prédiction (logiciels)	Conservation interespèces	Domaine protéique	Ségrégation familiale
Exome-F16	Polymalformatif	<i>EYA1</i>	HTZ	c.1294del	p.(Leu432Cysfs*3)	5	Codon STOP 3 positions en aval	/	/	<i>De novo</i>
Exome-F5	Anomalie Radiale	<i>PUF60</i>	HTZ	c.349-13T>A	p.(Met117Serfs*55)	4	Changement prédit au site accepteur 13 pbs en aval probable	/	/	<i>De novo</i>

Variant du gène *PUF60*

La famille 5 est composée d'une patiente, fille unique de parents en bonne santé et ne signalant pas de lien de parenté. La patiente présente une suspicion de syndrome de Townes-Brocks avec une duplication du pouce associée à une anomalie de Sprengel, une fusion des vertèbres cervicales, une antéposition anale et un sinus branchial (Tableau 17, Figure 38-A).

Dans cette famille, nous avons réalisé une étude d'exome en *trio*, à la recherche de variants *de novo* et de variants à transmission autosomique récessive de type hétérozygotes composites, voire homozygotes, malgré l'absence de consanguinité connue.

Au total, 58 729 variants ont été identifiés chez le cas index. Après application des filtres bioinformatiques et des filtres d'interprétation (bibliographie, lecture des BAMs, validation Sanger, concordance clinique, ...), nous n'avons retenu qu'un seul variant localisé dans l'intron 5 du gène *PUF60* : c.349-13T>A. Ce dernier survenu *de novo* a été retrouvé à l'état hétérozygote.

Ce variant est absent des bases de données en population générale. D'après les logiciels de prédiction cette substitution d'une paire de bases, située dans l'intron 5 à 13 pbs en amont du site accepteur d'épissage, a comme conséquence possible un changement au niveau de ce site et la synthèse de transcrits anormaux (MaxEnt -48,9%, NNSPLICE -14,3%, SSF -100%). Les critères ACMG classent ce variant comme probablement délétère. Une étude fonctionnelle de l'épissage du gène *PUF60* sur ARN a été réalisée sur un prélèvement de fibroblastes de la patiente et a permis de confirmer notre hypothèse, en mettant en évidence une insertion de 11pb en amont de l'exon 6, engendrant un ARNm anormal (Figure 38-B).

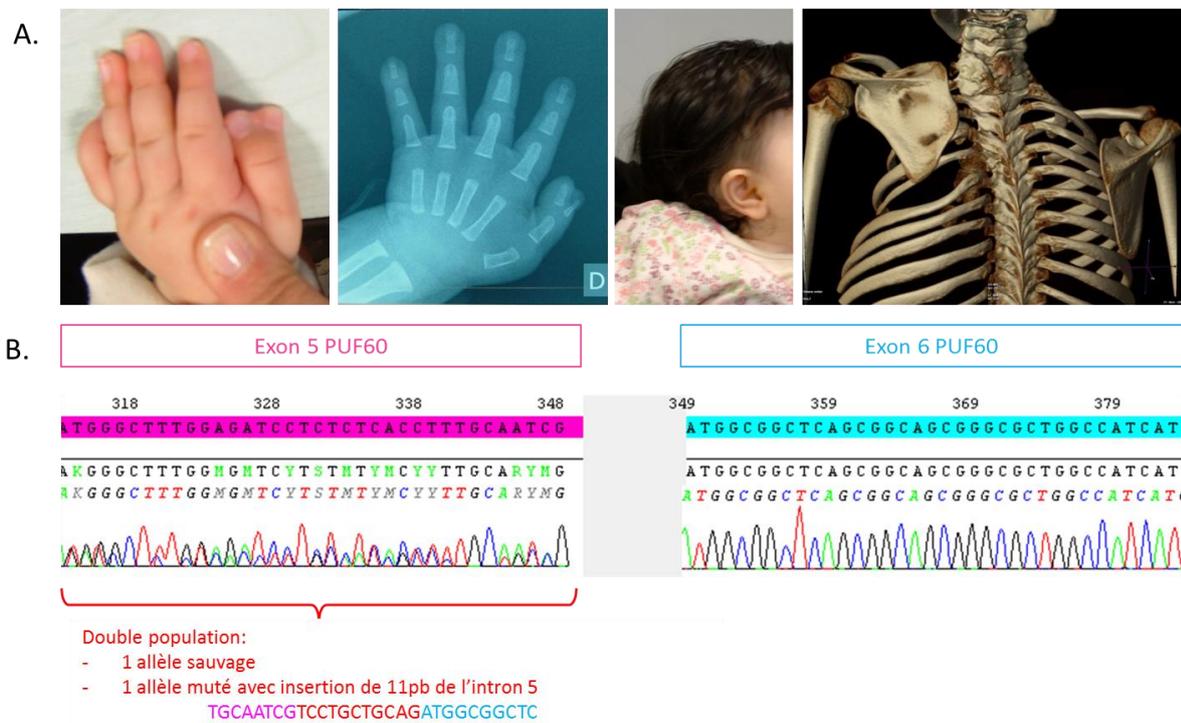


Figure 38 : Analyse du gène *PUF60* chez la patiente Exome-F5 A- iconographie : duplication du pouce droit, oreille bas implantée et anomalie de Sprengel. B- Résultat de séquence de l'analyse de l'ARNm sur fibroblaste de la patiente : insertion de 11pb de l'intron 5 en amont de l'exon 6.

Le gène *PUF60* code la protéine *Poly(U)-binding-splicing Factor*, impliquée dans l'épissage et la transcription des pré-ARNs, *via* la formation de différents complexes protéiques (Page-McCaw, Amonlirdviman, et Sharp 1999 ; Hastings et al. 2007). Elle a pour fonction de reconnaître le site d'épissage situé en 3' grâce à ses trois domaines protéiques RRM (Figure 39-A), sous forme d'homodimère. Le troisième de ses domaines RRM est appelé « domaine PUMP » et, bien que possédant des similarités avec les deux autres domaines, il semble avoir une fonction différente notamment dans la dimérisation et les interactions interprotéiques (Page-McCaw, Amonlirdviman, et Sharp 1999 ; Hastings et al. 2007).

L'implication de *PUF60* en pathologie humaine a été initialement suspectée grâce à une étude des délétions de la région 8q24.3 emportant plusieurs gènes dont *PUF60* (Dauber et al. 2013). En effet, les patients porteurs de cette délétion à bornes variables présentaient un phénotype commun : le syndrome de Verheij (MIM #615583) (Verheij et al. 2009). Ce dernier associe un retard de croissance, une microcéphalie avec anomalies cérébrales et déficience intellectuelle, des malformations cardiaques, rénales et vertébrales ainsi que des subluxations des hanches et des coudes. Tous les patients décrits porteurs de cette délétion présentaient une anomalie des extrémités : polydactylie post-axiale, pouces *flexus-adductus*, syndactylies centrales et agénésie d'un rayon central ou pré-axial. L'analyse de la région

minimale critique de cette délétion a permis de mettre en avant ce nouveau gène et d'initier des études fonctionnelles ainsi qu'un modèle animal.

L'expression de *PUF60* lors de l'embryogenèse a été démontrée grâce à l'utilisation des Morpholinos ciblant les ARNs de ce gène chez des Zebrafish (Dauber et al. 2013). En effet, les embryons présentaient une taille, une mâchoire et un périmètre crânien significativement plus petits, ainsi que des malformations cardiaques lorsque *puf60* était sous-exprimé. Des variations ponctuelles de *PUF60* ont ensuite été décrites chez des patients atteints de retard de croissance et de déficience intellectuelle parfois accompagnée d'épilepsie (Dauber et al. 2013 ; El Chehadeh et al. 2016 ; Low et al. 2017 ; Santos-Simarro et al. 2017) (Figure 39-B). Des malformations des membres, cardiaques, vertébrales, mandibulaires et palatines ainsi que des luxations congénitales de hanches et des colobomes ont également été décrits chez ces patients. Il est intéressant de noter que les malformations des membres observées chez ces patients sont variables dans leur type, leur topographie et leur sévérité (anomalies des pieds, anomalies radiales, polydactylies, oligodactylies, brachydactylies).

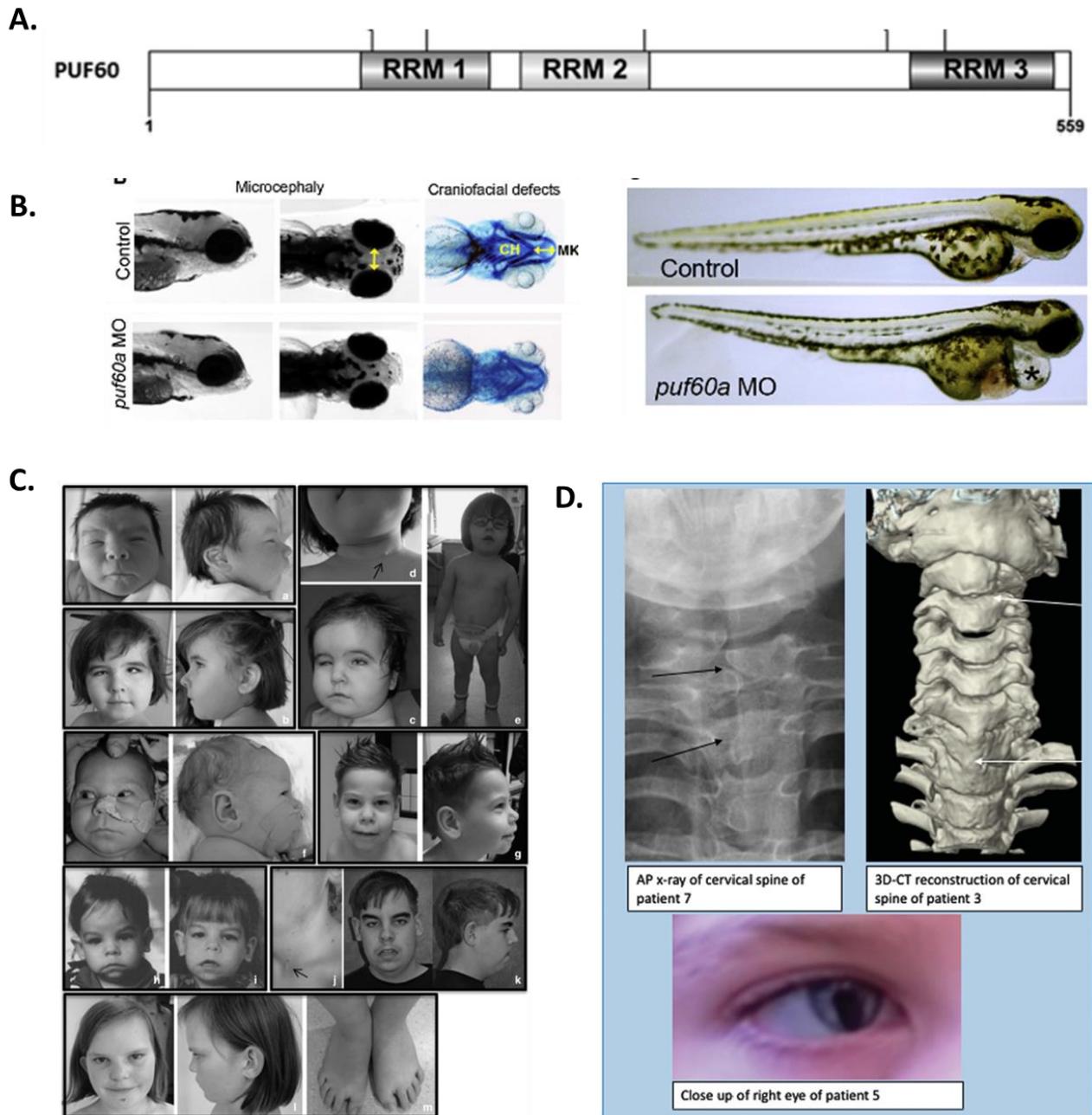


Figure 39 : Représentation de la protéine PUF60 et des phénotypes associés à des variants du gène décrits dans la littérature. A. La protéine PUF60 est composée de 3 domaines protéiques RRM de reconnaissance de l'ARN (Chehadeh, 2018). **B.** Etude des anomalies squelettiques se traduisant notamment par une microcrânie (à gauche) et des malformations cardiaques (à droite) chez le Zebrafish *via* l'utilisation de morpholinos ciblant les ARNs de *Puf60* (Dauber et al. 2013). **C.** Caractéristiques faciales des patients porteurs d'un variant pathogène dans le gène *PUF60* : dysmorphie faciale, front proéminent, strabisme (Chehadeh, 2018) ; **D.** Anomalies squelettiques et atteintes oculaires de patients porteurs de variants pathogènes dans *PUF60* (Santos-Simarro, 2017)

Etant donné l'implication de *PUF60* dans le développement des membres et la concordance de nos résultats avec la littérature concernant sa probable responsabilité en pathologie humaine, il nous a semblé important de poursuivre l'analyse de ce gène chez d'autres patients porteurs d'un phénotype similaire. Ainsi, le *screening* d'une cohorte de 53 patients présentant des anomalies radiales nous a permis d'identifier un second variant dans le gène *PUF60*. Celui-ci a été retrouvé à l'état hétérozygote, *de novo*, chez la patiente NGS226. Cette dernière présentait un phénotype proche du syndrome d'Okhiro, avec une duplication du pouce droit associé à une anomalie cardiaque, un colobome bilatéral et une scoliose sévère. Ce variant entraîne un décalage du cadre de lecture (c.407_410delTCTA, p.(Ile136Thrfs*31)) et est situé dans le domaine de reconnaissance de l'ARN RRM1. Il est absent des bases de données en population générale. Les critères ACMG classent ce variant comme pathogénique. Au total, nous avons identifié deux variants chez deux patientes porteuses d'anomalies radiales et vertébrales.

A l'heure actuelle, 28 patients ont été décrits dans la littérature. Si l'on ajoute les données de nos 2 patientes, nous constatons que 46% (14/30) présentent une anomalie des extrémités. Différents types de malformations sont retrouvées. Il s'agit le plus souvent d'anomalies du rayon radial (7/14) parfois responsable de mains botes, mais aussi de brachydactylies ou autres anomalies de membres. Une tentative de corrélation génotype-phénotype (type de mutation, faux-sens, non-sens *versus* type de malformation des extrémités) s'est révélée infructueuse. En effet, le rayon radial est affecté aussi bien chez des patients avec des variations faux-sens que non-sens. Suite à ces résultats, nous estimons qu'il est nécessaire d'ajouter *PUF60* aux gènes analysés chez les patients présentant des anomalies radiales. Il pourrait également être intéressant de déterminer précisément le rôle de *PUF60* dans le développement des membres par des études *in vivo*.

Variant du gène *EYA1*

Dans la famille 16, le cas index est un petit garçon qui présente un syndrome polymalformatif (raccourcissement acro et rhizomélique des membres, macrocraînie, asymétrie faciale, dysplasie de l'oreille droite, front large, oreille gauche décollée, palais ogival, clinodactylie des 5^{èmes} doigts, surdité de perception sévère à droite et moyenne à gauche, Tableau 17). Le père aurait également des extrémités courtes mais nous ne disposons pas de radiographie. Nous avons réalisé l'analyse WES en *trio* à la recherche de

variants *de novo*, ou à transmission autosomique récessive de type hétérozygote composite, voire homozygotes (malgré l'absence de consanguinité connue), ou à transmission autosomique dominante ou encore liés au chromosome X.

Au total, nous avons retrouvé 62 936 variants. Après application des filtres bioinformatiques, et des filtres d'interprétation (bibliographie, lecture des BAM, validation Sanger, concordance clinique, ...) nous n'avons retenu qu'un seul variant localisé dans le gène *EYA1* (c.1294del). Ce dernier survenu *de novo* a été retrouvé à l'état hétérozygote. Cette délétion d'une paire de bases a pour conséquence attendue un décalage du cadre de lecture engendrant l'apparition d'un codon stop 3 positions en aval (p.(Leu432Cysfs*3)) et la synthèse d'une protéine dont le domaine fonctionnel *Haloacid dehalogenase-like hydrolase* est amputé. Il n'est pas décrit dans les bases de données en population générale et selon les critères ACMG, ce variant est de classe 5.

EYA1 est impliqué dans différents syndromes dont le syndrome Oto-Facio-Cervical (OFC ; MIM #166780) qui se caractérise par une dysmorphie faciale (visage triangulaire allongé, front large, nez et mandibule étroits, palais ogival, oreilles dysmorphiques, bas implantées et proéminentes), un long cou, des fistules et/ou des kystes pré-auriculaires et/ou branchiaux, des muscles cervicaux hypoplasiques, des anomalies des clavicules et des scapulas (aillées, basses et mal implantées) responsables d'épaules tombantes et enfin, une atteinte auditive et un léger déficit intellectuel (Rickard et al. 2001 ; Estefanía et al. 2006). Des anomalies vertébrales et une petite taille peuvent aussi y être associées. La dysmorphie faciale de notre patient ainsi que son anomalie auditive sont compatibles avec le phénotype habituel du syndrome OFC. Nous pensons donc que ce variant, découvert de manière fortuite, peut être à l'origine d'une partie du phénotype du patient mais qu'il n'explique cependant pas les anomalies des extrémités transmises par le père du *propositus*. Le WES réalisé nous a ici permis de dissocier le cadre syndromique de la malformation du membre.

6- Débouchés translationnels : établissement d'un panel de diagnostic « +50 »

Cette partie du travail de thèse a permis la publication de l'article « *Multiplex targeted high-throughput sequencing in a series of 352 patients with congenital limb malformations* » dans le journal *Human Mutation* (Jourdain et al. 2019).

6.i- Etablissement du panel +50

L'étude effectuée avec les panels 125 et +300 nous a permis, d'une part, de confirmer l'intérêt de la technologie SureSelect QXT par rapport à la technologie Haloplex notamment pour la qualité des séquences obtenues mais également pour la possibilité de détecter les CNVs, et d'autre part, de définir une liste de 48 à 63 gènes considérés comme plus particulièrement pertinents dans le cadre du diagnostic moléculaire des patients atteints de malformations des membres.

Le panel +50 contient :

- 1) Les vingt gènes déjà analysés au laboratoire auparavant par des techniques ciblées (*BHLHA9, BTRC, GDF5, HOXA13, HOXD13, IHH, LMX1B, NOG, PITX1, PTHLH, RBM8A, ROR2, SALL1, SALL4, SF3B4, TBX3, TBX4, TBX5, TP63* et la *ZRS*) ;
- 2) Neuf gènes, déjà décrits en pathologie humaine, qui se sont révélés être fréquemment mutés dans la cohorte rétrospective, puisque 24 patients sur les 243 analysés étaient porteurs d'un variant dans l'un d'eux : *BMPR1B, DLX5, FGFR1, GLI3, HDAC4, IRF6, NIPBL, RECQL4* et *WNT10B*;
- 3) Quatre gènes sélectionnés car jugés intéressants en termes de diagnostic différentiel : *FGF10, FGFR2* et *FGFR3*, impliqués dans le syndrome LADD, dont certains traits phénotypiques sont chevauchants avec ceux du syndrome Holt-Oram et *TRPS1*, responsable du syndrome tricho-rhinophalangien dont les premiers signes peuvent être une brachydactylie semblant isolée ;
- 4) Sept nouveaux gènes et séquences régulatrices récemment publiés, associés à des anomalies des membres chez l'Homme ou l'animal: *DVL1, DVL2* et *DVL3* (Danyel et al. 2018 ; Mansour et al. 2018), *DYNC1i1* (Tayebi et al. 2014), *EFTUD2* (Gordon et al. 2012), *PUF60* (El Chehadeh et al. 2016), et l'enhancer de *TBX5* (Nishimoto et al. 2015 ; Cunningham et al. 2018) ;

- 5) Au même titre que l'étude des duplications des gènes *BHLHA9*, *BTRC*, et de la ZRS, cinq autres gènes, impliqués dans de grandes délétions associées à des syndromes malformatifs, ont également été ajoutés : *FBXW4*, *LBX1* et *POLL* (Holder-Espinasse et al. 2019), *DLX6* et *SHFM1* (Birnbaum et al. 2012); ainsi que 3 séquences régulatrices, *BS1* (*enhancer* de *DLX5* et *DLX6*,(Birnbaum et al. 2012)), *ECR2* (*enhancer* de *BMP2*, Su et al. 2011) et *LARM* (*enhancer* de *LMX1B*, Haro et al. 2017) ;
- 6) Onze gènes impliqués dans des syndromes polymalformatifs comportant des malformations des membres : *ARHGAP31*, *DLL4*, *DOCK6*, *EOGT*, *FGF8*, *FGF9*, *GLI2*, *GJA1*, *NOTCH1*, *RBPJ* et *WNT3*. Compte tenu du caractère polymalformatif de ces pathologies, certains de ces gènes sont également étudiés dans d'autres laboratoires français experts dans des thématiques différentes.

Le nombre de gènes inclus dans ce nouveau panel a été délibérément restreint afin de permettre une analyse simple et rapide, facilement applicable en diagnostic. Notamment, nous n'avons pas inclus dans ce panel :

- Les gènes responsables de la Maladie de Fanconi et du syndrome de Blackfan Diamond, qui font partie des hypothèses diagnostiques en cas d'anomalie radiale, en raison d'une part de la grande hétérogénéité de ces deux pathologies, d'autre part des arguments biologiques (anémie etc.) et/ou cytogénétiques (fragilité chromosomique), permettant d'orienter vers ces diagnostics ;
- Certains gènes dans lesquels nous avons identifié des variants délétères au sein de notre série rétrospective : *IRF6*, car la polydactylie présente chez le patient, par ailleurs porteur d'un syndrome AEC typique nous semble une association fortuite et *TFAP2B*, car les discrètes anomalies des extrémités ne sont pas au premier plan du syndrome CHAR.

Trois versions de panels se sont succédées en 3 ans, avec, à chaque changement de version, l'ajout de cibles d'intérêt (V1 : 48 cibles, V2 : 52 cibles, V3 : 63 cibles). Chaque nouvelle version inclue les cibles des versions précédentes. La liste complète des cibles analysées dans ce panel est disponible en Annexe I (page 171).

6.ii- Cohorte prospective

Trois cents cinquante et un patients dont les prélèvements ont été adressés au laboratoire pour analyse moléculaire entre mars 2016 et février 2019, en raison de malformations des membres isolées (41,2%) ou syndromiques (58,8%) composent notre cohorte prospective. Parmi ces 351 cas index, 314 patients ont bénéficié d'un séquençage NGS de première intention tandis que 38 patients porteurs de pieds et/ou mains fendus isolées ont d'abord bénéficié d'une analyse quantitative des gènes *BHLHA9* et *BTRC* en raison de leur phénotype amenant à l'hypothèse d'une duplication de *BHLHA9* ou 10q24.32. Chez 10 d'entre eux, la qPCR a permis d'établir un diagnostic moléculaire (6 patients porteurs d'une dup*BHLHA9* et 4 porteurs d'une dup10q24.31). Parmi les 28 patients pour lesquels ces premières analyses s'étaient révélées négatives, nous n'avons pas poursuivi les investigations chez 16 patients présentant une main fendue isolée ne permettant pas de cibler un autre gène du panel. En revanche, une analyse NGS a été réalisée chez les 12 derniers patients.

Cette cohorte est constituée de patients pouvant être répartis selon les 7 groupes phénotypiques préalablement définis (Figures 40 et 41) :

- Anomalies radiales (n=100) : syndrome de Holt-Oram (n=34), syndrome de Okihiro (n=19), syndrome de Nager (n=8), syndromes liés aux anomalies du gène *RECQL4* (RAPADILINO, Baller-Gérold ou Rothmund-Thomson) (n=3), syndrome TAR (n=11), syndrome de Townes-Brocks (n=20) et non classables (n=5) ;
- Ectrodactylies (n=50) : main fendue isolée (SH) ou pied fendu isolé (SF) (n=24), pieds et mains fendus (SHFM) (n=4), pieds et mains fendus avec anomalie des os longs (SHFLD) (n=13) et syndrome d'ectrodactylie-dysplasie ectodermique-fente labiopalatine (EEC) (n=9) ;
- Brachydactylies (n=63) : Type A (n=11), Type B (n=5), Type C (n=9), Type E (n=19), syndrome de Robinow (n=2), syndrome Tricho-rhino-phalangien (n=9) et non classables (n=8) ;
- Polydactylies (n=51) : pré-axiales (n=20), post-axiales (n=14), pré/post-axiales (n=10), synpolydactylie (n=6) et non classables (n=1) ;

- Anomalies réductionnelles hors anomalie radiale et ectrodactylies mésoaxiales (n=42) : transversale (n=8), longitudinale (n=18), phocomélie/amélie (n=3), syndrome d'Adams-Oliver (n=9) et non classables (n=4) ;
- Anomalies de fusion (n=24) : syndactylies (n=15), synostoses multiples (n=9) ;
- Hypo/aplasie patellaire (n=21) : syndrome Nail-Patella (NPS) (n=18), syndrome coxo-podo-patellaire (SPS) (n=3).

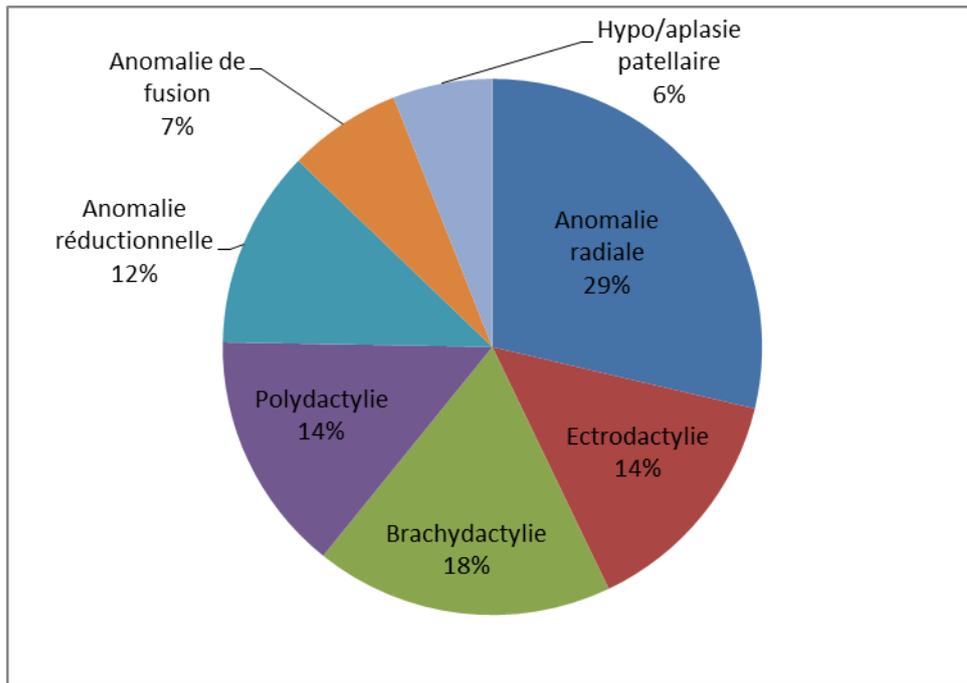


Figure 40 : Composition de la cohorte prospective selon les 7 grands groupes phénotypiques établis.

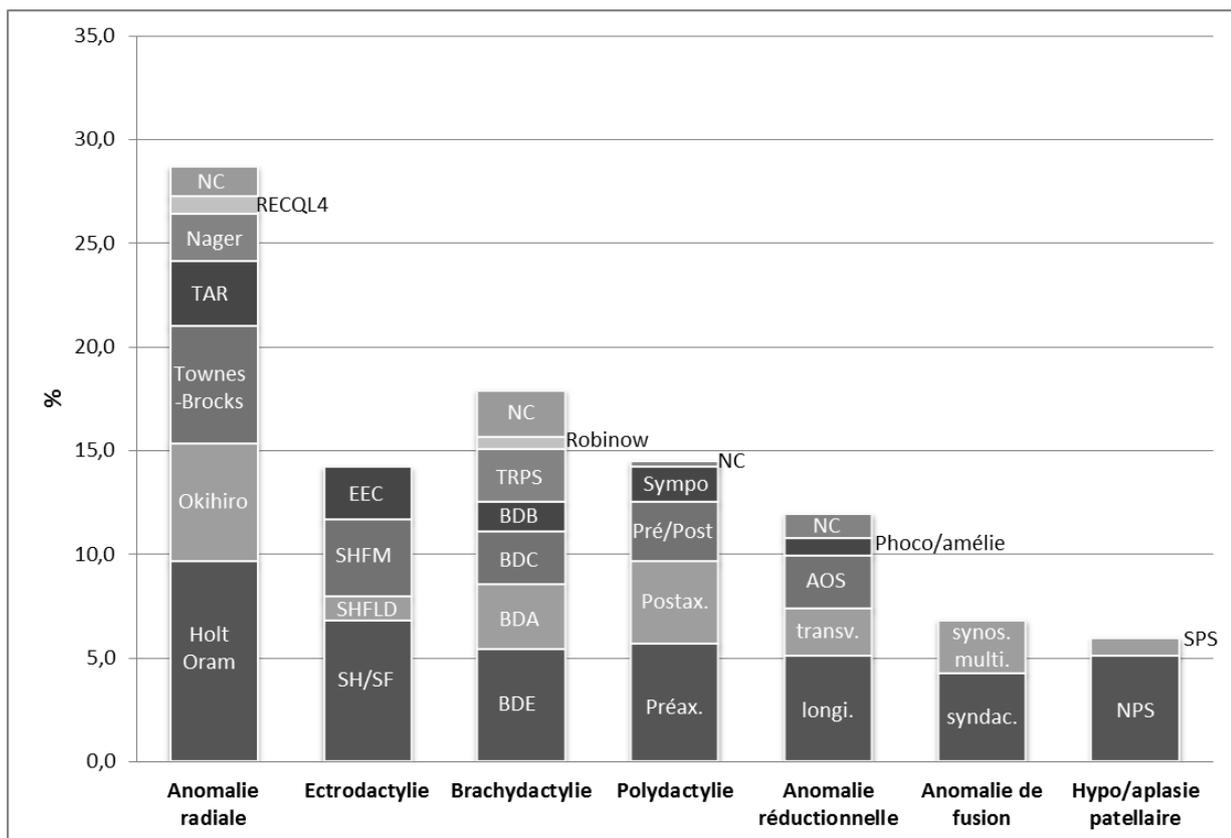


Figure 41 : Composition de la cohorte prospective selon les sous catégories phénotypiques établies. (NC : non classable ; Sympo : Sympolydactilie ; Postax. : post axiale ; Préax. : pré axiale ; AOS : Syndrome Adams Oliver ; transv. : transversale ; longi. : longitudinale ; synos. Multi. : synostose multiple ; syndac. : syndactylie)

6.iii- Performance du panel de routine

Le panel SureSelect +50, toutes versions confondues, a permis de générer des résultats de séquençage de qualité avec une couverture moyenne par patient de 937,9X. En moyenne, 98,9% des séquences cibles du panel étaient couvertes avec une profondeur de lecture \geq à 30X. En moyenne, pour toutes librairies confondues, seul 1,1% du design présentait une couverture inférieure à 30X. Les régions peu couvertes concernaient principalement les premiers exons ou les régions riches en CG de 5 gènes (*DOCK6*, *FGFR3*, *HOXA13*, *NOTCH1*, *PITX1*). La sensibilité et la spécificité de cette nouvelle technique nous ont permis, non seulement d'identifier des variants localisés dans des régions répétées, mais également d'obtenir moins d'artefacts dus au séquençage.

L'analyse qualitative de ce panel montre une bien meilleure couverture de nos 63 cibles par rapport à l'utilisation du WES (Figure 42). En effet, le WES permet d'obtenir une couverture à 30X de plus de 98% pour seulement 35 des 63 cibles (55,6%) contre 62 *via* le séquençage du panel +50 (98,4%).

Enfin, l'outil bioinformatique de détection des CNVs, développé précédemment grâce à l'étude du panel +300, a été adapté à notre nouveau panel et validé sur plusieurs témoins positifs.

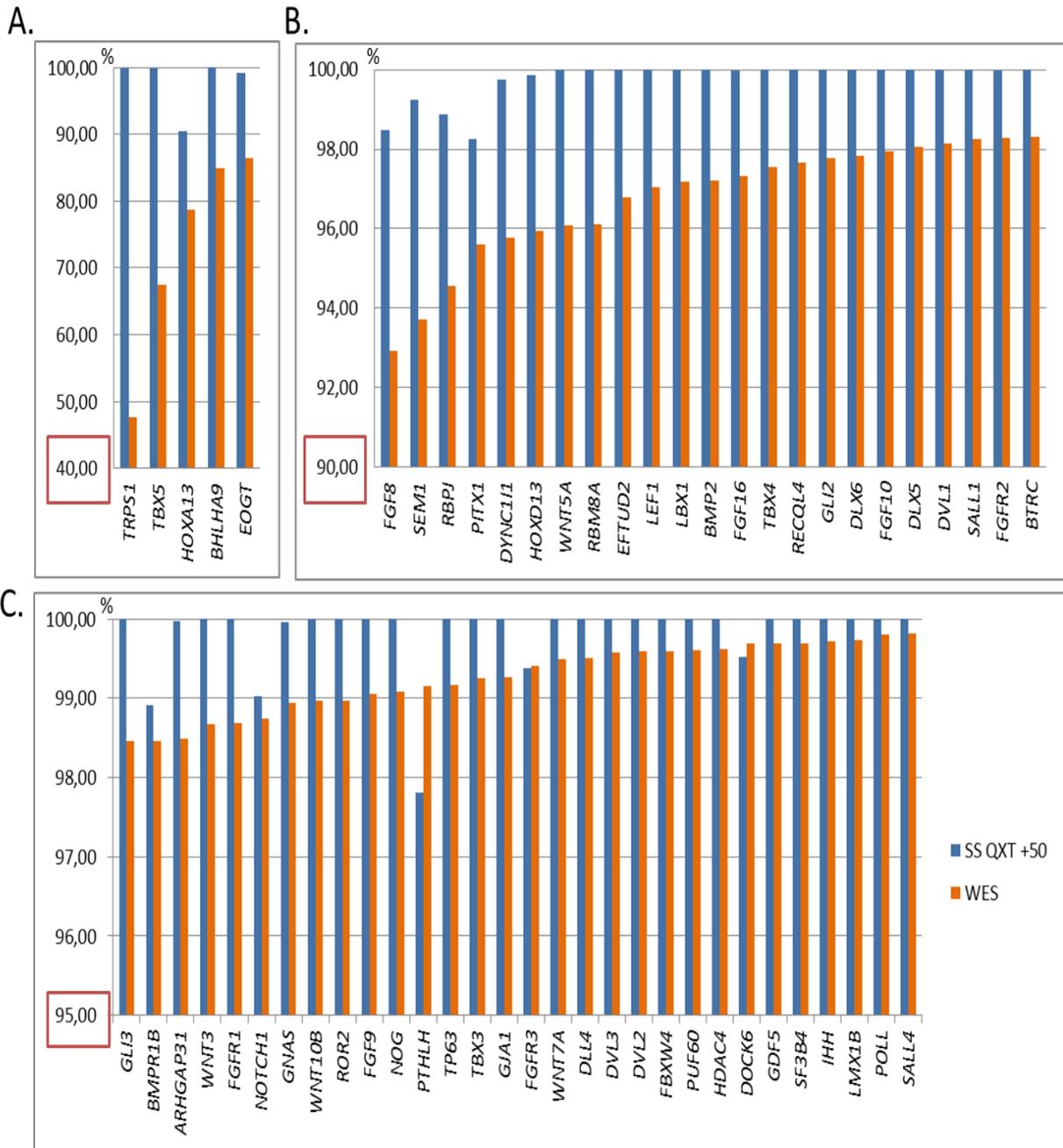


Figure 42 : Etude de la performance du séquençage des cibles du panel diagnostique +50 V3 via la technologie SureSelect QXT panel versus le WES. La couverture $\geq 30X$ des différentes cibles est exprimée en pourcentage : A-cibles couvertes en exome entre 40 et 80%, B- entre 92 et 98,2%, C- au delà de 98,2%.

6.iv- Distribution et interprétation des variants de la cohorte prospective

L'analyse des variants a été réalisée pour chacun des 351 patients : 39 602 variants ont été détectés, avec en moyenne 83 variants par patient pour la version 1 du design, 104 pour la V2 et 133 pour la V3. Après application des différents filtres précédemment décrits, seuls 160 variants pour 147 patients (41,9%) ont été retenus dans 31 gènes du panel. Parmi ces 160 variants, 70 n'ont jamais été décrits dans la littérature, 134 sont des variants nucléotidiques (SNVs, 83,75%) et 26 sont des variations en copies de nombre (CNVs, 16,25%). Ces variants sont décrits, ainsi que leurs conséquences protéiques, dans le tableau 12. Les gènes ou éléments régulateurs les plus fréquemment représentés sont : *LMX1B* (18 patients), *GLI3* (16), *TBX5* (12), *TP63* (10), *RBM8A* (10), *GDF5* (9), *TRPS1* (7), *BHLHA9* (6), *IHH* (6), *SALL1* (6), *BTRC* (dup10q24) (4), *HOXD13* (4), *SALL4* (4), *SF3B4* (4), *DOCK6* (3), *NOG* (3), *TBX4* (3) et *ZRS* (3).

Cent trente-huit variants (86,25%) chez 130 patients, 112 SNVs et 26 CNVs, ont pu être classés comme pathogènes (n=104) ou probablement pathogènes (n= 34). Ceci nous a permis d'établir le diagnostic moléculaire pour 123 patients permettant ainsi d'obtenir un rendement diagnostique de 35% (123/351) (Tableau 16).

Vingt-deux variants identifiés chez 22 patients ont été classés de signification inconnue (C3). Aucun d'entre eux n'avait été décrit dans la littérature. Dix-huit sont considérés comme très fortement suspects de par leur localisation dans le gène suspecté et la concordance avec le phénotype du patient. Treize sont des faux sens prédits délétères par divers logiciels de prédiction (Polyphen, Mutation Taster, SIFT) et présentent un CADD score supérieur à 20. Trois sont localisés dans l'élément régulateur de *SHH* (*ZRS*), quatre dans des parties non codantes de *RBM8A* et neuf dans des domaines protéiques indispensables à la fonction du gène (deux dans le domaine doigt de zinc de *GLI3*, un dans le domaine histone deacetylase de *HDAC4*, trois dans le domaine *HedgeHog* de *IHH*, un dans le domaine LIM de *LMX1B*, un dans le domaine *EGFlike* de *NOTCH1* et un dans le domaine Tbox de *TBX4*) (Tableau 17).

Tableau 16 : Liste des patients de la cohorte prospective pour lesquels un diagnostic moléculaire a pu être établi. (O : oui ; N : non ; HTZ : hétérozygote ; HTZ comp. : Hétérozygote composite ; HMZ : homozygote)

Patient	Groupe Phénotypique	Sous-groupe phénotypique	Gène / élément régulateur	Zygotie	Type de variant	Changement cDNA/gDNA	Changement protéique	Classe ACMG	Références (PMID#)
qPCR002	Ectrodactylie	SH/SF	<i>BHLHA9</i>	HTZ	CNV	g.(?_1173858)_(1174565_?)dup	p.(?)	5	23202277
qPCR012	Ectrodactylie	SHFLD	<i>BHLHA9</i>	HTZ	CNV	g.(?_1173858)_(1174565_?)dup	p.(?)	5	23202277
qPCR028	Ectrodactylie	SHFLD	<i>BHLHA9</i>	HTZ	CNV	g.(?_1173858)_(1174565_?)dup	p.(?)	5	23202277
qPCR037	Ectrodactylie	SH/SF	<i>BHLHA9</i>	HTZ	CNV	g.(?_1173858)_(1174565_?)dup	p.(?)	5	23202277
qPCR039	Ectrodactylie	SH/SF	<i>BHLHA9</i>	HTZ	CNV	g.(?_1173858)_(1174565_?)dup	p.(?)	5	23202277
qPCR042	Ectrodactylie	SH/SF	<i>BHLHA9</i>	HTZ	CNV	g.(?_1173858)_(1174565_?)dup	p.(?)	5	23202277
qPCR009	Ectrodactylie	SHFM	<i>BTRC</i>	HTZ	CNV	g.(?_103113825)_(103317070_?)dup	p.(?)	5	30622331
qPCR015	Ectrodactylie	SHFM	<i>BTRC</i>	HTZ	CNV	g.(?_103113825)_(103317070_?)dup	p.(?)	5	30622331
qPCR020	Ectrodactylie	SHFM	<i>BTRC</i>	HTZ	CNV	g.(?_103113825)_(103317070_?)dup	p.(?)	5	30622331
qPCR023	Ectrodactylie	SHFM	<i>BTRC</i>	HTZ	CNV	g.(?_103113825)_(103317070_?)dup	p.(?)	5	30622331
NGS006	Anomalie Réductionnelle	Adams Oliver	<i>DOCK6</i>	HMZ	SNV	c.[3190_3191delCT]	p.(Leu1064Valfs*60)	5	25091416
NGS009	Anomalie Réductionnelle	Adams Oliver	<i>DOCK6</i>	HTZ comp.	SNV	c.[4849G>A]	p.[(Ala1617Thr)]	4	Nouveau
			<i>DOCK6</i>	HTZ comp.	SNV	c.[1362_1365del]	p.[(Thr455Serfs*24)]	5	21820096
NGS014	Anomalie Réductionnelle	Adams Oliver	<i>DOCK6</i>	HMZ	SNV	c.[1833-1G>T]	p.[(?)]	5	Nouveau
NGS272	Brachydactylie	Robinow	<i>DVL1</i>	HTZ	SNV	c.1640-1G>A	p.(?)	5	Nouveau
NGS273	Brachydactylie	Robinow	<i>DVL1</i>	HTZ	SNV	c.1505delA	p.(His502Profs*147)	5	nouveau
NGS027	Brachydactylie	BDA	<i>ECR2 (BMP2)</i>	HTZ	CNV	g.(?_6864065)_(6865794_?)dup	p.(?)	4	21357617
NGS050	Brachydactylie	BDC	<i>ECR2 (BMP2)</i>	HTZ	CNV	g.(?_6861756)_(6864880_?)dup	p.(?)	4	21357617
NGS283	Anomalie de Fusion	Synostose multiple	<i>FGF9</i>	HTZ	SNV	c.184A>G	p.(Arg62Gly)	4	28730625
NGS228	Anomalie Radiale	Okhiro	<i>FGFR2</i>	HTZ	SNV	c.1942G>A	p.(Ala648Thr)	4	16501574
NGS282	Anomalie de Fusion	Syndactylie	<i>FGFR2</i>	HTZ	SNV	c.755C>G	p.(Ser252Trp)	4	7719344

NGS049	Brachydactylie	BDC	<i>GDF5</i>	HTZ	SNV	c.989_997delinsGCCGCGCC	p.(Asp330Glyfs*123)	5	Nouveau
NGS052	Brachydactylie	BDC	<i>GDF5</i>	HTZ	SNV	c.498dupC	p.(Ile167Hisfs*18)	5	15173244
NGS054	Brachydactylie	BDC	<i>GDF5</i>	HTZ	SNV	c.549delT	p.(Asp184Thrfs*9)	5	Nouveau
NGS056	Brachydactylie	BDC	<i>GDF5</i>	HTZ	SNV	c.1471G>T	p.(Glu491*)	5	16892395
NGS057	Brachydactylie	BDC	<i>GDF5</i>	HTZ	SNV	c.157dupC	p.(Leu53ProfsTer41)	5	12357473
NGS060	Brachydactylie	BDC	<i>GDF5</i>	HTZ	SNV	c.1108dupT	p.(Tyr370Leufs*2)	5	Nouveau
NGS063	Polydactylie	Croisée	<i>GLI3</i>	HTZ	SNV	c.2867delG	p.(Arg956Profs*47)	5	Nouveau
NGS081	Brachydactylie	Non classable	<i>GLI3</i>	HTZ	SNV	c.2603C>A	p.(Ser868*)	5	Nouveau
NGS234	Polydactylie	Croisée	<i>GLI3</i>	HTZ	SNV	c.444C>A	p.(Tyr148*)	5	24736735
NGS235	Polydactylie	Croisée	<i>GLI3</i>	HTZ	SNV	c.1798delA	p.(Thr600Argfs*29)	5	Nouveau
NGS238	Polydactylie	Croisée	<i>GLI3</i>	HTZ	SNV	c.1999C>T	p.(Arg667*)	5	25525159
NGS240	Polydactylie	Croisée	<i>GLI3</i>	HTZ	SNV	c.919C>T	p.(Gln307*)	5	Nouveau
NGS243	Polydactylie	Croisée	<i>GLI3</i>	HTZ	SNV	c.1698C>G	p.(His566Gln)	4	Nouveau
NGS246	Polydactylie	Postaxiale	<i>GLI3</i>	HTZ	SNV	c.2211delT	p.(Ser737Argfs*2)	5	Nouveau
NGS251	Polydactylie	Postaxiale	<i>GLI3</i>	HTZ	SNV	c.1622C>T	p.(Thr541Met)	4	Nouveau
NGS253	Polydactylie	Croisée	<i>GLI3</i>	HTZ	SNV	c.1274_1275delGC	p.(Ser425Asnfs*3)	5	Nouveau
NGS257	Anomalie de Fusion	Syndactylie	<i>GLI3</i>	HTZ	SNV	c.1115C>A	p.(Ser372*)	5	Nouveau
NGS260	Polydactylie	Préaxiale	<i>GLI3</i>	HTZ	SNV	c.1622C>T	p.(Thr541Met)	4	Nouveau
NGS262	Polydactylie	Préaxiale	<i>GLI3</i>	HTZ	SNV	c.1687_1694del	p.(Leu563Thrfs*14)	5	Nouveau
NGS315	Polydactylie	Postaxiale	<i>GLI3</i>	HTZ	SNV	c.2799C>A	p.(Tyr933*)	5	15739154
NGS070	Brachydactylie	BDE	<i>HDAC4</i>	HTZ	SNV	c.339+1G>A	p.(?)	5	Nouveau
NGS039	Anomalie de Fusion	BDA	<i>HOXD13</i>	HTZ	SNV	c.917G>A	p.(Arg306Gln)	4	22374128
NGS075	Polydactylie	Synpolydactylie	<i>HOXD13</i>	HTZ	SNV	c.186_212dup	p.(Ala65_Ala71dup)	4	Nouveau
NGS076	Polydactylie	Synpolydactylie	<i>HOXD13</i>	HTZ	SNV	c.186_212dup	p.(Ala63_Ala71dup)	4	Nouveau
NGS184	Polydactylie	Synpolydactylie	<i>HOXD13</i>	HTZ	SNV	c.186_212dup	p.(Ala63_Ala71dup)	4	Nouveau

NGS020	Brachydactylie	BDA	<i>IHH</i>	HTZ	SNV	c.391G>A	p.(Glu131Lys)	5	11455389
NGS026	Brachydactylie	BDA	<i>IHH</i>	HTZ	SNV	c.298G>A	p.(Asp100Asn)	4	12384778
NGS029	Brachydactylie	BDA	<i>IHH</i>	HTZ	SNV	c.391G>A	p.(Glu131Lys)	5	11455389
NGS153	Hypo/aplasie rotule	Nail-Patella	<i>LMX1B</i>	HTZ	SNV	c.782G>C	p.(Arg261Pro)	4	22574102
NGS154	Hypo/aplasie rotule	Nail-Patella	<i>LMX1B</i>	HTZ	SNV	c.755T>C	p.(Leu252Pro)	5	10571942
NGS157	Hypo/aplasie rotule	Nail-Patella	<i>LMX1B</i>	HTZ	SNV	c.317A>G	p.(Asp106Gly)	4	10571942
NGS161	Hypo/aplasie rotule	Nail-Patella	<i>LMX1B</i>	HTZ	SNV	c.175T>C	p.(Cys59Arg)	5	10571942
NGS163	Hypo/aplasie rotule	Nail-Patella	<i>LMX1B</i>	HTZ	SNV	c.217G>T	p.(Glu73*)	5	Nouveau
NGS167	Hypo/aplasie rotule	Nail-Patella	<i>LMX1B</i>	HTZ	SNV	c.668G>A	p.(Arg233Gln)	5	Nouveau
NGS169	Hypo/aplasie rotule	Nail-Patella	<i>LMX1B</i>	HTZ	SNV	c.661C>T	p.(Arg221*)	5	9590287
NGS170	Hypo/aplasie rotule	Nail-Patella	<i>LMX1B</i>	HTZ	SNV	c.741+1G>A	p.(?)	5	9837817
NGS173	Hypo/aplasie rotule	Nail-Patella	<i>LMX1B</i>	HTZ	SNV	c.736C>T	p.(Arg246*)	5	9837817
NGS174	Hypo/aplasie rotule	Nail-Patella	<i>LMX1B</i>	HTZ	SNV	c.755T>C	p.(Leu252Pro)	4	10571942
NGS175	Hypo/aplasie rotule	Nail-Patella	<i>LMX1B</i>	HTZ	SNV	c.139+2dupT	p.(?)	4	Nouveau
NGS176	Hypo/aplasie rotule	Nail-Patella	<i>LMX1B</i>	HTZ	SNV	c.661C>T	p.(Arg221*)	5	9590287
NGS182	Hypo/aplasie rotule	Nail-Patella	<i>LMX1B</i>	HTZ	SNV	c.661C>T	p.(Arg221*)	5	9590287
NGS190	Hypo/aplasie rotule	Nail-Patella	<i>LMX1B</i>	HTZ	SNV	c.668G>A	p.(Arg223Gln)	5	Nouveau
NGS194	Hypo/aplasie rotule	Nail-Patella	<i>LMX1B</i>	HTZ	SNV	c.668G>A	p.(Arg223Gln)	5	Nouveau
NGS199	Hypo/aplasie rotule	Nail-Patella	<i>LMX1B</i>	HTZ	SNV	c.303_304delGT	p.(Tyr102Leufs*45)	5	9618165

NGS214	Hypo/aplasie rotule	Nail-Patella	<i>LMX1B</i>	HTZ	SNV	c.302_303delTG	p.(Tyr102LeufsTer45)	5	Nouveau
NGS215	Hypo/aplasie rotule	Nail-Patella	<i>LMX1B</i>	HTZ	SNV	c.220T>C	p.(Ser74Pro)	5	Nouveau
NGS287	Anomalie de Fusion	Synostose multiple	<i>NOG</i>	HTZ	SNV	c.253delG	p.(Glu85Argfs*39)	5	Nouveau
NGS291	Anomalie de Fusion	Synostose multiple	<i>NOG</i>	HTZ	CNV	c.(?_1)_(699_?)del	p.(?)	5	Nouveau
NGS296	Anomalie de Fusion	Synostose multiple	<i>NOG</i>	HTZ	SNV	c.613T>G	p.(Trp205Gly)	4	Nouveau
NGS003	Anomalie Réductionnelle	Adams Oliver	<i>NOTCH1</i>	HTZ	SNV	c.1941dupC	p.(Ser648Glnfs*20)	5	Nouveau
NGS226	Anomalie Radiale	Okhiro	<i>PUF60</i>	HTZ	SNV	c.407_410delTCTA	p.(Ile136Thrfs*31)	5	Nouveau
NGS252	Anomalie Radiale	TAR	<i>RBM8A</i>	Hémizygote	SNV	c.[-21G>A]	p.(?)	4	22366785
			<i>RBM8A</i>	Hémizygote	CNV	c.(?_206-58)_(479+40_?)del	p.(?)	5	17236129
NGS256	Anomalie Radiale	TAR	<i>RBM8A</i>	Hémizygote	SNV	c.[-21G>A]	p.(?)	4	22366785
			<i>RBM8A</i>	Hémizygote	CNV	c.(?_206-58)_(479+40_?)del	p.(?)	5	17236129
NGS297	Anomalie Radiale	TAR	<i>RBM8A</i>	Hémizygote	SNV	c.[-21G>A]	p.(?)	4	22366785
			<i>RBM8A</i>	Hémizygote	CNV	c.(?_206-58)_(479+40_?)del	p.(?)	5	17236129
NGS300	Anomalie Radiale	TAR	<i>RBM8A</i>	Hémizygote	SNV	c.[-21G>A]	p.(?)	4	22366785
			<i>RBM8A</i>	Hémizygote	CNV	c.(?_206-58)_(479+40_?)del	p.(?)	5	17236129
NGS271	Anomalie Radiale	RECQL4	<i>RECQL4</i>	HTZ comp.	SNV	c.[3_4delinsTT]	p.(?)	5	Nouveau
			<i>RECQL4</i>	HTZ comp.	SNV	c.[2590C>T]	p.(Gln864*)	5	24635570
NGS043	Brachydactylie	BDB	<i>ROR2</i>	HTZ	SNV	c.1394_1395delTC	p.(Leu465Glnfs*59)	5	Nouveau
NGS047	Brachydactylie	BDB	<i>ROR2</i>	HTZ	SNV	c.1397_1398delAA	p.(Lys466Argfs*58)	5	Nouveau
NGS302	Anomalie Radiale	Townes-Brocks	<i>SALL1</i>	HTZ	SNV	c.1148delT	p.(Leu383Tyrfs*2)	5	9973281
NGS304	Anomalie Radiale	Townes-Brocks	<i>SALL1</i>	HTZ	SNV	c.3034delT	p.(Cys1012Valfs*33)	5	Nouveau
NGS305	Anomalie Radiale	Townes-Brocks	<i>SALL1</i>	HTZ	SNV	c.3168delG	p.(Pro1057His*19)	5	Nouveau

NGS307	Anomalie Radiale	Townes-Brocks	<i>SALL1</i>	HTZ	SNV	c.2999delA	p.(Asn1000Thrfs*45)	5	Nouveau
NGS314	Anomalie Radiale	Townes-Brocks	<i>SALL1</i>	HTZ	SNV	c.902dupA	p.(Ser302Glufs*10)	5	Nouveau
NGS320	Anomalie Radiale	Townes-Brocks	<i>SALL1</i>	HTZ	SNV	c.824T>G	p.(Leu275*)	5	29110636
NGS217	Anomalie Radiale	Okihiro	<i>SALL4</i>	HTZ	SNV	c.1242_1245del	p.(Cys415Valfs*20)	5	Nouveau
NGS220	Anomalie Radiale	Okihiro	<i>SALL4</i>	HTZ	CNV	c.(130+1_131-1)_(*1548_?)del	p.(?)	5	20301547
NGS223	Anomalie Radiale	Okihiro	<i>SALL4</i>	HTZ	SNV	c.1717C>T	p.(Arg573*)	5	Nouveau
NGS301	Anomalie Radiale	Okihiro	<i>SALL4</i>	HTZ	CNV	c.(?_2743)_(3162_?)del	p.(?)	4	20301547
NGS143	Anomalie Radiale	Nager	<i>SF3B4</i>	HTZ	SNV	c.1A>T	p.(Met1?)	5	Nouveau
NGS144	Anomalie Radiale	Nager	<i>SF3B4</i>	HTZ	SNV	c.827dupC	p.(Ser277Ilefs*209)	5	22541558
NGS151	Anomalie Radiale	Nager	<i>SF3B4</i>	HTZ	SNV	c.1147dupC	p.(His383Profs*103)	5	22541558
NGS324	Anomalie Radiale	Nager	<i>SF3B4</i>	HTZ	CNV	c.(?_69)_(1088-36_?)del	p.(?)	5	26679067
NGS249	Polydactylie	Préaxiale	<i>TBX3</i>	HTZ	SNV	c.185dupA	p.(Pro63Alafs*48)	5	Nouveau
NGS198	Hypo/aplasie rotule	SPS	<i>TBX4</i>	HTZ	SNV	c.781C>T	p.(Arg261*)	5	Nouveau
NGS281	Hypo/aplasie rotule	SPS	<i>TBX4</i>	HTZ	SNV	c.781C>T	p.(Arg261*)	5	Nouveau
NGS117	Anomalie Radiale	Holt-Oram	<i>TBX5</i>	HTZ	SNV	c.709C>T	p.(Arg237Trp)	5	10077612
NGS120	Anomalie Radiale	Holt-Oram	<i>TBX5</i>	HTZ	SNV	c.668C>T	p.(Thr223Met)	5	12789647
NGS123	Anomalie Radiale	Holt-Oram	<i>TBX5</i>	HTZ	SNV	c.436delG	p.(Ala146Argfs*4)	5	Nouveau
NGS124	Anomalie Radiale	Holt-Oram	<i>TBX5</i>	HTZ	SNV	c.342C>A	p.(Tyr114*)	5	16183809

NGS129	Anomalie Radiale	Holt-Oram	<i>TBX5</i>	HTZ	SNV	c.1319delC	p.(Ala440Valfs*142)	5	Nouveau
NGS131	Anomalie Radiale	Holt-Oram	<i>TBX5</i>	HTZ	SNV	c.313_325dup	p.(Ala109Glyfs*15)	5	Nouveau
NGS132	Anomalie Radiale	Holt-Oram	<i>TBX5</i>	HTZ	SNV	c.798delA	p.(Val267Trpfs*127)	5	12789647
NGS133	Anomalie Radiale	Holt-Oram	<i>TBX5</i>	HTZ	SNV	c.(755+1_756-1)_(*1602-?)del	p.(?)	4	Nouveau
NGS135	Anomalie Radiale	Holt-Oram	<i>TBX5</i>	HTZ	SNV	c.593dup	p.(Asn198Lysfs*11)	5	8988164
NGS136	Anomalie Radiale	Holt-Oram	<i>TBX5</i>	HTZ	SNV	c.1011dup	p.(Tyr338Leufs*2)	5	Nouveau
NGS142	Anomalie Radiale	Holt-Oram	<i>TBX5</i>	HTZ	SNV	c.710G>A	p.(Arg237Gln)	5	8988165
NGS089	Ectrodactylie	EEC	<i>TP63</i>	HTZ	SNV	c.953G>A	p.(Arg318His)	5	10535733
NGS090	Ectrodactylie	EEC	<i>TP63</i>	HTZ	SNV	c.727C>T	p.(Arg243Trp)	5	10535733
NGS097	Ectrodactylie	EEC	<i>TP63</i>	HTZ	SNV	c.692A>G	p.(Tyr231Cys)	4	12037717
NGS109	Ectrodactylie	EEC	<i>TP63</i>	HTZ	SNV	c.727C>T	p.(Arg243Trp)	4	10535733
NGS112	Ectrodactylie	EEC	<i>TP63</i>	HTZ	SNV	c.955C>T	p.(Arg319Cys)	5	10839977
NGS113	Ectrodactylie	EEC	<i>TP63</i>	HTZ	SNV	c.1049G>A	p.(Arg350Lys)	4	Nouveau
NGS114	Ectrodactylie	EEC	<i>TP63</i>	HTZ	SNV	c.727C>T	p.(Arg243Trp)	5	10535733
NGS116	Ectrodactylie	EEC	<i>TP63</i>	HTZ	SNV	c.953G>A	p.(Arg318His)	4	10535733
NGS274	Ectrodactylie	SHFM	<i>TP63</i>	HTZ	CNV	c.(?_1653-65)_1873_?)del	p.(?)	5	24163146
NGS279	Ectrodactylie	SHFM	<i>TP63</i>	HTZ	SNV	c.692A>G	p.(Tyr231Cys)	4	12037717
NGS079	Brachydactylie	BDE	<i>TRPS1</i>	HTZ	SNV	c.2720T>A	p.(Val907Asp)	4	11112658
NGS091	Brachydactylie	Tricho-Rhino	<i>TRPS1</i>	HTZ	SNV	c.2761C>G	p.(Arg921Gly)	5	25792522
NGS093	Brachydactylie	Tricho-Rhino	<i>TRPS1</i>	HTZ	SNV	c.2789G>C	p.(Cys930Ser)	4	Nouveau
NGS195	Brachydactylie	Tricho-Rhino	<i>TRPS1</i>	HTZ	SNV	c.2705_2706dupGT	p.(Arg903Valfs*12)	5	Nouveau
NGS321	Brachydactylie	Tricho-Rhino	<i>TRPS1</i>	HTZ	SNV	c.2894G>A	p.(Arg965His)	5	14560312
NGS323	Brachydactylie	Tricho-Rhino	<i>TRPS1</i>	HTZ	SNV	c.2894G>A	p.(Arg965His)	5	14560312
NGS325	Brachydactylie	Tricho-Rhino	<i>TRPS1</i>	HTZ	SNV	c.2732A>G	p.(Asn911Ser)	4	25792522

Tableau 17: Liste des patients de la cohorte prospective présentant un variant d'intérêt mais dont le diagnostic moléculaire n'a pu être établi de façon certaine. (HTZ : hétérozygote ; HÉM : hémizyote ; HTZ comp : Hétérozygote composite ; ND : non déterminé)

Patient	Groupe Phénotypique	Sous-groupe phénotypique	Gène / élément régulateur	Zygotie	Type de variant	Changement cDNA/gDNA	Changement protéique	Classe ACMG	Score CADD	Prédiction (logiciels)	Conservation interespèces	Domaine protéique	Ségrégation familiale	Remarque
NGS086	Anomalie de Fusion	Syndactylie	<i>DLL4</i>	HTZ	SNV	c.373C>T	p.(Pro125Ser)	3	22	Délétère (1/3)	Très conservé	/	ND	
NGS084	Brachydactylie	BDC	<i>GDF5</i>	HTZ	SNV	c.631G>A	p.(Asp211Asn) ou p.(?)	3	ND	Changement prédit au site donneur 1 pbs en aval probable	/	/	ND	
NGS231	Brachydactylie	BDC	<i>GDF5</i>	HTZ	SNV	c.1068T>A	p.(Asn356Lys)	3	19,42	Délétère (1/3)	Très conservé	/	ND	
NGS241	AN. Fusion	Synostose multiple	<i>GDF5</i>	HTZ	SNV	c.1118T>C	p.(Leu373Pro)	3	23,5	Délétère (1/3)	Très conservé	/	ND	
NGS055	Polydactylie	Postaxiale	<i>GLI2</i>	HTZ	SNV	c.4699G>A	p.(Asp1567Asn)	3	27,9	Délétère (3/3)	Très conservé	/	Paternel sympto	
NGS046	Polydactylie	Préaxiale	<i>GLI3</i>	HTZ	SNV	c.1784A>G	p.(Lys595Arg)	3	26,2	Délétère (3/3)	Très conservé	Zinc Finger	ND	
NGS216	AN. Fusion	Syndactylie	<i>GLI3</i>	HTZ	SNV	c.1663A>G	p.(Lys555Glu)	3	31	Délétère (3/3)	Très conservé	Zinc Finger	ND	
NGS071	Brachydactylie	BDE	<i>HDAC4</i>	HTZ	SNV	c.2174C>T	p.(Thr725Met)	3	27,2	Délétère (3/3)	Très conservé	Histone deacetylase	ND	
NGS118	Brachydactylie	BDE	<i>IHH</i>	HTZ	SNV	c.228_229delinsAA	p.(Arg77Ser)	3	22,3	Délétère (3/3)	Très conservé	HedgeHog	ND	
NGS229	Brachydactylie	BDA	<i>IHH</i>	HTZ	SNV	c.503G>C	p.(Arg168Pro)	3	34	Délétère (3/3)	Très conservé	HedgeHog	ND	
NGS267	Brachydactylie	BDA	<i>IHH</i>	HTZ	SNV	c.555C>A	p.(His185Gln)	3	24	Délétère (3/3)	Très conservé	HedgeHog	Paternel sympto	
NGS153	Hypo/aplasie rotule	Nail Patella	<i>LMX1B</i>	HTZ	SNV	c.443G>A	p.(Arg148Gln)	3	23,7	Délétère (3/3)	Très conservé	Zinc Finger LIM-type	ND	
NGS178	AN. Réductionnelle	Adams Oliver	<i>NOTCH1</i>	HTZ	SNV	c.775G>A	p.(Asp259Asn)	3	23,3	Délétère (3/3)	Très conservé	EGF like domain	<i>De novo</i>	
NGS101	AN. Radiale	TAR	<i>RBM8A</i>	HTZ	CNV	c.(?_206-58)_(479+40_?)del	p.(?)	5	ND	/	/	/	ND	Syndrome transmis sur un mode autosomique récessif: second évènement en trans non identifié
NGS150	AN. Radiale	TAR	<i>RBM8A</i>	HÉM	CNV	c.(?_206-58)_(479+40_?)del	p.(?)	5	ND	/	/	/	Paternel asympto	
			<i>RBM8A</i>	HÉM	SNV	c.[*6C>G]	p.(?)	3	ND	L'effet ne peut être prédit	/	/	Maternel asympto	

NGS208	AN. Radiale	TAR	<i>RBM8A</i>	HéM	CNV	c.(?_206-58)_(479+40_?)del	p.(?)	5	ND	/	/	/	Maternel asympto	
			<i>RBM8A</i>	HéM	SNV	c.[*6C>G]	p.(?)	3	ND	L'effet ne peut être prédit	/	/	/	Paternel asympto
NGS212	AN. Radiale	TAR	<i>RBM8A</i>	HéM	CNV	c.(?_206-58)_(479+40_?)del	p.(?)	5	ND	/	/	/	Maternel asympto	
			<i>RBM8A</i>	HéM	SNV	c.[*6C>G]	p.(?)	3	ND	L'effet ne peut être prédit	/	/	/	Paternel asympto
NGS263	AN. Radiale	TAR	<i>RBM8A</i>	HTZ comp.	SNV	c.[-21G>A]	p.(?)	4	ND	/	/	/	Paternel asympto	
			<i>RBM8A</i>	HTZ comp.	SNV	c.[205+3_205+6del]	p.(?)	3	ND	Saut exon 3 possible	/	/	/	Maternel asympto
NGS277	AN. Radiale	TAR	<i>RBM8A</i>	HTZ	CNV	c.(?_206-58)_(479+40_?)del	p.(?)	5	ND	/	/	/	ND	Syndrome transmis sur un mode autosomique récessif: second évènement en trans non identifié
NGS100	Hypo/aplasie rotule	SPS	<i>TBX4</i>	HTZ	SNV	c.401G>C	p.(Trp134Ser)	3	35	Délétère (2/3)	Très conservé	Tbox	ND	
NGS319	AN. Radiale	Holt-Oram	<i>TBX5</i>	HTZ	SNV	c.1381G>A	p.(Val461Met)	3	20,8	Délétère (1/3)	Très conservé	/	Maternel sympto	
NGS015	Polydactylie	Préaxiale	<i>ZRS</i>	HTZ	SNV	c.423+4841C>G	p.(?)	3	ND	/	/	/	ND	
NGS072	Polydactylie	Préaxiale	<i>ZRS</i>	HTZ	SNV	c.423+5020C>G	p.(?)	3	ND	/	/	/	ND	
NGS275	Polydactylie	Préaxiale	<i>ZRS</i>	HTZ	SNV	c.423+5087G>A	p.(?)	3	ND	/	/	/	ND	

Ainsi, nous n'avons pas pu confirmer le diagnostic moléculaire chez 228 patients (64,9%), 204 n'ont pas de variant identifié, 17 ont un variant de classe 3 et 7 n'ont qu'un seul variant pathogène ou probablement pathogène identifié dans des gènes dont les anomalies sont responsables de pathologies transmises sur un mode autosomique récessif.

La répartition des gènes mutés selon les 7 groupes et les sous catégories phénotypiques est disponible en tableau 18. Pour 4 de ces groupes (anomalie radiale, ectrodactylie, brachydactylie, polydactylie) le pourcentage de patients présentant un variant de classe 3, 4 ou 5 dans un gène en lien avec la pathologie qu'il présente dépasse 40%. Ce rendement atteint 100% pour les patients atteints d'hypo ou d'aplasie de la rotule.

Au sein des sous-groupes, nous observons des rendements diagnostiques extrêmement hétérogènes.

Parmi le groupe des anomalies radiales nous notons un rendement d'au moins 30% pour les sous-groupes suivants : syndromes Holt Oram (32,4%), Okihiro (30%), Townes-Brocks (35%) et associés à *RECQL4* (33,3%). Pour les patients présentant un syndrome TAR, le rendement diagnostique initial était de 36,4% mais atteint désormais 73% suite aux résultats des études fonctionnelles menées au sein de l'équipe et qui démontrent la pathogénicité des variants c.(205+3_205+6del) et c.*6, localisés respectivement dans l'intron 3 et l'UTR de *RBM8A* (Master 2 Recherche de Simon BouSSION, manuscrit en cours de rédaction). Enfin, le sous-groupe des patients porteurs d'un syndrome de Nager, dont le phénotype est très caractéristique, montre un très bon rendement diagnostique de 50%.

Au sein du groupe « ectrodactylie », deux sous-groupes ressortent. Il s'agit des pieds ou mains fendus (SH/SF) dont le rendement diagnostique n'est que de 16,7% contrairement au syndrome EEC qui lui atteint un excellent rendement de près de 90%.

Concernant le groupe des brachydactylies, nous observons un rendement très disparate selon les sous-groupes. En effet, ce dernier est excellent concernant les patients présentant un syndrome tricho-rhino-phalangien (66,7%), des BDC (77,8%) ou un syndrome de Robinow (100%) ; mais n'atteint que 10,5% pour les BDE et 12,5% pour les non classables. Enfin, dans ce groupe, nous avons pu mettre en évidence des variants pathogènes dans le

gène *DVL1* ainsi que des duplications voire triplications de *ECR2*, enhancer de *BMP2*, tous deux très récemment décrits en pathologie humaine.

Nous observons cette même dispersion au sein du groupe des polydactylies parmi lequel nous notons un rendement supérieur à 50% concernant les polydactylies pre/post axiales et les synpolydactylies ; tandis que nous obtenons un rendement nul chez les patients dont la polydactylie est trop complexe pour être classée. Enfin, le rendement des polydactylies pré axiales n'est que de 10%. Dans la mesure où la ZRS, élément régulateur de *SHH*, est une séquence très intronique, les logiciels de prédiction utilisés sont incapables de prédire l'impact des variants sur sa fonction. Cependant, de nombreux variants de la ZRS ont déjà été décrits dans la littérature comme responsables de polydactylie pré axiale. Bien que très suspect, des tests fonctionnels seront nécessaires pour valider leur pathogénicité et augmenter notre rendement à 25%.

Enfin, le groupe des anomalies réductionnelles ne présente qu'un rendement de 9,5%. Nous avons établi un diagnostic moléculaire uniquement pour les patients présentant un syndrome d'Adams Oliver (44,4%). Ceci confirme que les anomalies réductionnelles sont très complexes et hétérogènes, et que leur diagnostic moléculaire est extrêmement difficile.

Tableau 18: Rendement diagnostique selon le groupe phénotypique de la cohorte prospective. (NB : nombre de patients, VSI : Variant de Signification Inconnu.)

Phénotype	Patients (Nb)	%	Patient avec un diagnostic moléculaire (Nb)	Rendement diagnostique (%)	Gènes impliqués (Nb patients)	Patient avec un VSI (Nb)	%	Gènes impliqués (Nb patients)	Patient avec variant C3C4C5 (Nb)	%
Anomalie Radiale	100	28,5	33	33,0		7	7,0		40	40,0
Syndrome Holt-Oram	34	9,7	11	32,4	<i>TBX5 (11)</i>	1	2,9	<i>TBX5 (1)</i>	12	35,3
Syndrome Okihiro	19	5,4	5	26,3	<i>SALL4 (4) FGFR2 (1)</i>	0	0,0		5	26,3
Syndrome Townes-Brocks	20	5,7	7	35,0	<i>SALL1 (6) PUF60 (1)</i>	0	0,0		7	35,0
Syndrome TAR	11	3,1	4	36,4	<i>RBM8A (4)</i>	6	54,5	<i>RBM8A (6)</i>	10	90,9
Syndrome de Nager	8	2,3	4	50,0	<i>SF3B4 (4)</i>	0	0,0		4	50,0
Syndrome associé à <i>RECQL4</i>	3	0,9	1	33,3	<i>RECQL4 (1)</i>	0	0,0		1	33,3
Non classable	5	1,4	0	0,0		0	0,0		0	0,0
Ectrodactylie	50	14,2	20	40,0		1	2,0		21	42,0
SH/SF	24	6,8	4	16,7	<i>BHLHA9 (4)</i>	1	4,2	<i>WNT10B (1)</i>	5	20,8
SHFLD	4	1,1	2	50,0	<i>BHLHA9 (2)</i>	0	0,0		2	50,0
SHFM	13	3,7	6	46,2	<i>TP63 (2) BTRC (4)</i>	0	0,0		6	46,2
EEC	9	2,6	8	88,9	<i>TP63 (8)</i>	0	0,0		8	88,9
Brachydactylie	63	17,9	25	39,7		6	9,5		31	49,2
BDE	19	5,4	2	10,5	<i>HDAC4 (1) TRPS1 (1)</i>	1	5,3	<i>IHH (1)</i>	3	15,8
BDA	11	3,1	5	45,5	<i>IHH (3) HOXD13 (1) ECR2 (1)</i>	2	18,2	<i>IHH (2)</i>	7	63,6
BDC	9	2,6	7	77,8	<i>GDF5 (6) ECR2 (1)</i>	2	22,2	<i>GDF5 (2)</i>	9	100,0
BDB	5	1,4	2	40,0	<i>ROR2 (2)</i>	0	0,0		2	40,0
Syndrome Tricho-rhino-phalangien	9	2,6	6	66,7	<i>TRPS1 (6)</i>	0	0,0		6	66,7
Syndrome de Robinow	2	0,6	2	100,0	<i>DVL1 (2)</i>	0	0,0		2	100,0
Non classable	8	2,3	1	12,5	<i>GLI3 (1)</i>	1	12,5	<i>HDAC4 (1)</i>	2	25,0

Polydactylie	51	14,5	16	31,4		5	9,8		21	41,2
Préaxiale	20	5,7	2	10,0	<i>GLI3 (2)</i>	4	20,0	<i>GLI3 (1) ZRS (3)</i>	6	30,0
Postaxiale	14	4,0	4	28,6	<i>GLI3 (3), TBX3 (1)</i>	1	7,1	<i>GLI2 (1)</i>	5	35,7
Pré/postaxiale	10	2,8	7	70,0	<i>GLI3 (7)</i>	0	0,0		7	70,0
Synpolydactylie	6	1,7	3	50,0	<i>HOXD13 (3)</i>	0	0,0		3	50,0
Non classable	1	0,3	0	0,0		0	0,0		0	0,0
Anomalie Réductionnelle	42	12,0	4	9,5		1	2,4		5	11,9
Longitudinale	18	5,1	0	0,0		0	0,0		0	0,0
Transversale	8	2,3	0	0,0		0	0,0		0	0,0
Syndrome Adams Oliver	9	2,6	4	44,4	<i>NOTCH1 (1) DOCK6 (3)</i>	1	11,1	<i>NOTCH1 (1)</i>	5	55,6
Phocomélie/Amélie	3	0,9	0	0,0		0	0,0		0	0,0
Non classable	4	1,1	0	0,0		0	0,0		0	0,0
Anomalie de Fusion	24	6,8	6	25,0		3	12,5		9	37,5
Syndactylie	15	4,3	2	13,3	<i>FGFR2 (1) GLI3 (1)</i>	2	13,3	<i>DLL4 (1) GLI3 (1)</i>	4	26,7
Synostose multiple	9	2,6	4	44,4	<i>FGF9 (1) NOG (3)</i>	1	11,1	<i>GDF5 (1)</i>	5	55,6
Hypo/aplasie Patellaire	21	6,0	20	95,2		1	4,8		21	100,0
Syndrome Nail-Patella (NPS)	18	5,1	18	100,0	<i>LMX1B (18)</i>	0	0,0		18	100,0
Syndrome Coxo-podo-Patellaire (SPS)	3	0,9	2	66,7	<i>TBX4 (2)</i>	1	33,3	<i>TBX4 (1)</i>	3	100,0
Total	351		124	35,2		24	6,8			

7- Débouchés fondamentaux

Dans ce chapitre consacré à nos résultats fondamentaux, nous proposons de détailler les investigations réalisées dans deux cadres :

- Soit, lorsque nous avons pu mettre en évidence un variant dans un gène qui n'était connu en pathologie humaine que par son implication dans un syndrome microdélétionnel (*HDAC4*) ;
- Soit, lorsque nous avons identifié un « nouveau gène » (*FGF4*, *FMN1* et *LEF1*).

7.i- Gène *HDAC4*

HDAC4 code une protéine de la famille des HDACs. Ces protéines, très conservées au sein des espèces, sont des histones déacétylases de classe 2 (Z. Wang, Qin, et Zhao 2014). *HDAC4* comporte, dans sa partie N-terminale, un domaine de liaison spécifique au facteur de transcription *RUNX2* et un domaine catalytique zinc dépendant dans sa partie C-terminale. Elle possède également deux éléments cruciaux à sa fonction appelés « signal de localisation nucléaire » et « signal d'export nucléaire ». Ces deux éléments lui permettent d'assurer une localisation cellulaire cytoplasmique ou nucléaire (Bottomley et al. 2008 ; L. Li et Yang 2016). *HDAC4* est exprimé principalement au niveau du muscle cardiaque, des cellules neuronales et du squelette. *HDAC4* a pour rôle de déacétyler les protéines, notamment des histones. Celles-ci, ainsi déacétylées, se condensent et rendent impossible l'accès des facteurs de transcription à leur site de fixation. Au niveau squelettique, *HDAC4* exerce une activité répressive sur *RUNX2* permettant la régulation de la minéralisation des os *via* Smurf (Shimizu et al. 2010 ; Z. Wang, Qin, et Zhao 2014) (Figure 43).

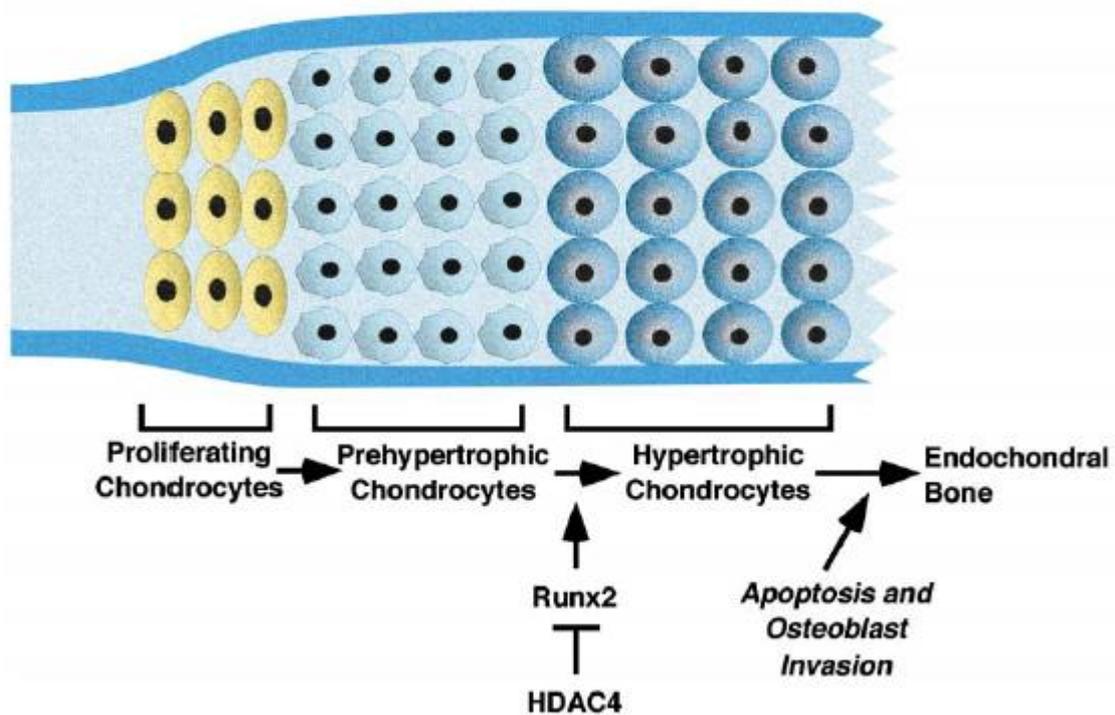


Figure 43 : Schématisation de la fonction répressive de HDAC4 sur RUNX2 dans le développement squelettique (Vega, 2004)

HDAC4 a été décrit en pathologie humaine pour la première fois dans le cadre du syndrome d'Albright par délétion 2q37 (Leroy et al. 2013) (Figure 44-A). Ce syndrome microdélétionnel est caractérisé par des malformations squelettiques notamment des brachymétopies, une petite taille, ainsi qu'un retard de développement, une dysmorphie faciale assez caractéristique, une obésité et une légère déficience intellectuelle. A ce jour, plusieurs délétions interrompant *HDAC4* et seulement 2 variations nucléotidiques ont été décrites en lien avec une brachydactylie de type E (Williams et al. 2010) (Figure 44-B).

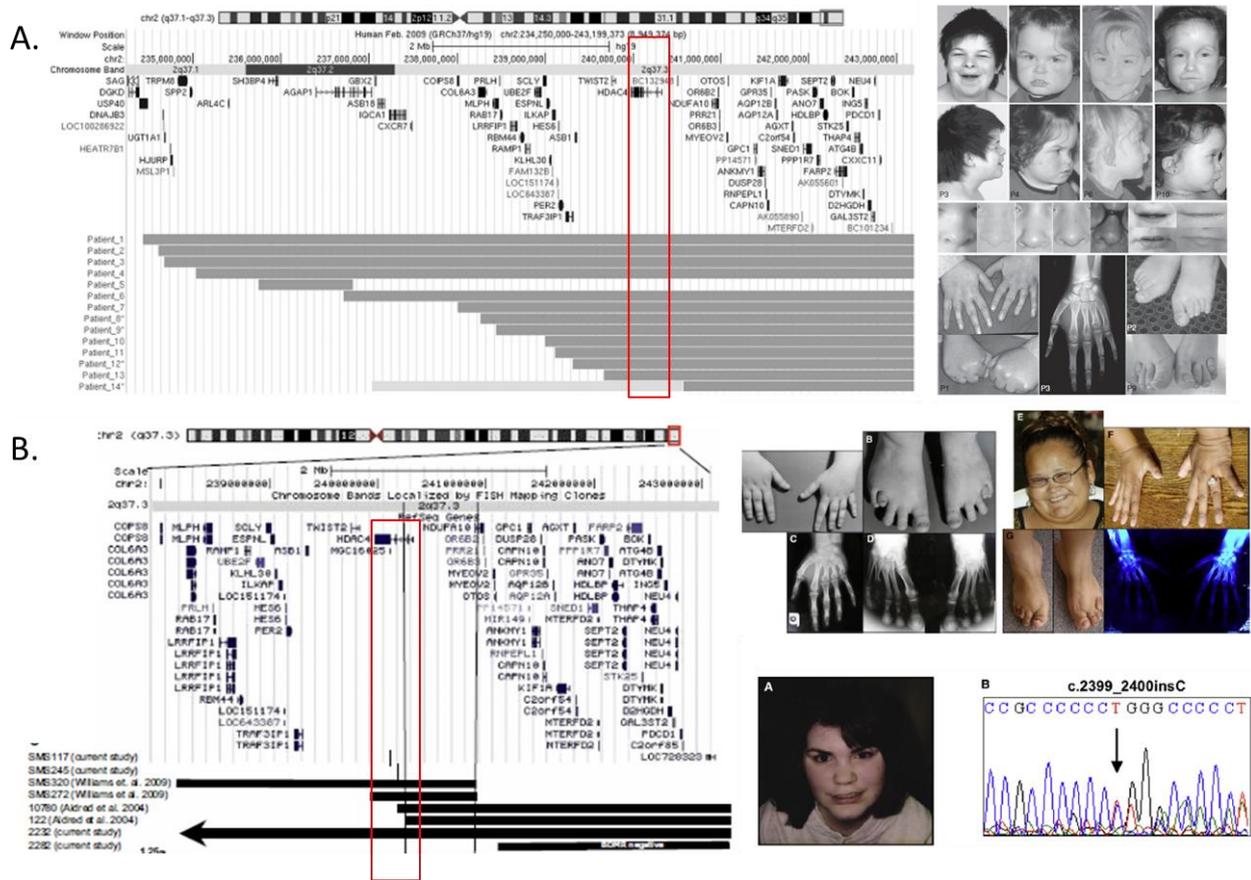


Figure 44 : Identification de *HDAC4* en pathologie humaine. Localisation des délétions 2q37 emportant ou interrompant *HDAC4*, mutation décrite dans *HDAC4*, et phénotypes associés, décrits dans la littérature. A- Leroy ,2012. B- Williams ,2010

Des études sur modèles murins KO *Hdac4* $-/-$ ont montré que ces souris présentaient une plus petite taille que les souris sauvages ainsi qu'un raccourcissement des extrémités similaires à une BDE (Vega et al. 2004) (Figure 45). Chez les poissons Zebrafish présentant une mutation stop de *hdac4*, l'expression de *runx2a* et *runx2b* est augmentée entraînant une augmentation de l'ossification du cartilage pharyngé (DeLaurier, Alvarez, et Wiggins 2019).

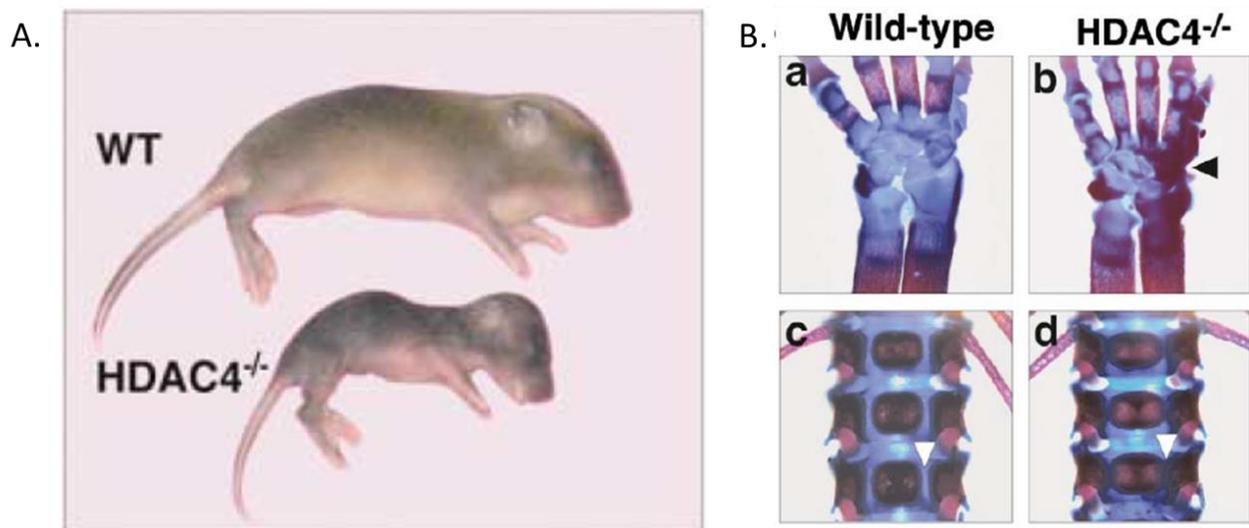


Figure 45 : Etude du gène *HDAC4* *in vivo*. A- Photographie à J8 des souris sauvages comparées aux souris KO *Hdac4* *-/-*, on peut noter l'hypotrophie des souris mutantes. B- radiographies à J18 des pattes et de la colonne vertébrale des souris sauvages comparées à celles des souris KO *Hdac4* *-/-*. On y observe une ossification aberrante des os (montrée par des flèches)

Les analyses NGS nous ont permis de mettre en évidence 2 variants du gène *HDAC4* chez 2 patients porteurs de brachydactylie de type E isolée ou syndromique ainsi qu'un troisième variant de signification inconnue chez un patient porteur d'une brachydactylie de type A (détaillés précédemment). Enfin, la poursuite de l'étude de ce gène chez des patients présentant des brachydactylies ainsi qu'un appel à collaboration nous a permis d'étudier deux autres variants identifiés chez deux patients atteints de BDE, dont l'un est syndromique. Un sixième variant, prédit comme possiblement délétère et retrouvé une seule fois dans notre base de donnée, a également été identifié chez un patient porteur d'un syndrome de Nager. A l'époque, *HDAC4* n'était étudié que depuis peu sur notre panel et c'est ce qui nous a incités à étudier l'impact de ces variants sur la synthèse de la protéine. Ceci dans le but d'affirmer ou non leur caractère pathogène et leur implication dans le phénotype des patients.

Résultats des études fonctionnelles des variants du gène *HDAC4*

Au total, nous avons étudié 6 variants du gène *HDAC4*. Parmi ces six variants, trois sont des variants faux sens, le quatrième engendre un décalage du cadre de lecture aboutissant à un codon stop prématuré, le cinquième est un variant non-sens et le dernier est un variant situé à proximité du site d'épissage de l'exon 4 (Tableau 19). Tous étaient

prédits comme délétères ou possiblement délétère par les logiciels utilisés (MutationTaster, SIFT, Polyphen).

Tableau 19 : Liste des variants du gène *HDAC4* étudiés en Western Blot.

Cas et phénotype	Variation	Remarques	Ségrégation familiale
NGS_Halo-090 Brachydactylie E	c.699C>G p.Tyr233*	Non-sens situé dans le domaine histone déacétylase	Non réalisée
NGS_Halo-079 Brachydactylie E + légère déficience intellectuelle	c.1257dup p.Leu420Thrfs*112	Variante située dans l'exon 11 créant un décalage du cadre de lecture se terminant par un codon stop 111 positions en aval	<i>De novo</i>
NGS_Halo-045 Syndrome de Nager	c.1763T>G p.Leu588Arg	Faux sens situé dans le domaine histone déacétylase, classé comme possiblement délétère	Hérité de la mère symptomatique
NGS_Halo-073 Brachydactylie A	c.2825G>A p.Pro942Leu	Faux sens situé dans le domaine histone déacétylase, classé comme possiblement délétère Associé à une variation d'épissage du gène <i>BMPRI1B</i> également impliqué dans les brachydactylies	Non réalisée
Cas X (collaboration avec Caen) Brachydactylie E + dysmorphie + obésité + légère DI	c.2458G>A p.Val820Met	Faux sens situé dans le domaine histone déacétylase, classé comme probablement délétère	Non réalisée
NGS070 (SS QXT)	c.339+1 G>A p. ?	Substitution située dans le site donneur d'épissage de l'intron 4. L'effet sur la protéine ne peut être prédit, mais un saut de l'exon 4 est très probable.	Non réalisée

Les variants de *HDAC4* situés dans les parties codantes du gène ont été créés par mutagenèse dirigée. La mutation p.(Gly801Trpfs*78) décrite par l'équipe de Williams et al. a été intégrée à l'étude en tant que témoin positif. Des Western blot sur extraction protéique totale ont été réalisés après transfection transitoire des plasmides *HDAC4* sauvages ou mutés dans des cellules HEK293T. Les résultats ont permis de mettre en évidence une perte d'expression importante, voire totale, de la protéine HDAC4 chez les 3 patients présentant une BDE. Aucun changement n'a été noté concernant les variants retrouvés chez le patient porteur d'une BDA ainsi que chez le patient atteint du syndrome de Nager (MIM #154400) (Figure 46).

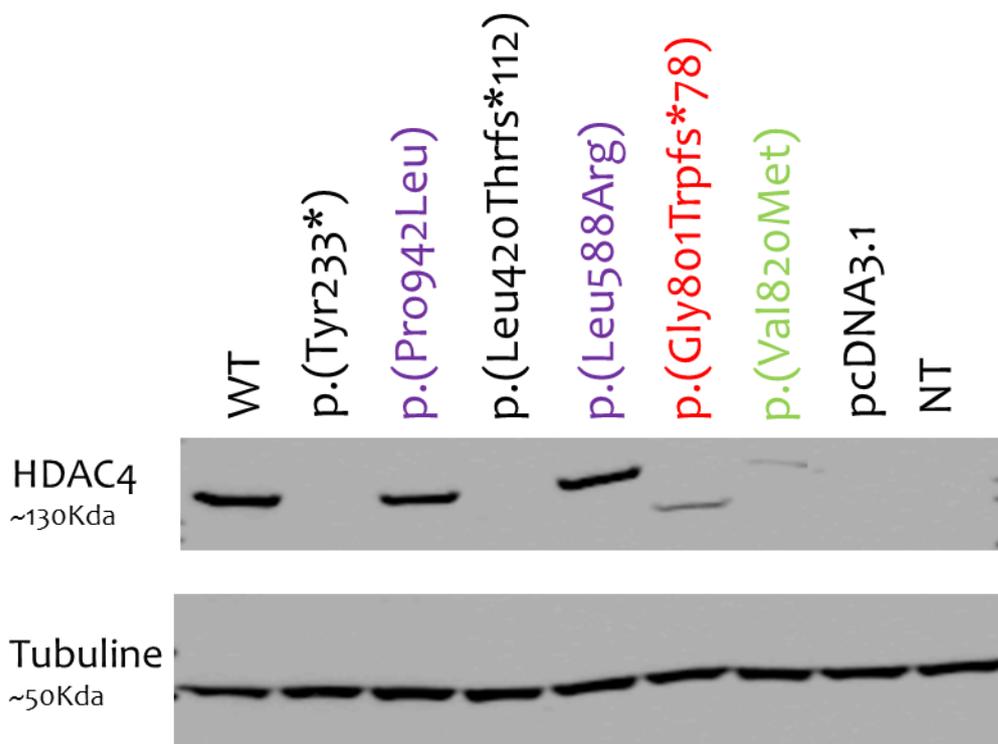


Figure 46 : Résultat des Western Blot réalisés pour les variants de *HDAC4* identifiés en NGS. WT : plasmide *HDAC4* sauvage, pcDNA3.1 : plasmide vide, NT : cellules non transfectées, p.(Gly801Trpfs*78): témoin positif de la publication de Williams, 2010 ; p.(Tyr233*), p.(Leu420Thrfs*112), p.(Val820Met):patients porteurs de brachydactylie de type E ; p.(Pro942Leu), p.(Leu588Arg): patients non porteurs d'une BdE

Le variant d'épissage (c.339+1 G>A p.(?)) a fait l'objet d'une étude d'épissage *ex vivo* par analyse de mini-gène. Après extraction d'ARN des cellules HeLa transfectées, aucune amplification n'est détectée pour le plasmide muté, contrairement au plasmide sauvage, suggérant une dégradation précoce de l'ARN muté par divers mécanismes (NMD, ...).

Interprétation des études fonctionnelles des variants du gène *HDAC4*

Les résultats montrent que les quatre variants retrouvés chez 4 patients porteurs d'une BDE entraînent l'absence de la protéine *HDAC4* et rendent la protéine non fonctionnelle. Ces résultats tendent à confirmer que l'haploinsuffisance de *HDAC4* serait impliquée dans le mécanisme d'apparition d'une brachydactylie de type E. Il est donc important d'inclure l'analyse de ce gène à notre panel NGS notamment pour le diagnostic moléculaire de patients porteurs de brachydactylies, parfois difficiles à caractériser. Concernant les patients, non porteurs d'une BDE, l'expression de la protéine *HDAC4* reste

inchangée. Cependant, nous ne pouvons conclure quant à sa fonctionnalité. Des tests fonctionnels supplémentaires sur la localisation cellulaire de HDAC4 mutée (microscopie confocale, western blot sur fraction nucléaire) et/ou sur son interaction sur *RUNX2* (la répression de *RUNX2* par HDAC4 est-elle toujours fonctionnelle lorsque *HDAC4* est muté ?) pourraient s'avérer très utiles pour trancher sur leur éventuelle pathogénicité (DeLaurier, Alvarez, et Wiggins 2019). Nous pourrions également évaluer l'impact du variant identifié dans le gène *RUNX2* chez le patient NGS_Halo-166 porteur d'une brachydactylie (la fixation de *RUNX2* sur HDAC4 est-elle toujours effective lorsque *RUNX2* est muté ?).

Une collaboration étudiant le rôle de *hdac4* chez le Zebrafish a été entreprise avec l'équipe *Cell Plasticity and Cancer* (INSERM U908) de Lille 1. Les résultats préliminaires (*hybridation in situ*) ont pu montrer que la protéine est exprimée dans le bourgeon des nageoires pectorales, ce qui est tout à fait en accord avec un rôle dans le développement des membres (Figure 47). Des TALEN ciblant les variants identifiés en NGS pourront être générés dans le but de valider leur pathogénicité (phénotype similaire à celui des patients ?).

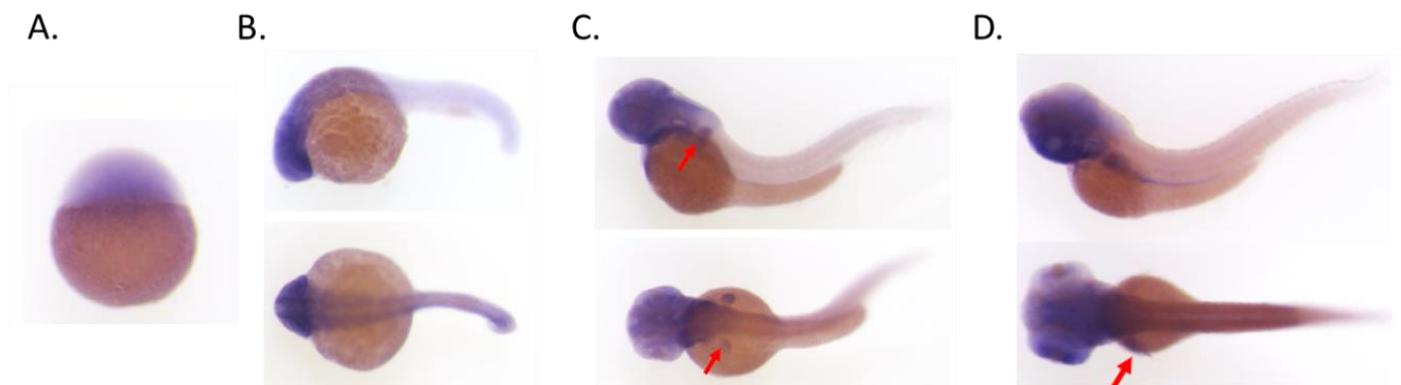


Figure 47 : Analyse par hybridation *in situ* de l'expression de *hdac4* chez le zebrafish. A. L'ARN maternel est détecté au stade 1 cellule. B. Expression ubiquitaire à 24 hpf. C. Expression dans le bourgeon des nageoires pectorales à 48 hpf. D. Expression au niveau de la partie antérieure, de la rétine, de l'intestin et des nageoires pectorales. (L'expression est visualisée par la flèche rouge) (Equipe INSERMU908)

7.ii- Identification de nouveaux gènes

Gène *FGF4*

FGF4 fait partie de la grande famille des *Fibroblast Growth Factor* qui ne compte pas moins de 17 membres chez les mammifères. Ces protéines interviennent majoritairement dans la prolifération, la différenciation, la survie et la motilité cellulaire. Toutes comportent une séquence *consensus* de 120 acides aminés qui leur confère une structure tertiaire type. Celle-ci permet alors leur fixation à l'héparine ou à l'héparan sulfate. Cette oligomérisation facilite la transduction du signal en présentant une meilleure affinité du ligand à son récepteur FGFR, protéine kinase transmembranaire. Certains membres de cette grande famille fonctionnent comme des molécules signalétiques intracellulaires dans l'embryogénèse. Cinq d'entre eux sont exprimés dans la partie distale du bourgeon de membre en développement (*FGF2*, *FGF4*, *FGF8*, *FGF9*, et *FGF10*), 3 dans l'AER (*FGF2*, *FGF4*, *FGF8*) et 2 dans le mésenchyme sous-jacent (*FGF2*, *FGF10*) (Martin 1998; Sun et al. 2000; Mariani, Ahn, et Martin 2008).

Les FGFs sont sécrétées par les cellules de l'AER et permettent d'assurer deux fonctions majeures : stimuler la prolifération des cellules au niveau de la zone de progression et maintenir l'expression de *SHH* dans la ZPA. Des modèles murins KO *Fgf4* *-/-* ne survivent pas (Feldman et al. 1995), tandis que les modèles murins KO *Fgf8* *-/-* ou double KO *Fgf4/Fgf8* présentent des aplasies des membres supérieurs associées à des anomalies vertébrales et une absence de formation de la queue (Sun et al. 2000 ; Mariani, Ahn, et Martin 2008 ; Boulet et Capecchi 2012). L'absence d'expression de *Shh* est également observée. Il existerait donc une boucle de rétrocontrôle entre SHH et les facteurs FGF4, FGF8, FGF9 et FGF17 (Scherz 2004 ; Zuniga, Zeller, et Probst 2012) (Figure 48).

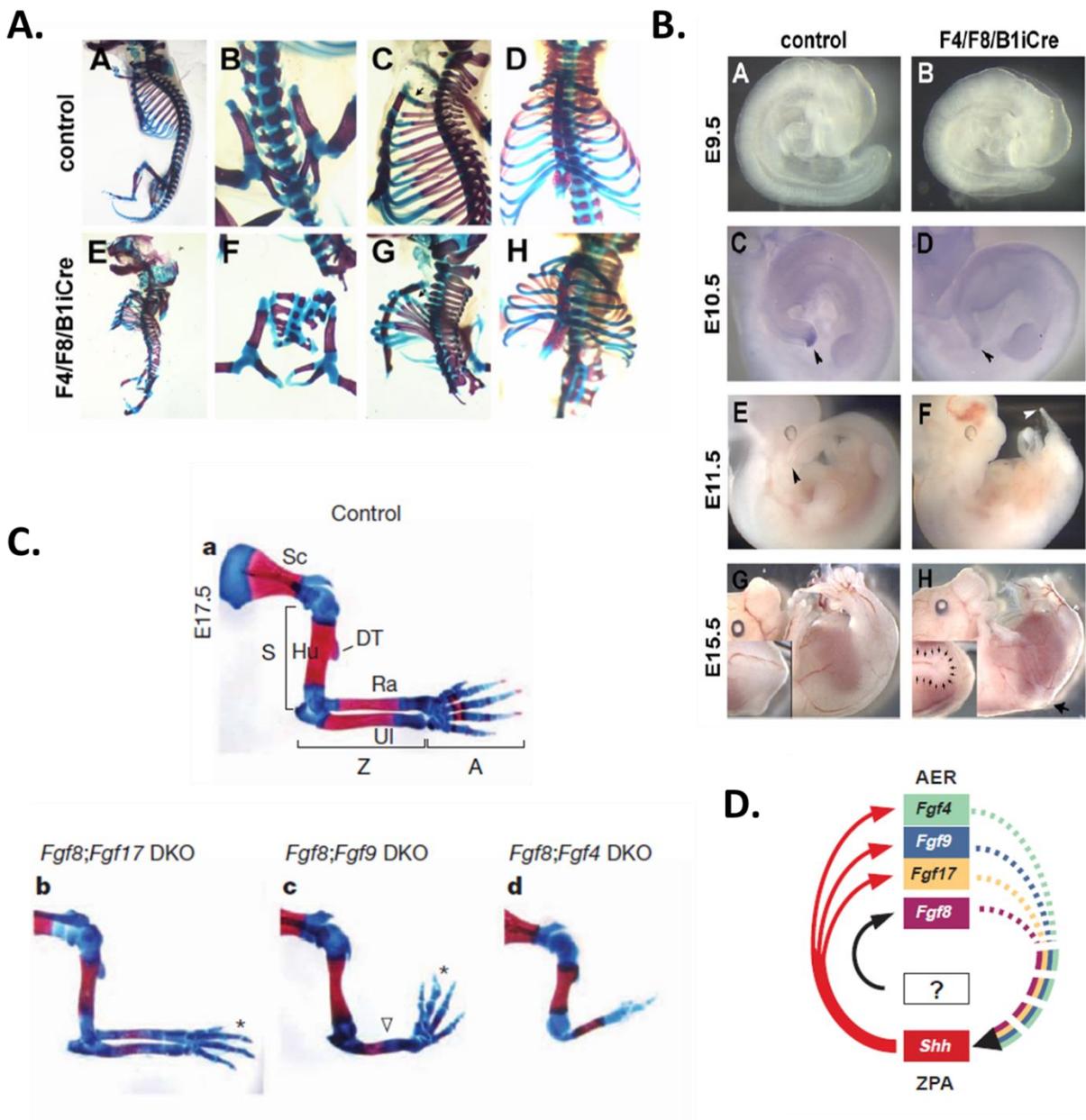


Figure 48: Etude des malformations squelettiques chez des modèles murins double KO *Fgf4/Fgf8* $-/-$. A. Notez les anomalies vertébrales (Boulet, 2012); B. Absence de développement de la queue (Boulet, 2012). C. Anomalies des extrémités à type d'aplasie (Mariani, 2008). D. Boucle de rétrocontrôle entre les facteurs FGFs et SHH lors du développement des membres. (Sun, 2000)

A ce jour, aucun variant de *FGF4* n'a été décrit en pathologie humaine. Cependant, dans notre cohorte, nous avons pu identifier un variant faux sens, c.598A>T p.(Thr200Ser), chez le patient NGS_Halo-117 porteur d'une brachydactylie de type B. Ce variant faux sens présente un score CADD de 24,5. Il est prédit délétère par 2 sur 3 des logiciels de prédiction utilisés (MutationTaster, Polyphen-2). Il touche un acide aminé très conservé sur 12 espèces et engendre un écart physico chimique peu important. Il est situé dans le domaine protéique FGF. Il n'a, à ce jour, été rapporté dans aucune base de population de référence (GnomAD,

ExAc, ...). Les critères ACMG le classent comme de signification inconnue. A ce jour, l'étude familiale n'a pu être réalisée faute de prélèvements parentaux disponibles.

La revue de la littérature concernant *FGF4* nous a permis d'observer que les modèles animaux KO décrits sont tous porteurs d'anomalies squelettiques. En effet, bien que les modèles murins *Fgf4* *-/-* ne survivent pas, les double KO *Fgf4 Fgf8* *-/-* présentent un phénotype très sévère d'aplasie des membres supérieurs (Sun et al. 2000 ; Mariani, Ahn, et Martin 2008 ; Boulet et Capecchi 2012). Il est donc probable que des variations hétérozygotes pathogènes dans le gène *FGF4* soient responsables d'anomalies moins sévères des membres supérieurs chez l'Homme telle que la brachydactylie présentée par notre patient. L'haploinsuffisance de *FGF4* chez l'Homme pourrait entraver la prolifération des cellules de la zone de progression sans pour autant l'abolir complètement (Feldman et al. 1995 ; Sun et al. 2000 ; Boulet et Capecchi 2012). Pour évaluer la pathogénicité de notre variant nous pourrions, par des tests d'hybridation *in situ*, étudier l'impact de ce dernier sur l'expression de *FGF4* au sein de l'AER mais également sur le rétrocontrôle qu'il exerce sur *SHH* (Scherz 2004 ; Zuniga, Zeller, et Probst 2012).

Gène *FMN1*

FMN1 est une protéine de la famille des formines qui comportent un domaine FH1, pour *Formin Homology 1*, et un domaine FH2 (Isogai et Innocenti 2016). FH1 est une séquence riche en proline permettant le recrutement de la profiline au niveau des filaments d'actine. FH2 est, quant à lui, impliqué dans la nucléation des filaments d'actine. Localisée au niveau du cytoplasme des cellules, la protéine agit comme un répresseur de la voie des BMPs en aval du récepteur *BMPR*. Ces fonctions montrent l'implication de *FMN1* dans le développement du cytosquelette (Wynshaw-Boris et al. 1997 ; F. Zhou et al. 2009). Au cours de l'embryogénèse, *FMN1* est exprimé essentiellement au niveau du rein, de l'AER et du mésenchyme du bourgeon de membre (Wynshaw-Boris et al. 1997). Le rôle de *FMN1* a déjà pu être démontré dans le développement des membres grâce à la présence d'une séquence régulatrice en *cis* de *GREM1* présente à son extrémité 3' (C. C. Wang, Chan, et Leder 1997 ; F. Zhou et al. 2009). Des mutations dites « *ld* » (*mouse limb deformity*) retrouvées dans cette région contrôle ou dans *Grem1* sont associées à des défauts de signalisation entre l'AER et la région polarisante (Tanaka 2000). De même, une inactivation de la totalité des transcrits

Fmn1 par délétion du domaine FH1, situé dans l'exon 9, et du domaine FH2, situé dans les exons 10 à 24, chez la souris, entraînent une absence d'expression de *Grem1* provoquant l'apparition d'agénésie de la fibula associée à des anomalies rénales et des malformations des extrémités des membres de type oligodactylie (Tanaka 2000 ; F. Zhou et al. 2009) (Figure 49). De plus, des expériences d'hybridation *in situ* sur des embryons de souris KO *Fmn1*^{-/-} ont montré une implication importante de FMN1 dans la boucle de rétrocontrôle de *SHH*. En effet, l'équipe de Zhou a pu observer, lorsque *Fmn1* est muté, une expression anormale des facteurs de cette voie au niveau du bourgeon de membre. Il en est de même dans la voie des BMPs (Figure 50). A ce jour, aucun variant dans le gène *FMN1* n'a été décrit en pathologie humaine.

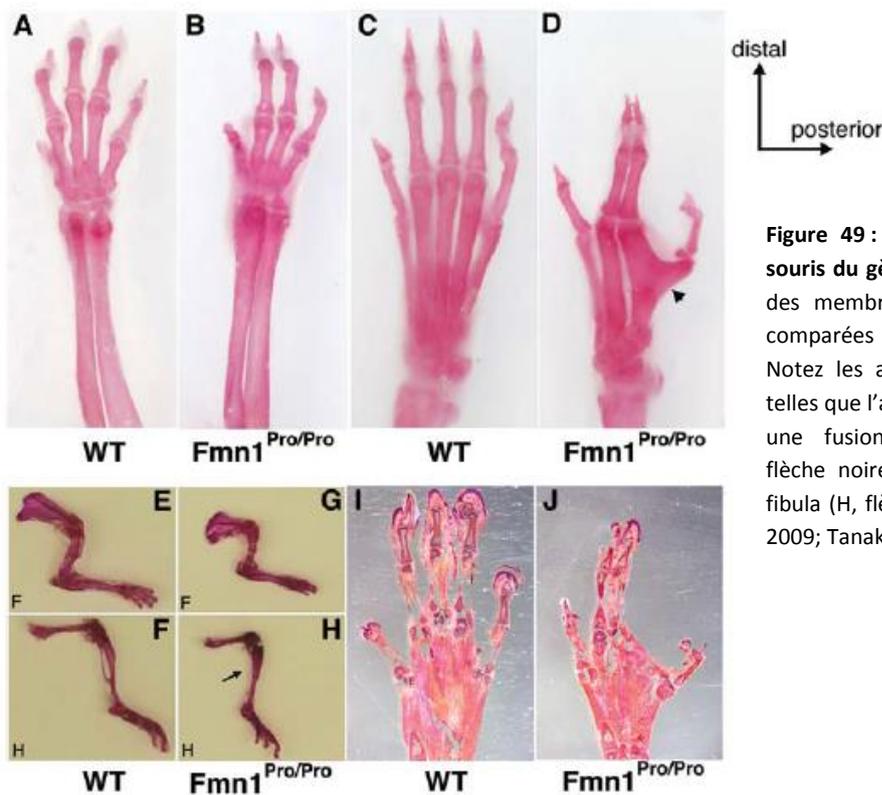


Figure 49 : Etude *in vivo* chez la souris du gène *Fmn1*. Radiographie des membres de souris sauvages comparées aux souris KO *Fmn1*^{-/-}. Notez les anomalies squelettiques telles que l'absence de doigts (B, D), une fusion des métatarses (D, flèche noire) et une absence de fibula (H, flèche noire). (Zhou et al. 2009; Tanaka 2000)

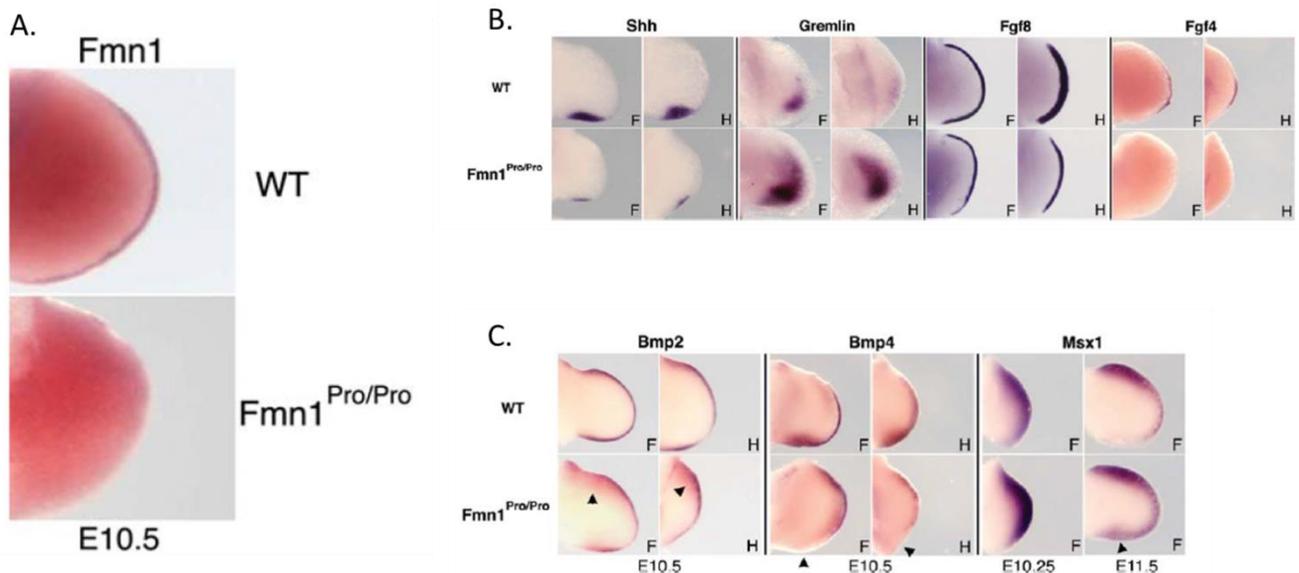


Figure 50 : Expériences d'hybridation *in situ* sur embryon de souris KO *Fmn1*^{-/-}. Notez la localisation au niveau du bourgeon du membre de FMN1 (A) ainsi que les expressions anormales des différents facteurs de la voie SHH (B) et de la voie des BMPs (C). (Zhou et al. 2009)

Au cours de notre travail, nous avons pu identifier un variant faux sens, c.889G>A p.(Glu297Lys), chez le foetus NGS_Halo-118 qui présente des malformations squelettiques sévères (agénésie d'un des deux os de l'avant-bras droit avec présence d'un seul doigt à la main, malformation de la main gauche sous forme de pince comportant un pouce et deux doigts en syndactylie, agénésie des péronés avec angulation tibiale et pied-bot). Le score CADD de ce faux sens est inférieur à 20 (16). Ce variant touche un acide aminé très conservé sur 12 espèces et engendre un écart physico chimique peu important. Il n'est prédit délétère que par un seul logiciel de prédiction (Polyphen). Il n'a, à ce jour, été rapporté que 6 fois sur 138 086 allèles testés dans GnomAD. Les critères ACMG classent ce variant comme étant de signification inconnue.

L'étude bibliographique a montré que les souris KO *Fmn1* présentent un phénotype chevauchant avec celui de notre patient. En effet, elles sont atteintes d'agénésies du péroné associées à des malformations des extrémités (Tanaka 2000 ; F. Zhou et al. 2009), tandis que notre patient présente des anomalies réductionnelles sévères à type d'agénésie d'un os de l'avant-bras droit et agénésie des péronés, associés à des anomalies des extrémités (aspect pince de la main gauche et pied bot). Le défaut d'expression de *GFREM1* par FMN1 mutée pourrait être à l'origine des malformations présentées par notre propositus (C. C. Wang, Chan, et Leder 1997 ; F. Zhou et al. 2009). Nous souhaiterions valider ou invalider la pathogénicité du variant c.889G>A du gène *FMN1*, par des tests d'hybridation *in situ*. Ainsi

nous étudierons son impact sur l'expression des facteurs de la voie SHH et de la voie des BMPs (F. Zhou et al. 2009).

Etude du gène *LEF1*

L'intégralité de l'étude concernant le gène *LEF1* (NGS, tests fonctionnels, hypothèses, perspectives) est résumée dans un organigramme disponible en Annexe II page 186.

LEF1 (*lymphoid enhancer-binding factor-1*) code un facteur de transcription appartenant à une famille de protéines partageant des homologies avec le groupe de protéines-1 à haute mobilité (HMG-box), les TCFs (*T-cell factor*) (Kengaku et al. 1998 ; Arce, Yokoyama, et Waterman 2006 ; Hrckulak et al. 2016). Cette famille se compose de 4 facteurs nucléaires : TCF7 (ou TCF1), TCF7L1 (ou TCF3), TCF7L2 (ou TCF4) et LEF1. Tous partagent une structure commune composée d'un site de fixation à la bêta-caténine (N-terminale), d'un domaine de transactivation, d'un domaine hydrophobe de fixation Groucho (Gro/TLA *binding domain*, protéine à activité répresseur) ainsi que d'un domaine de liaison à l'ADN (HMG-box) qui reconnaît une séquence *consensus* appelée élément de réponse Wnt (WRE) (Figure 51) (Giese, Amsterdam, et Grosschedl 1991 ; Schmidt et al. 2004 ; Cadigan et Waterman 2012 ; Nagalski et al. 2013).

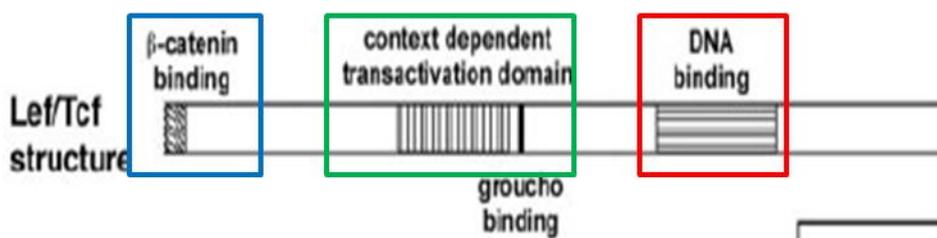


Figure 51 : Représentation de la protéine LEF1. En bleu le domaine de liaison à la β caténine, en vert le domaine de transactivation suivi d'un site de fixation au complexe Groucho, en rouge le domaine de liaison à l'ADN (Schmidt , 2003)

Ces facteurs de transcription nucléaires peuvent avoir une fonction activatrice mais également répressive (Korswagen et Clevers 1999 ; Arce, Yokoyama, et Waterman 2006 ; Doumpas et al. 2019). En absence du signal Wnt, la β caténine cytoplasmique est phosphorylée dans sa partie N-terminale par un complexe de destruction composé de 4 protéines (APC, Axin, CSK1 α , GSK3). La β caténine n'est alors pas disponible pour les TCFs/LEF qui auront, par conséquent, une activité répressive sur leurs gènes cibles *via* leur interaction

avec Groucho/transducin like enhancer of splif (Gro/TLE) (Fisher et Caudy 1998; Jennings et Ish-Horowicz 2008). Au contraire, lors de l'apport du ligand Wnt au récepteur transmembranaire *Frizzled* (Fzd) et à son co-récepteur *Low-density lipoprotein receptor related protein* (Lrp), l'Axin, recrutée à la membrane, inactive le complexe de destruction de la β caténine. Ceci permet une accumulation de la β caténine au niveau du cytoplasme. Cette dernière s'associera dans le noyau aux TCFs/LEF pour activer les gènes de la voie Wnt (Eastman et Grosschedl 1999 ; Schmidt et al. 2004 ; Daniels et Weis 2005 ; Cadigan et Waterman 2012 ; Lu et al. 2014 ; Schuijers et al. 2014) (Figure 52).

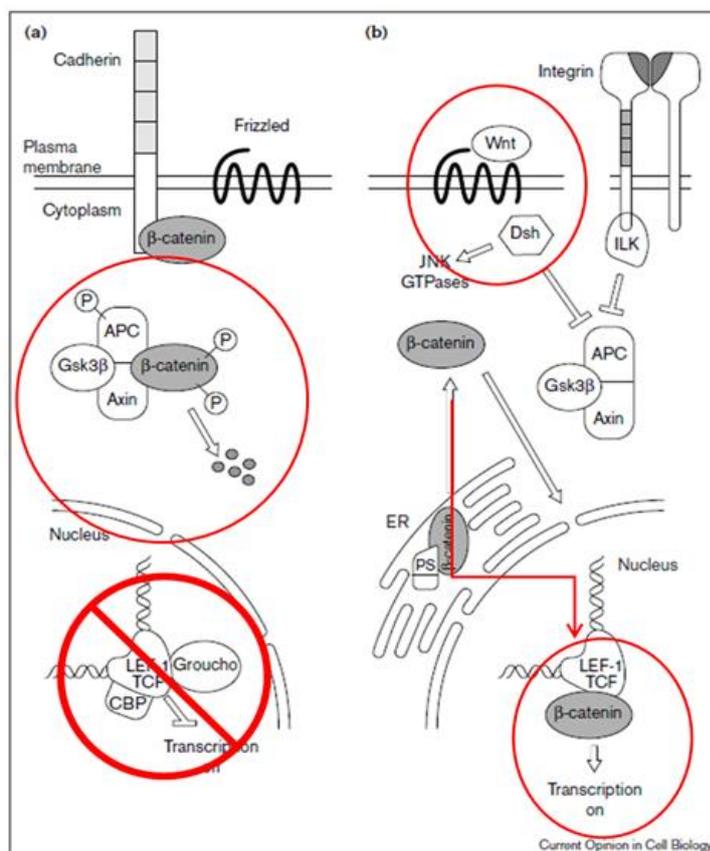


Figure 52 : Schématisation de l'activation des TCFs/LEF dans la voie Wnt via la β caténine. A- Représentation de l'activité répressive des TCFs/LEF : en l'absence du signal Wnt, la β caténine est dégradée via le complexe Gsk3-APC-Axin-CSK1 α , permettant ainsi la fixation de complexe Groucho/TLE aux TCFs/LEF; B- Représentation de la voie activatrice des TCFs/LEF : en présence du ligand Wnt fixé à son récepteur transmembranaire Frz, la β caténine s'accumule dans le cytoplasme puis se fixe au domaine de liaison des TCFs/LEF permettant ainsi l'activation de leur fonction transcriptionnelle sur leurs gènes cibles. (Eastman et Grosschedl 1999, Schmidt et al. 2004)

LEF1 est exprimé durant l'embryogénèse, et possède une expression tissu-spécifique chez l'adulte (thymus et cellules T). Une très faible expression de l'ARNm de *LEF1* est retrouvée dans le cœur, les artères, les muscles squelettiques, le pancréas et le foie (Hrckulak et al. 2016).

Des expérimentations sur le Zebrafish ont montré que *Lef1* présente un rôle spécifique dans l'induction et le développement des nageoires (Poss, Shen, et Keating 2000) (Figure 53-B). Les souris KO *Lef1* *-/-* présentent des anomalies des dents, des follicules pileux et des glandes mammaires (Warren et al. 2007) mais également des malformations vertébrales et l'absence du rayon radial (Galceran et al. 1999) (Figure 53-A). Chez ces souris, l'expression de *Sall4* est diminuée. Chez les souris KO *Tbx5* *-/-*, l'expression de *Lef1* n'est pas détectable dans les membres supérieurs mais reste inchangée dans le reste de l'organisme (Agarwal et al. 2003). Ces résultats suggèrent que *Tbx5* agit en amont de *Lef1* qui à son tour régule *Sall4*.

La comparaison interespèces des séquences du gène *SALL4* et *TBX5* a montré que ces derniers possèdent un site de fixation spécifique (TACAAAG) du TCF/LEF. Des tests *in vitro* ont prouvé l'activation de *SALL4* par fixation directe de *LEF1* (Böhm et al. 2006). Aucun test fonctionnel *in vitro* n'a été publié concernant l'interaction entre *LEF1* et *TBX5*.

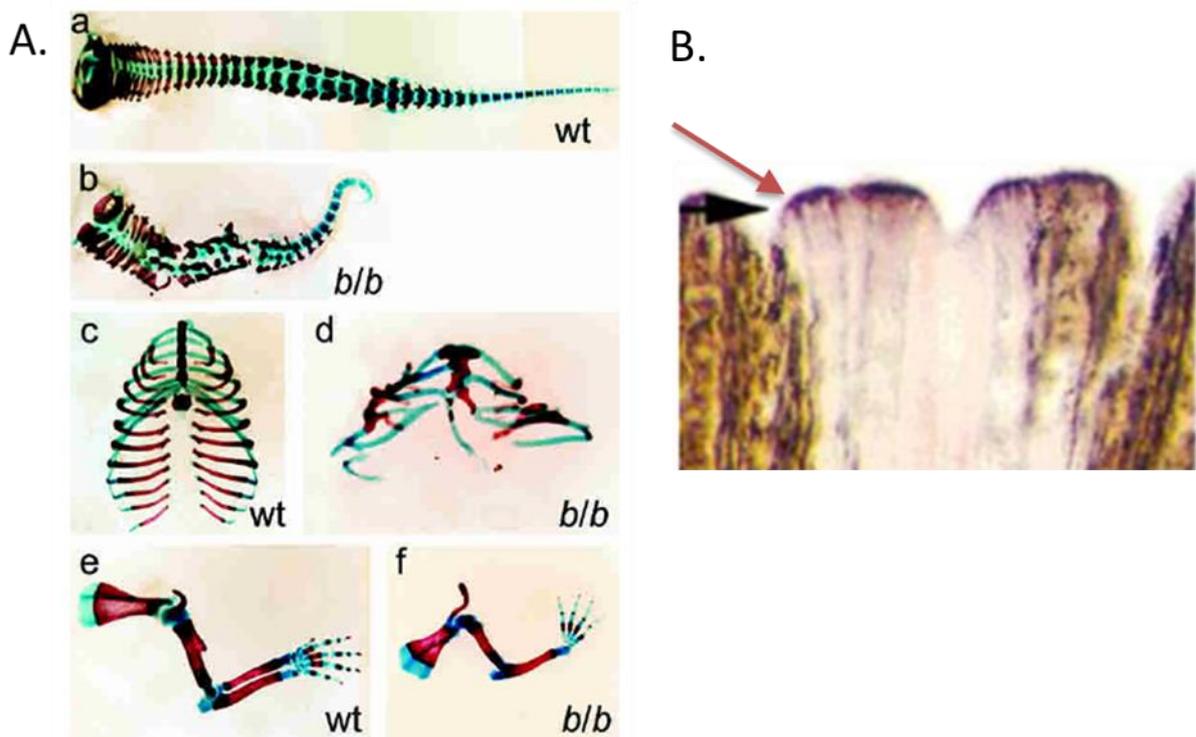


Figure 53 : Etudes *in vivo* du gène *LEF1*. A- Radiographies et visualisation des malformations squelettiques chez des souris sauvages (a, c, e) comparées à des souris mutantes KO *Lef1* $-/-$ (b, d, f). On peut observer chez les mutants l'absence de certaines vertèbres, des anomalies costales (absence / fusion), et des malformations des membres (absence du radius et aplasie de certains doigts). (Galceran, 1999) B- Localisation de *Lef1* dans la nageoire caudale du Zebrafish après amputation (flèche rouge). (Poss, 2000)

Suite aux analyses NGS réalisées sur notre cohorte, nous avons mis en évidence un variant faux sens, présent à l'état hétérozygote dans le gène *LEF1* chez le patient NGS_Halo-050 porteur d'une anomalie radiale bilatérale et d'une cardiopathie congénitale à type de foramen ovale avec CIA (Figure 54-A). Ce variant est prédit délétère par plusieurs logiciels de prédiction (SIFT, MutationTaster, Polyphen). Il est, de plus, situé dans le domaine de liaison à l'ADN (HGM) de la protéine. Des analyses de ségrégation ont pu montrer qu'il ségrège chez la sœur aînée et le père du cas index, tous deux symptomatiques (Figure 54-C). Sa sœur aînée est porteuse d'une atteinte radiale droite limitée à une hypoplasie de l'éminence thénar et d'une agénésie mammaire avec mamelon résiduel à droite et un sein hypoplasique à gauche. Leur père et leur oncle paternel présentent une brièveté des extrémités associée à un *pectus excavatum* (Figure 55-B). Son cousin paternel présente, quant à lui, une anomalie radiale et un spina bifida, *a priori* d'association fortuite. L'étude de la ségrégation chez cet oncle et son fils n'a pas été réalisée faute de prélèvements disponibles.

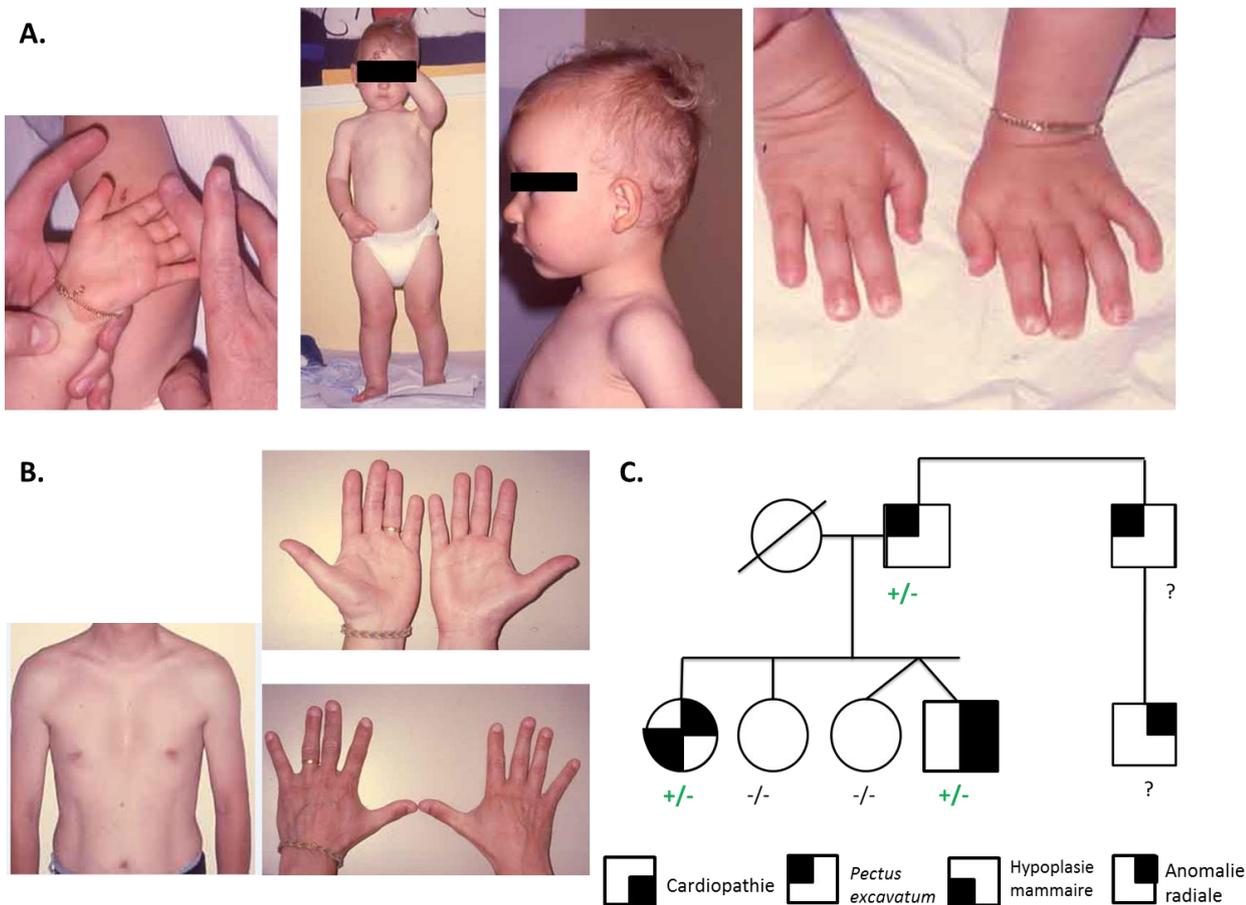


Figure 54 : Etude familiale du variant c.928A>G du gène *LEF1*. A- Photographies du patient NGS_Halo-050 porteur d'anomalie radiale. B- Photographie du père de ce dernier également atteint. C- Arbre généalogique et ségrégation du variant avec le phénotype. (-/- absence du variant, +/- présence du variant à l'état hétérozygote, ? patient non testé à ce jour). Notez l'anomalie radiale bilatérale associée à la cardiopathie congénitale à type de foramen ovale avec CIA du propositus NGS_Halo-050 ; la brièveté des extrémités associée à un *pectus excavatum* du père du propositus.

Séquençage du gène *LEF1* chez des patients porteurs d'anomalie radiale

Afin d'identifier d'autres variants du gène *LEF1*, nous avons séquencé une cohorte de 74 patients porteurs d'anomalies radiales et chez lesquels l'analyse des gènes *TBX5* et *SALL4* (séquençage et recherche de réarrangements) n'avait pas permis d'identifier d'anomalie en lien avec la pathologie. Le séquençage des régions codantes du gène *LEF1* a été réalisé *via* la technologie Haloplex chez 20 patients (suspectés d'un syndrome de Holt-Oram) et *via* la technologie SureSelect chez 54 patients (32 patients suspectés d'un syndrome de Holt-Oram, 20 d'un syndrome d'Okhiro et 2 porteurs d'une anomalie radiale isolée). De plus, nous avons réalisé une nouvelle analyse bioinformatique approfondie centrée sur le gène *LEF1* chez 13 patients porteurs d'un syndrome de Holt Oram et qui avaient bénéficié d'un séquençage complet d'exome n'ayant conduit à l'identification d'aucun variant d'intérêt.

Un nouveau variant a ainsi pu être identifié (Tableau 20, Figure 55). Il s'agit d'un variant faux sens, c.433G>T (p.(Val145Leu)), présent à l'état hétérozygote, identifié chez la patiente LEF1_#3 atteinte d'une CIV membraneuse, d'une CIA *ostium secundum*, d'une hypoplasie bilatérale et symétrique des premiers métacarpiens et des pouces, d'une hypoplasie bilatérale et symétrique de la phalange médiane des 5èmes doigts avec une clinodactylie (doigts 2, 3 et 4 normaux). Il est situé dans l'exon 4 du gène, au niveau du domaine de liaison à la β caténine, cofacteur indispensable à l'activation de la protéine LEF1. Ce variant est prédit délétère par 2 logiciels sur 3 (MutationTaster ; Polyphen2) et présente un score CADD supérieur à 20 (24,4). Ce variant est présent 76 fois sur plus de 245 000 allèles analysés dans la base de données en population générale GnomAD. L'étude de la ségrégation du variant n'a pu être réalisée, faute de prélèvements disponibles. Selon les critères ACMG, ce variant est classé de signification inconnue.

Tableau 20 : Informations concernant les variants identifiés dans le gène *LEF1*.

Patients	NGS_Halo-50	LEF1_#3
Analyses	Haloplex	SureSelect +50
Type d'anomalie des membres	Radiale	Radiale
Position génomique (hg19)	g.108999456 T>C	g.109010395 C>A
Changement codant (NM_016269.4)	c.928A>G	c.433G>T
Statut du variant	Hétérozygote	Hétérozygote
Changement protéique	p.Met310Val	p.Val145Leu
Conservation acide aminé	Haute (13)	Haute (13)
Ecart physico chimique	Peu important	Peu important
Domaine protéique	HGM1	CTNNB1
Base dbSNP	NV	RS14185061 (A<0,01/2)
Base interne DVD	0	0
Base Exac	NV	41/121222 (0 HMZ)
Base GnomAD exome	NV	76/245902 (0 HMZ)
Classification Varsome	<i>Uncertain</i> PM2 PP3	<i>Uncertain</i> PP3
Prédiction SIFT	<i>Deleterious</i>	<i>Tolerated</i>
Prédiction MutationTaster	<i>Disease causing</i>	<i>Disease causing</i>
Prédiction Polyphen	<i>Probably damaging</i>	<i>Possibly damaging</i>
Score CADD	25,9	24,4
Analyse de la ségrégation	Père et sœur atteints	ND

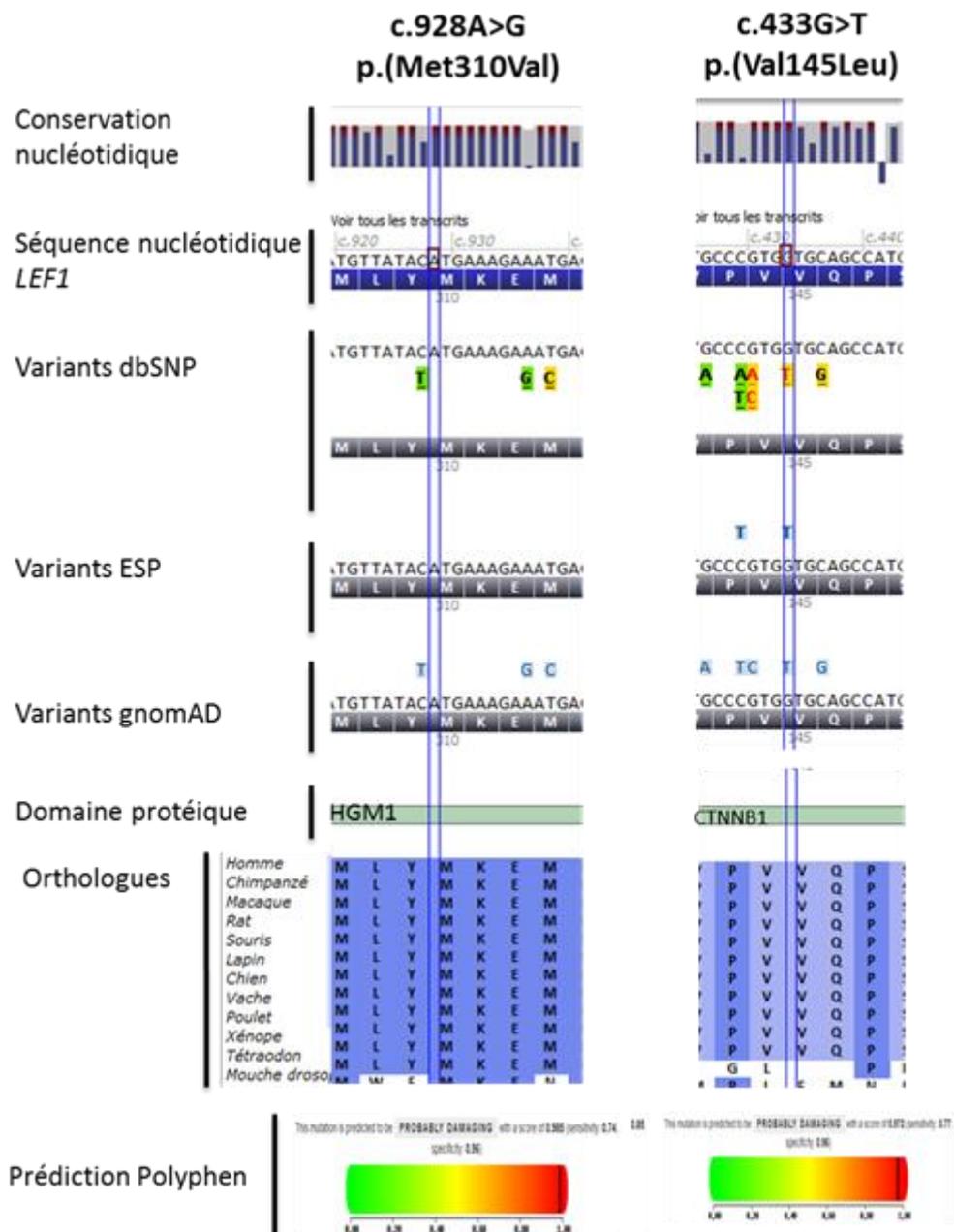


Figure 55 : Description et visualisation *via* le logiciel Alamut des 2 variants retrouvés dans le gène *LEF1*.

Etudes fonctionnelles des variants du gène *LEF1*

Nous avons étudié l'impact des variants c.433G>T et c.928A>G du gène *LEF1* sur la synthèse de la protéine, sa localisation, sa fonction et son interaction avec *SALL4* et *TBX5*.

Impact des variants sur la synthèse et la localisation de la protéine *LEF1*

Après mutagenèse dirigée, les plasmides comportant les parties codantes du gène *LEF1* ont été créés pour les 2 variants identifiés. La réalisation de Western blot sur extrait protéique totale montre que la présence du variant n'a pas d'impact sur la taille de la protéine synthétisée (Figure 56-A). Cependant, la protéine *LEF1* porteuse du variant c.928A>G p.(Met310Val) est surexprimée de façon significative (+54%, p=0,004) (Figure 56-B).

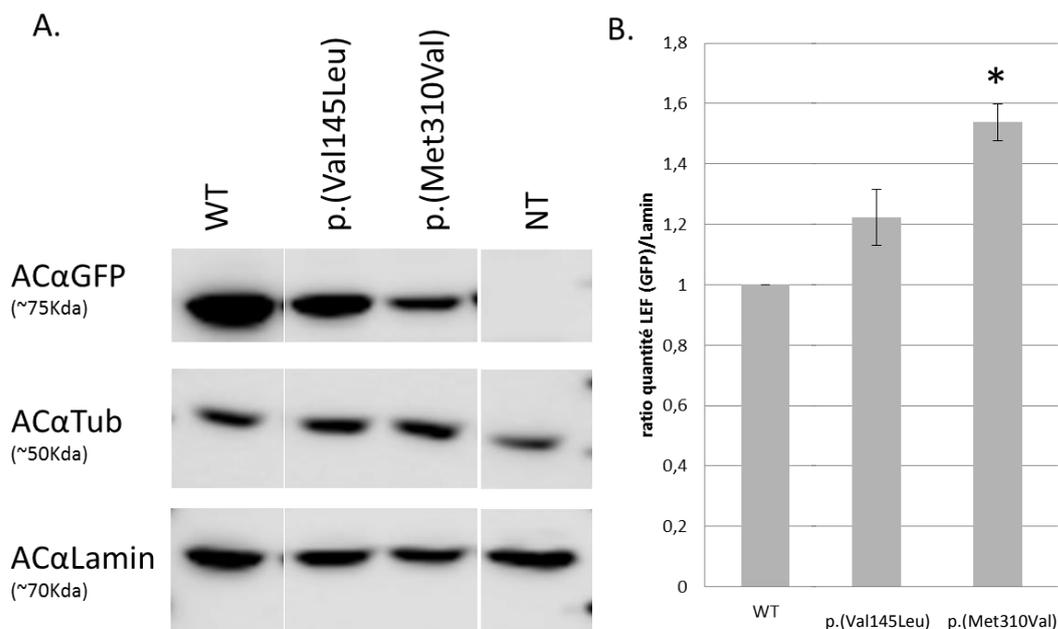


Figure 56 : Etude de l'impact des variants du gène *LEF1* sur la synthèse de la protéine. A- Résultat du Western blot réalisé sur les fractions protéiques totales des deux variants de *LEF1* transfectés dans des HEK293T. (WT : plasmide *LEF1* sauvage, NT : cellules non transfectées). B- Ratio théorique de la quantité de protéines *LEF1* sauvages ou mutées sur la quantité de la Lamine, marqueur nucléaire. (* : Différence significative selon le t-test de Welch p<0.05)

La réalisation de Western blot sur les fractions protéiques nucléaires et cytoplasmiques différenciées montre l'absence d'anomalie de localisation des protéines mutées (Figure 57).

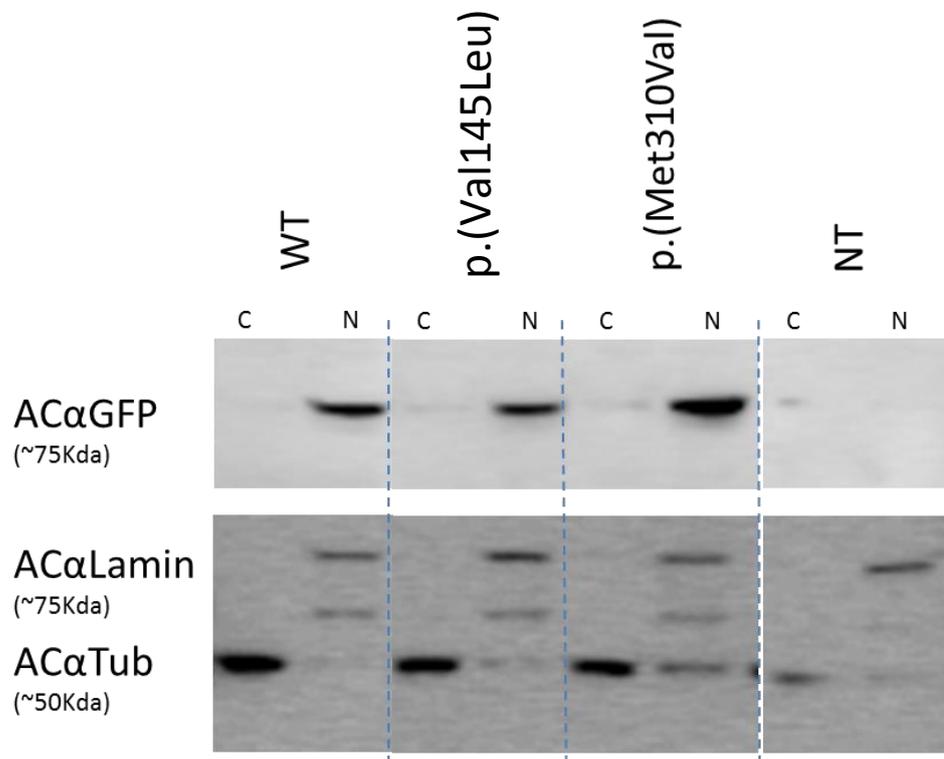


Figure 57 : Etude de l'impact des variants du gène *LEF1* sur la localisation de la protéine. Résultat du Western blot réalisé sur les fractions protéiques nucléaires et cytoplasmiques des trois variants de *LEF1* transfectés dans des HEK293T. (C : cytoplasmique, N : nucléaire, WT : plasmide *LEF1* sauvage, NT : cellules non transfectées).

Impact des variants sur l'interaction *LEF1*/promoteur *SALL4* et promoteur *TBX5*

Des tests gènes rapporteurs, étudiant l'impact des protéines LEF1 porteuses des variants, ont été réalisés à l'aide de plasmides comportant le promoteur des gènes *TBX5* ou *SALL4* suivi du gène de la luciférase. Ces derniers montrent :

- Une diminution significative de 16% ($p=0,041$) de l'expression du promoteur de *SALL4* en présence du variant c.928A>G p.(Met310Val) en comparaison à la condition sauvage (Figure 58) ;
- Aucune différence significative de l'expression du promoteur de *TBX5* en présence des protéines LEF1 porteuses des variants en comparaison à la condition sauvage (Figure 59).

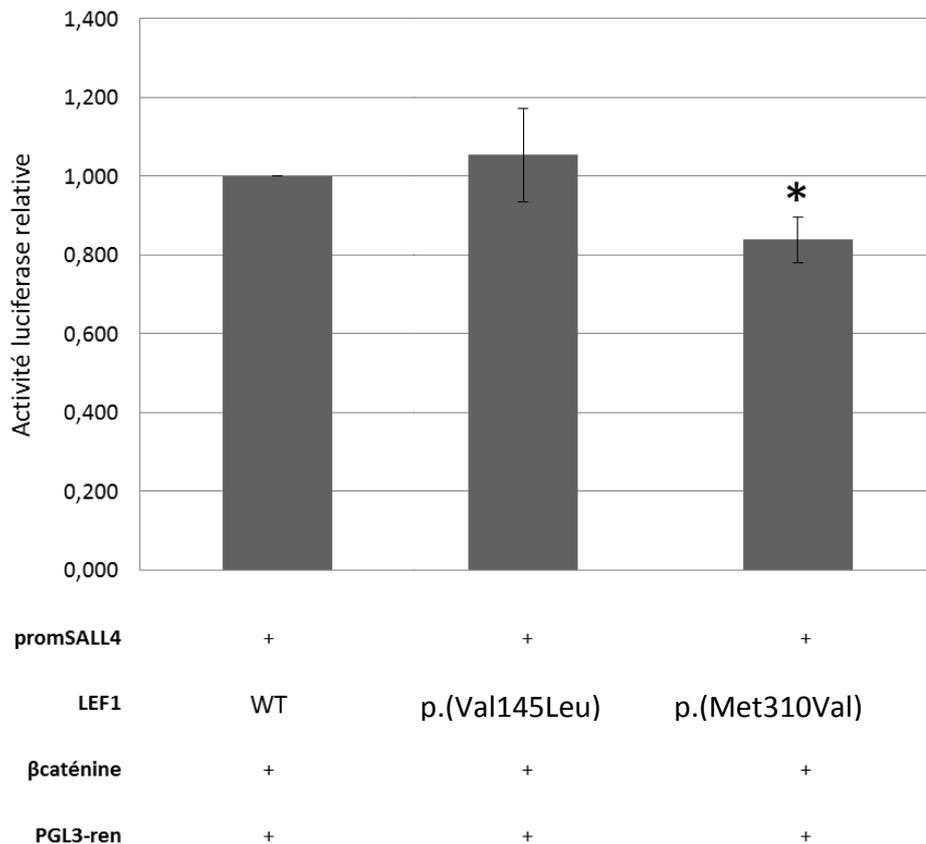


Figure 58 : Etude de l'impact des variants du gène *LEF1* sur sa fixation au promoteur de *SALL4*. Moyenne des ratios Firefly Luciferase/Renilla Luciferase, normalisés sur la condition sauvage. (* : Différence significative selon le t-test de Welch $p<0.05$)

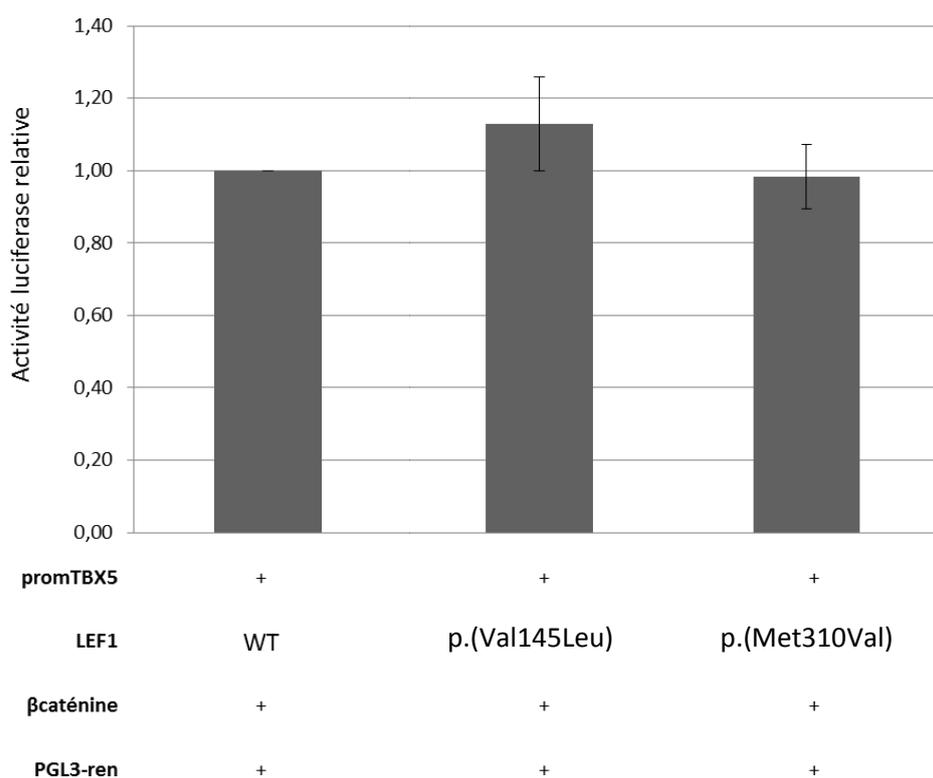


Figure 59 : Etude de l'impact des variants du gène *LEF1* sur sa fixation au promoteur de *TBX5*. Moyenne des *ratios* Firefly luciferase/Renilla luciferase, normalisés sur la condition sauvage. (* : Différence significative selon le t-test de Welch $p < 0.05$)

Interprétation de l'étude du gène *LEF1*

Nos premiers résultats montrent que la protéine LEF1 porteuse des variants est présente, à sa taille habituelle et qu'elle conserve sa localisation nucléaire (Hrckulak et al. 2016). La présence des variants ne semble donc pas engendrer d'anomalies protéiques provoquant la dégradation de la protéine par protéolyse, mécanisme de prévention de l'accumulation de protéines anormales (Creighton 1993 ; Tompa et al. 2008 ; Inobe et Matouschek 2014). Une seconde étude de la localisation de la protéine par microscopie confocale pourrait conforter ces premiers résultats mais également nous donner plus d'informations quant à sa disposition (en amas, dispersée, ...).

Cependant, une surexpression inattendue de la protéine porteuse du variant c.928A>G (p.(Met310Val)) a été détectée par Western Blot. Les variations dites « gain de fonction » sont connues, elles engendrent une surexpression de la protéine. Elles peuvent être secondaires à l'absence de fixation d'un élément répresseur ou à l'inverse à la fixation

d'un élément activateur non spécifique au niveau du site altéré (Singer et al. 2007). Dans le but de découvrir quel mécanisme de surexpression est mis en jeu ici, nous pourrions détecter, par des expériences de retard sur gel, la présence ou non d'un éventuel cofacteur sur l'une de ces séquences altérées par comparaison à la séquence sauvage.

Concernant la fonctionnalité de la protéine LEF1, nos résultats montrent que :

- Avec le promoteur de *TBX5*, aucune différence d'expression de la luciférase n'est observée en présence des protéines porteuses des variants. Ce résultat est concordant avec les données de la littérature puisque d'après les modèles murins, *Tbx5* semble agir en amont de *Lef1*. En effet, chez les souris KO *Tbx5*^{-/-}, l'expression de *Lef1* n'est pas détectable dans les membres supérieurs (Agarwal et al. 2003).
- Avec le promoteur de *SALL4* les résultats obtenus sont fonction des variants :
 - En effet, aucune différence d'expression de la luciférase n'est observée pour le variant c.433G>T (p.(Val145Leu)), localisé dans le domaine de liaison à la β caténine, suggérant que la présence du variant n'empêche pas la formation du complexe LEF1- β caténine et que les protéines mutées conservent leur fonction activatrice (Doupas et al. 2019; Korswagen et Clevers 1999). Cependant, un test de co-immunoprécipitation validant la bonne fixation de la β caténine à la protéine LEF1 mutée est nécessaire pour confirmer cette hypothèse ;
 - Avec le variant c.928A>G (p.(Met310Val)), localisé dans le domaine de liaison à l'ADN, une diminution significative de l'expression de la luciférase est observée. Ce variant, de par sa localisation, semble diminuer la fixation de LEF1^{c.928A>G} à son motif spécifique. Ceci semble concordant avec la littérature. En effet, il a déjà été démontré que l'expression de *Sall4* est diminuée chez les souris KO *Lef1*^{-/-} (Warren et al. 2007). Pour valider cette hypothèse, il est primordial de réaliser des tests d'immunoprécipitation de la chromatine permettant d'évaluer et quantifier la fixation de LEF1^{c.928A>G} au promoteur de *SALL4* (Agarwal et al. 2003 ; Böhm et al. 2006).

A ce jour, nos travaux ne nous permettent pas de trancher quant à l'implication de *LEF1* dans la pathologie de nos patients. Néanmoins, le variant c.433G>T ne semble pas avoir d'impact sur la protéine LEF1. Nous allons cependant poursuivre nos études fonctionnelles

concernant le variant c.928A>G dont la présence montre un effet significatif sur la fonction protéique notamment dans la régulation du gène *SALL4*. Il existe une boucle complexe de rétrocontrôle entre les gènes *TBX5* et *SALL4* (Koshiba-Takeuchi et al. 2006b ; Harvey 2006). De plus, il a déjà été décrit chez des modèles animaux que les protéines Tbx5 et Sall4 régulent conjointement, par la formation d'un complexe protéique, l'expression de *Fgf10* (Koshiba-Takeuchi et al. 2006a). Ces 3 gènes sont impliqués dans des syndromes aux phénotypes chevauchants, comportant notamment des anomalies radiales, tous voisins du phénotype de notre patient (Harvey 2006 ; Koshiba-Takeuchi et al. 2006a ; Clémence Vanlerberghe et al. 2019). Une diminution de l'expression de *SALL4* par $LEF1^{c.928A>G}$, pourrait engendrer par cascade une diminution de l'expression de *FGF10* voire *TBX5* et expliquer en partie le phénotype de notre patient.

Nous réaliserons dans un premier temps, un test de co-immunoprécipitation permettant de visualiser la fixation ou non, directe ou indirecte, de $LEF1^{c.928A>G}$ sur le promoteur de *SALL4*. Nous pourrions, dans un second temps, surexprimer la protéine Lef1 porteuse du variant dans un modèle *in vivo* et étudier son impact sur l'expression des gènes *Sall4*, *Fgf10* et *Tbx5* endogènes. Ainsi nous étudierons précisément le variant et nous affranchirons des modèles artificiels que sont les plasmides. Par la même occasion, nous pourrions étudier le phénotype ainsi engendrer chez l'animal et le comparer à celui de notre patient.

Nous séquencerons également ce gène chez d'autres patients porteurs d'un phénotype similaire grâce à son ajout aux panels NGS en vue d'identifier de nouveaux variants pathogènes.

Suite à la publication de notre premier variant sur le site de partage Gene Matcher (<https://genematcher.org/>), nous avons été contactés par deux équipes européennes ayant également retrouvé des variants d'intérêts dans le gène *LEF1*. Concernant ces deux variants, il s'agit de duplications d'une base retrouvées à l'état homozygote (famille consanguine), situées dans le domaine de liaison à la bêta-caténine et dont les patients présentent une hypopigmentation du cuir chevelu et des sourcils, des poils éparses, un retard de croissance, une oligodontie avec absence de glandes mammaires et de mamelons, une ectrodactylie de la main droite et des pieds. Une collaboration entre notre équipe et l'équipe Allemande va débiter et permettra de réaliser des études fonctionnelles supplémentaires. Notamment

des *pulldown assay* permettant d'évaluer la fixation de la β caténine à LEF1 mutée ainsi que le séquençage de l'ARNm permettant d'apprécier l'éventuelle dérégulation d'un transcrit par LEF1 muté.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le développement des membres est un processus complexe dont le mécanisme reste imparfaitement connu (Manouvrier-Hanu, Holder-Espinasse, et Lyonnet 1999 ; Wilkie 2003 ; Zuniga, Zeller, et Probst 2012). Depuis des dizaines d'années, le séquençage Sanger a permis de découvrir nombre de ces gènes grâce à l'identification de variants pathogènes chez des patients présentant des phénotypes similaires voire identiques. Pour exemple, c'est en 1998 que le gène *LMX1B* a été décrit comme responsable du syndrome Nail Patella après l'identification de variants pathogènes chez 3 patients, non apparentés, atteints du même phénotype (Dreyer et al. 1998 ; H. Chen et al. 1998). Un second exemple concerne le syndrome de Holt Oram dont le gène *TBX5* a été identifié comme étant le gène principalement retrouvé muté dans ce phénotype après l'identification de variants pathogènes chez des patients, non apparentés, présentant le même tableau clinique (Basson et al. 1997 ; Q. Y. Li et al. 1997). Les analyses du nombre de copies, à l'aide de PCR quantitative, MLPA et/ou CGH, ont également permis d'identifier des cibles d'intérêts tels que des éléments régulateurs : la ZRS, enhancer de *SHH* (Lettice et al. 2014), les eExons du gène *DYNC111*, enhancers des gènes *DLX5* et *DLX6* (Tayebi et al. 2014) et ont démontré l'importance des ruptures de TAD dans les malformations des membres (Lupiáñez, Spielmann, et Mundlos 2016). La fonction de ces gènes ou éléments régulateurs d'intérêt avait alors fait l'objet d'étude *in vivo* dans des modèles animaux le plus souvent murins. Ainsi, plus de 150 gènes, éléments régulateurs et remaniements génomiques ont été décrits dans le cadre de syndromes malformatifs et ont permis de mieux comprendre le processus du développement du membre (Manouvrier-Hanu, Holder-Espinasse, et Lyonnet 1999 ; Heintzman et Ren 2009 ; Spielmann et Klopocki 2013). Cependant de nombreuses anomalies des membres restent sans diagnostic moléculaire.

Actuellement, de nouvelles technologies d'étude du génome, tel que le séquençage haut débit (Collins 2003 ; J. Zhang et al. 2015 ; Jamuar et al. 2016) et l'étude des remaniements chromosomiques par CGH (Bejjani et al. 2005 ; Shinawi et Cheung 2008 ; Aradhya et al. 2012 ; Lee et al. 2012 ; Kashevarova et al. 2014 ; Cheung et Bi 2018), peuvent permettre d'identifier de nouveaux gènes. De plus leur intérêt est grandissant en termes de rendement diagnostique, de temps et de coût. A notre connaissance, aucune étude NGS n'a été rapportée dans la littérature dans le cadre de grandes cohortes de patients atteints

d'anomalies du développement touchant les membres. C'est donc grâce à l'apport de ces avancées technologiques que nous avons souhaité étudier le déterminisme moléculaire du développement des membres.

Pour ce faire nous avons analysé une très large cohorte de 684 patients, tous porteurs d'une malformation des extrémités, syndromique ou non, isolée ou non, *via* différents panels de gènes, plus ou moins larges, mais également *via* l'analyse d'exome complet et de CGH enrichie.

Ainsi, 268 patients ont été analysés par séquençage haut débit sur un panel Haloplex de 125 gènes ou régions impliqués dans le développement des membres ou sur un panel SureSelect comportant plus de 300 cibles. Ces dernières ont été choisies de par leur implication dans des pathologies humaines de type malformation des membres ou leur rôle dans les diverses boucles de signalisation du processus de développement des membres mis en évidence dans des modèles animaux.

Au terme de notre analyse, 50 variants d'intérêt ont pu être sélectionnés dans 30 gènes du panel pour 16% des patients analysés (43/268). Vingt-quatre variants ont pu être classés comme pathogènes ou probablement pathogènes permettant d'établir un diagnostic moléculaire chez 21 patients. L'analyse de ces gènes, encore non étudiés au laboratoire, nous permet donc d'améliorer le « rendement diagnostique » de 7,8%. Il atteint 35,3% alors qu'il était antérieurement de 27,5% (données du laboratoire obtenues sur une cohorte de plus de 1000 cas index étudiés entre 2000 et 2014).

L'analyse du panel +300 s'est révélée longue et fastidieuse puisque de nombreux variants ont été identifiés dans des gènes peu, voire pas, connus en pathologie humaine, nécessitant une étude bibliographique importante ainsi qu'une analyse de ségrégation presque systématique. De plus, elle n'a pas permis d'identifier de gènes d'intérêt supplémentaires. Néanmoins, ce panel, établi avec la technologie SureSelect, présente un intérêt en terme de qualité de séquences générées et d'homogénéité de couverture (Behjati et Tarpey 2013 ; Mardis 2013 ; de Kock et al. 2016). Ceci nous a permis de valider l'analyse des CNVs par des outils bioinformatiques (suite CANOE et CNVkit).

L'étude des CNVs et des SNPs en une seule et unique expérience constitue une avancée importante en termes de stratégie d'analyse. En effet, jusqu'à présent, au laboratoire, l'analyse des CNVs n'était réalisée que pour très peu de gènes (*BHLHA9*, *BTRC*, *GF5*, *HOXD13*, *LMX1B*, *ROR2*, *SALL1*, *SALL4*, *TBX4*, *TBX5*, et la *ZRS*) et par des techniques complémentaires (MLPA, qPCR). Or, l'importance de l'étude des CNVs a déjà été confirmée dans plusieurs publications (Hegele 2007 ; F. Zhang et al. 2009 ; Ionita-Laza et al. 2009 ; Ellingford et al. 2018 ; Bergant et al. 2018 ; Gross et al. 2019). Ceci est d'autant plus vrai dans les pathologies malformatives touchant les membres. En effet, de nombreux CNVs ont déjà été décrits en lien avec des syndromes malformatifs : la duplication localisée en 10q, ou du gène *BHLHA9* dans le cadre des pieds et mains fendus (F. Petit et al. 2014 ; Holder-Espinasse et al. 2019), duplication de la région *ZRS* impliquée dans les polydactylies (Lettice et al. 2003), délétions ponctuelles d'un ou plusieurs exons des gènes *LMX1B* (Yan et al. 2019), *SALL4* (Borozdin et al. 2004) et *TBX5* (Morine et al. 2015). Il est donc important d'intégrer la recherche de CNVs à toute étude moléculaire.

Grâce à cette première partie de notre étude, nous avons pu démontrer que l'analyse par séquençage haut débit d'un panel de cibles, minutieusement sélectionnées, permettrait d'obtenir un rendement de plus de 35% dans le cadre du diagnostic moléculaire des malformations des membres. Malheureusement, ce rendement n'augmente pas avec l'utilisation de plus grands panels. Nous avons donc supposé que des événements moléculaires (SNVs, CNVs) responsables des phénotypes de nos patients devaient, très probablement, se situer dans des gènes ou séquences régulatrices encore non décrits dans le développement et les pathologies affectant les membres.

Les techniques d'étude pangénomique sont nombreuses. Parmi elles, bien que de plus en plus accessible, le WES reste une technique coûteuse et dont l'analyse est fastidieuse. Cependant, son étude, dans le cadre de la recherche en génétique, chez des patients présentant un phénotype clairement établi, a déjà permis d'identifier de nombreux gènes comme responsables de la pathologie du patient (Gordon et al. 2013 ; Ghoumid et al. 2017 ; Hua et Wan 2019 ; N. Zhou et al. 2019 ; Ghaedi et al. 2019 ; Frade-Proud'Hon-Clerc et al. 2019 ; N. Zhou et al. 2019 ; Zhao et al. 2019). De plus, l'analyse d'exome en *trio* (patient et ses parents) a montré ses performances en termes de diagnostic dans les maladies rares avec des rendements pouvant atteindre 34% (Dragojlovic et al. 2018 ; Bergant et al. 2018).

Nous avons donc souhaité appliquer cette technologie à plusieurs de nos patients et nous avons réalisé un WES chez 18 d'entre eux. Ces analyses nous ont permis d'aboutir au diagnostic chez un patient (mutation de *PUF60*) et d'expliquer en partie le phénotype d'un second patient (mutation de *EYA1* ne permettant pas d'expliquer les anomalies des membres dans la famille concernée).

Il est important de noter que l'analyse de WES engendre l'apparition de données incidentes et de nombreux VSI sur lesquels il est difficile de statuer et dont l'étude bibliographique est très chronophage (Jamuar et al. 2016). Actuellement, notre équipe bioinformatique travaille sur la mise au point d'un outil qui nous permettra de détecter efficacement les CNVs au sein de nos résultats d'exome et ainsi de mettre en évidence de possibles nouveaux gènes.

Les CNVs représentant une part importante des événements responsables de malformations des membres, qui en sont paradigmatiques (F. Zhang et al. 2009 ; Spielmann et Klopocki 2013 ; Lupiáñez, Spielmann, et Mundlos 2016), nous avons choisi d'étudier ces derniers *via* la technique de CGH qui permet une analyse à la fois pangénomique et ciblée sur des zones d'intérêts grâce à l'adaptation de son design (Shinawi et Cheung 2008 ; F. Zhang et al. 2009). Grâce à l'analyse d'une CGH enrichie chez 47 patients porteurs d'ectrodactylies, chez lesquels les causes connues de SHFM avaient été écartées, nous souhaitons mettre en évidence des CNVs dans de nouveaux gènes ou régions régulatrices impliqués dans les SHFM qui constituent un beau modèle de l'implication des voies de signalisation et des éléments régulateurs intragéniques ou intergéniques dans le développement des membres (Keyal et al. 2011 ; Tayebi et al. 2014 ; F. Petit et al. 2014 ; Kantaputra et Carlson 2019). Les résultats ne nous ont malheureusement pas permis de mettre en évidence de CNV d'intérêt. Notre rendement diagnostique nul est donc très différent de celui décrit par Tayebi et al. qui est de 32% (Tayebi et al. 2014). Tout d'abord, il est important de noter que la CGH pangénomique employée par cette équipe offrait une meilleure résolution puisque celle-ci comportait 1 million de sondes réparties uniformément sur le génome, contre 400 000 pour la nôtre. Elle était donc plus à même de détecter des CNVs de petite taille. Cependant, bien que Tayebi ait analysé une très large cohorte de 134 patients atteints de SHFM, cette cohorte était très différente de la nôtre, puisque constituée sans analyse préalable. Or, l'intégralité des CNVs identifiés par Tayebi et al. est localisée dans

les gènes *TP63* (4%), *BHLHA9* (13%), *BTRC* (12%) et *DYNC1i1* (3%), tous déjà décrits dans le cadre des ectrodactylies et qui avaient été préalablement écartés chez nos patients. Or, les données du laboratoire de diagnostic montrent, sur une cohorte de 362 patients porteurs d'ectrodactylies, que le taux diagnostique atteint également 32% : 10% dup10q24, 11% *TP63*, 6% dup17, 2% *FGFR1*, 2% *DLX5/6* et 1% *WNT10B*. Ces résultats suggèrent donc que d'autres gènes ou éléments régulateurs impliqués dans ces malformations restent à identifier. Ceci est démontré par plusieurs publications récentes qui font état de nouveaux gènes identifiés dans les SHFM (gènes *ZAK*, (Kantaputra et Carlson 2019); *LRP6* et *UBA2* (Yamoto et al. 2019)). Ils seront ajoutés à nos prochains panels.

Au vu du rendement total de nos analyses obtenu par l'évaluation des diverses nouvelles technologies d'étude du génome actuellement disponibles, nous pensons que la meilleure stratégie permettant d'établir un diagnostic moléculaire rapide et fiable dans le cadre des syndromes malformatifs réside en l'étude de panels de cibles, minutieusement choisies, dont le nombre est restreint et utilisant la technologie de capture (permettant la détection simultanée de SNVs et de CNVs). A partir de ces résultats obtenus, nous avons donc établi une liste de 63 gènes de prédilection à analyser dans le cadre du diagnostic moléculaire des malformations des membres. Trois cent cinquante et un patients tout venant, porteurs d'une anomalie des extrémités, isolée ou syndromique, familiale ou sporadique, ont ainsi été analysés sur une durée de 3 ans avec la technologie SureSelect sur le panel +50.

Les données de profondeur moyenne obtenues avec ce panel montrent que, dans nos conditions d'analyse, près de 99% des séquences sont couvertes à 30X minimum. Cette valeur correspond à l'objectif que nous nous étions fixé d'après les données de la littérature. D'autre part, les résultats obtenus en termes de spécificité et de sensibilité sont très satisfaisants et comparables à ceux déjà publiés (Redin et al. 2014 ; Stoddard et al. 2014 ; Yohe et al. 2015).

Nous avons détecté 112 SNVs (70%) et 26 CNVs (16,25%) pathogènes ou probablement pathogènes chez 130 patients de notre cohorte (37%) permettant d'établir un diagnostic moléculaire chez 123 d'entre eux. Pour les 7 patients restants, un seul événement pathogène ou probablement pathogène a été identifié dans un syndrome à transmission

autosomique récessive. Quatorze des 26 CNVs, touchant les gènes *RBM8A*, *TP63*, *SF3B4*, *NOG* et l'enhancer *ECR2*, n'auraient pas été détectés auparavant au laboratoire faute de tests disponibles.

Concernant les duplications *BHLHA9* et 10q24.32 impliquées chez des patients atteints d'ectrodactylies, nous pensons qu'il serait désormais intéressant d'étudier ces CNVs par NGS et de s'affranchir de la *primo* analyse par qPCR. En effet, non seulement nous sommes désormais en mesure de détecter les CNVs grâce à l'utilisation de la technologie de capture SureSelect et à nos outils bioinformatiques développés et optimisés pour panel de gènes ; mais nous avons également identifié des mutations dans des gènes non suspectés de prime abord (*TP63*, *WNT10B*) chez des patients dont la qPCR de première intention était négative. Il nous semble plus performant de regrouper l'ensemble des investigations sur le panel NGS.

Dans cette cohorte prospective, le rendement diagnostique obtenu est de 35,2% (123/351). Il est très similaire aux rendements publiés pour d'autres types de pathologies : déficiences intellectuelles (39%) (Martínez et al. 2017), encéphalopathies épileptiques (28,5%) (Kothur et al. 2018), anomalies du développement sexuel (28,1%) (Fan et al. 2017). Ainsi, grâce à l'analyse simultanée de plusieurs gènes minutieusement sélectionnés, impliqués dans des mêmes phénotypes ou dans des phénotypes chevauchants, nous avons vu notre rendement diagnostique augmenter de 7,7% si nous comparons nos résultats datant d'avant 2014 où seulement 1 à 2 gènes étaient étudiés en Sanger par pathologie (rendement de 27,5%). Nous constatons, par ailleurs, que ce rendement est quasi égal à celui obtenu sur notre cohorte rétrospective (panel 125 et +300) et à celui du WES utilisé dans d'autre thématique (J. Wang et al. 2014 ; Dragojlovic et al. 2018 ; Bergant et al. 2018), malgré la réduction du nombre de cibles analysées.

Ainsi, au terme de cette étude, nous avons pu démontrer que les panels de gènes que nous avons pu établir à partir d'une stratégie de type « gènes candidats » nous ont permis d'obtenir :

- Une qualité bien plus élevée et une meilleure couverture de nombreux gènes (*TBX5*, *BHLHA9*, *HOXA13*,...);
- Un gain en termes de « rendement diagnostique » au moins égal à celui obtenu par WES, puisque ce gain était de +7,8% par le biais des panels ciblés *versus* 5,5% par le

WES. Cependant, le nombre de patients très différents entre les deux cohortes (268 *versus* 18) rend cette comparaison délicate ;

- Une étude en une seule et unique analyse moléculaire des SNVs et des CNVs permettant un gain de temps et de coût.

L'ensemble de ces résultats laisse penser que, chez nos patients non diagnostiqués moléculairement, les variations nucléotidiques de séquence ou en nombre de copies doivent être localisées dans des régions non codantes (UTRs, introniques profonds ou séquence régulatrice) (Florence Petit, Sears, et Ahituv 2017). Nous envisageons donc de réaliser, dans un cadre de recherche, des analyses de génome complet de patients dont le phénotype est parfaitement établi en vue d'identifier de nouvelles cibles impliquées dans leur pathologie et par conséquent dans le développement des membres.

Par ailleurs, l'étude de cette très large cohorte grâce aux nouvelles technologies d'étude du génome nous a permis d'identifier 2 gènes peu décrits en pathologie humaine, *HDAC4* et *PUF60*, ainsi que 3 gènes encore non décrits en pathologie mais dont le rôle dans le développement des membres est suspectés (cascade de signalisation, modèles animaux,...), *FMN1*, *FGF4* et *LEF1*.

La seconde partie du travail de thèse a consisté à évaluer l'impact des variants identifiés dans l'un de ces cinq gènes, *LEF1*, sur la fonction de la protéine. Bien que nos résultats soient en faveur du rôle de *LEF1* dans la pathologie de notre patient nous ne pouvons, à ce jour, affirmer son caractère pathogène. L'équipe poursuivra donc l'étude de ce dernier par des tests fonctionnels *in vitro* supplémentaires voire *in vivo*.

De même, des analyses fonctionnelles seront réalisées pour les gènes *FGF4* et *FMN1* qui nous semblent être des candidats convaincants.

Nous souhaitons également parfaire les connaissances concernant les gènes *PUF60* et *HDAC4*. Pour cela, nous avons pour projets d'établir de larges cohortes nationales, voire internationales, de patients porteurs des phénotypes décrits en lien avec ces deux gènes et d'analyser leur séquence complète (exon, intron, promoteur, UTR). Nous espérons ainsi, par la détection de variants d'intérêts dont nous analyserons la pathogénicité par des tests fonctionnels, pouvoir valider définitivement l'implication de *PUF60* et *HDAC4* en pathologie

humaine. Nous poursuivrons également la collaboration entamée avec l'équipe du Pr Angrand (INSERM 0908 *Cell Plasticity and Cancer*, Université de Lille) sur l'établissement du modèle Zebrafish permettant l'étude fondamentale du gène *HDAC4*. Nous espérons ainsi pouvoir préciser le rôle de ces gènes dans le développement des membres et leur implication dans les syndromes malformatifs présentés par nos patients.

ANNEXE I : Gènes et éléments régulateurs inclus dans nos panels cibles

Liste détaillée des cibles incluses dans les différents panels NGS élaborés : Haloplex 125, SureSelect +300 et SureSelect +50.

(Mode de transmission : AD pour autosomique dominant, AR pour autosomique récessif, XLD/XLR pour lié au chromosome X ; présence dans le panel du gène ou élément régulateur symbolisé par une croix « X » ou par « V1/V2/V3 » indiquant la version du panel, chaque nouvelle version inclue les cibles des versions précédentes)

gène	NM de référence / position chromosomique (hg19)	pathologie humaine connue (O: oui, N: non)	phénotype (#MIM)	Mode de transmission	Haloplex	SureSelect +50	SureSelect +300
ACAN	NM_013227	O	#608361 Spondyloepiphyseal dysplasia, #612813 Kimberley type; Spondyloepimetaphyseal dysplasia, aggrecan type	AD/AR			X
ACTB	NM_001101	O	#607371 Dystonia, juvenile-onset; #243310 Baraitser-Winter syndrome 1	AD	X		X
ACTG1	NM_001614	O	#614583 Baraitser-Winter syndrome 2	AD	X		X
ACTN2	NM_001103	O	#612158 Cardiomyopathy, dilated, 1AA, with or without LVNC	AD			X
ACVR1C	NM_145259	N	Pas de pathologie humaine connue, indispensable à l'embryogénèse, fortement exprimé dans les espaces interdigitaux au cours du développement du bourgeon (Jörnvall, 2004)	ND			X
ADAMTS10	NM_030957	O	#277600 Weill-Marchesani syndrome 1	AR	X		X
ADAMTS17	NM_139057	O	#613195 Weill-Marchesani syndrome 4	AR			X
AFF4	NM_014423	O	#616368 CHOPS syndrome	AD			X
AGAP1	NM_001037131	N	Pas de pathologie humaine connue, comporte un élément intronique probablement impliqué dans le développement des membres antérieurs (Zhongzhen, 2002)	ND			X
AKT3	NM_005465	O	#615937 Megalencephaly-polymicrogyria-polydactyly-hydrocephalus syndrome 2	AD			X
ALX4	NM_021926	O	#613451 Frontonasal dysplasia 2; #609597 Parietal foramina 2	AR/AD	X		X
ANKRD54	NM_138797	N	Exprimé dans le bourgeon des membres (Samuels, 2009)	ND			X
ARHGAP31	NM_020754	O	#100300 Adams-Oliver syndrome 1	AD	X	V3	X
ARL6	NM_177976	O	#600151 Bardet-Biedl syndrome 3	AR			X
ASXL1	NM_015338	O	#605039 Bohring-Opitz syndrome	AD			X
B9D1	NM_015681	O	#614209 Meckel syndrome 9; #617120 Joubert Syndrome 27	AR			X
B9D2	NM_030578	O	#614175 Meckel syndrome 10; #614175 Joubert Syndrome 34	AR			X
BBIP1	NM_001195306	O	#615995 Bardet-Biedl syndrome 18	AR			X
BBS1	NM_024649	O	#209900 Bardet-Biedl syndrome 1	AR			X

<i>BBS10</i>	NM_024685	O	#615987 Bardet-Biedl syndrome 10	AR			X
<i>BBS12</i>	NM_152618	O	#615989 Bardet-Biedl syndrome 12	AR			X
<i>BBS2</i>	NM_031885	O	#615981 Bardet-Biedl syndrome 2; #616562 Retinitis pigmentosa 74	AR			X
<i>BBS4</i>	NM_033028	O	#615982 Bardet-Biedl syndrome 4	AR			X
<i>BBS5</i>	NM_152384	O	#615983 Bardet-Biedl syndrome 5	AR			X
<i>BBS7</i>	NM_176824	O	#615984 Bardet-Biedl syndrome 7	AR			X
<i>BCOR</i>	NM_017745	O	#300166 Microphthalmia, syndromic 2	XLD			X
<i>BHLHA9</i>	NM_001164405	O	#609432 Syndactyly, mesoaxial synostotic, with phalangeal reduction; #607539 Camptosynpolydactyly complex; duplication emportant BHLHA9 impliquée dans le SHFLD	AD/AR	X	V1	X
<i>BMP2</i>	NM_001200	O	#112600 Brachydactyly, type A2; #617877 Short stature, facial dysmorphism, and skeletal anomalies with or without cardiac anomalies	AD	X	V1	X
<i>BMP4</i>	NM_001202	O	#607932 Microphthalmia, syndromic 6; #600625 Orofacial cleft 11	AD	X		X
<i>BMP7</i>	NM_001719	N	Le modèle murin présente des anomalies oculaires, rénales et parfois des polydactylies (Jena, 1997)	ND	X		X
<i>BMPR1A</i>	NM_004329	O	#174900 Juvenile polyposis syndrome, infantile form	AD	X		
<i>BMPR1B</i>	NM_001203	O	Brachydactyly type A1, D; #112600 Brachydactyly type A2 #609441 Acromesomelic dysplasia, Demirhan type; #616849	AD/AR	X	V1	X
<i>BOC</i>	NM_001301861	N	Récepteurs de surface des immunoglobuline, impliqué dans le signal SHH au niveau cérébral et du bourgeon de membre (Sanders, 2013; Gu, 2011)	ND			X
<i>BS1</i>	chr7:96195551-96195750	N	Délétion emportant <i>BS1</i> (enhancer de <i>DLX5/6</i>) impliquée dans des ectrodactylies syndromiques (Birnbaum, 2012)	ND	X	V1	
<i>BTRC</i>	NM_033637	N	Duplication 10q24.32 emportant <i>BTRC</i> impliquée dans les SHFM3 (De Mollerat et al., 2003)	AD	X	V1	X
<i>C12orf57</i>	NM_138425	O	#218340 Temtamy syndrome	AR			X
<i>C2CD3</i>	NM_001286577	O	#615948 Orofaciodigital syndrome XIV	AR			X
<i>C5orf42</i>	NM_023073	O	#614615 Joubert syndrome 17	AR			X
<i>C8orf37</i>	NM_177965	O	#617406 Bardet-Biedl syndrome 21	AR			X
<i>CACNA1C</i>	NM_000719	O	#601005 Timothy syndrome	AD			X
<i>CANT1</i>	NM_138793	O	#251450 Desbuquois dysplasia 1; #617719 Epiphyseal dysplasia, multiple, 7	AR			X
<i>CC2D2A</i>	NM_001080522	O	#216360 COACH syndrome; #612285 Joubert syndrome 9; #612284 Meckel syndrome 6	AR			X
<i>CCBE1</i>	NM_133459	O	#235510 Hennekam lymphangiectasia-lymphedema syndrome 1	AR			X
<i>CCDC22</i>	NM_014008	O	#300963 Ritscher-Schinzel syndrome 2	XLR			X
<i>CCND2</i>	NM_001759	O	#615938 Megalencephaly-polymicrogyria-polydactyly-hydrocephalus syndrome 3	AD			X
<i>CD44</i>	NM_000610	N	Nécessaire au développement du bourgeon (Sherman, 1998)	ND			X

<i>CD96</i>	NM_198196	O	#211750 C syndrome	AD	X		X
<i>CDC6</i>	NM_001254	O	#613805 Meier-Gorlin syndrome 5	AR	X		
<i>CDH3</i>	NM_001793	O	#225280 Ectodermal dysplasia, ectrodactyly, and macular dystrophy; #601553 Ectodermal dysplasia, ectrodactyly, and macular dystrophy	AR	X		X
<i>CDON</i>	NM_016952	O	#614226 Holoprosencephaly 11	AD			X
<i>CDT1</i>	NM_030928	O	#613804 Meier-Gorlin syndrome 4	AR	X		
<i>CEP120</i>	NM_153223	O	#617761 Joubert syndrome 31; #616300 Short-rib thoracic dysplasia 13 with or without polydactyly	AR			X
<i>CEP164</i>	NM_014956	O	#614845 Nephronophthisis 15	AR			X
<i>CEP290</i>	NM_025114	O	#615591 Bardet-Biedl syndrome 14; #610155 Joubert syndrome 5; #611755 Leber congenital amaurosis 10; #611134 Meckel syndrome 4	AR			X
<i>CEP41</i>	NM_018718	O	#614464 Joubert syndrome 15	AR			X
<i>CHD7</i>	NM_017780	O	#214800 CHARGE syndrome; #612370 Hypogonadotropic hypogonadism 5 with or without anosmia	AD			X
<i>CHRNA</i>	NM_005199	O	#265000 Escobar syndrome	AR			X
<i>CHSY1</i>	NM_014918	O	#605282 Temtamy preaxial brachydactyly syndrome	AR			X
<i>CKAP2L</i>	NM_152515	O	#272440 Filippi syndrome	AR			X
<i>CLCF1</i>	NM_013246	O	#610313 Cold-induced sweating syndrome 2	AR			X
<i>COL11A1</i>	NM_001854	O	#228520 Fibrochondrogenesis 1; #154780 Marshall syndrome; #604841 Stickler syndrome type II	AD/AR			X
<i>COL11A2</i>	NM_080680	O	#614524 Fibrochondrogenesis 2; #184840 Otoplastomegaly epiphyseal dysplasia, autosomal dominant; #215150 Otoplastomegaly epiphyseal dysplasia, autosomal recessive	AD/AR			X
<i>COMP</i>	NM_000095	O	#132400 Epiphyseal dysplasia, multiple, 1; #177170 Pseudoachondroplasia	AD			X
<i>CREBBP</i>	NM_004380	O	#618332 Menke-Hennekam syndrome 1; #180849 Rubinstein-Taybi syndrome 1	AD			X
<i>CRIP1</i>	NM_014171	O	#615789 Short stature with microcephaly and distinctive facies	AR			X
<i>CRMP1</i>	NM_001014809	N	expression similaire à celle d'EVC, au niveau de l'ectoderme et du membre en développement	ND			X
<i>CTNNA1</i>	NM_001904	O	cancer colorectal, mais interaction avec LEF1 dans la voie WNT (Soshnikova, 2003)	ND	X		X
<i>CTSK</i>	NM_000396	O	#265800 Pycnodysostosis	AR			X
<i>CUL4B</i>	NM_003588	O	#300354 Mental retardation, X-linked, syndromic 15 (Cabezas type)	XLR			X
<i>CYP26B1</i>	NM_019885	O	#614416 Craniosynostosis with radiohumeral fusions and other skeletal and craniofacial anomalies	ND			X
<i>DACH1</i>	NM_080759	N	Exprimé dans le membre en développement (Ayes, 2001)	ND			X
<i>DACT3</i>	NM_145056	N	Exprimé dans le mésenchyme du bourgeon de membre (Fisher, 2006)	ND			X
<i>DCHS1</i>	NM_003737	O	#601390 Van Maldergem syndrome 1	AR			X

<i>DCPS</i>	NM_014026	O	#616459 Al-Raqad syndrome	AR			X
<i>DDR2</i>	NM_006182	O	#271665 Spondylometaepiphyseal dysplasia, short limb-hand type; #618175 Warburg-Cinotti syndrome	AD/AR			X
<i>DDX48</i>	NM_014740	O	#268305 Robin sequence with cleft mandible and limb anomalies	AR			X
<i>DDX59</i>	NM_001031725	O	#174300 Orofaciodigital syndrome V	AR			X
<i>DGCR8</i>	NM_022720	N	Délétion emportant <i>DGCR8</i> impliqué dans le syndrome DiGeorges, exprimé dans le bourgeon de membre (Han, 2004)	ND			X
<i>DHCR7</i>	NM_001360	O	#270400 Smith-Lemli-Opitz syndrome	AR	X		X
<i>DHODH</i>	NM_001361	O	#263750 Miller syndrome	AR			X
<i>DIDO1</i>	NM_033081	N	Impliqué dans l'apoptose interdigitale (Garcia-Domingo, 1999)	ND			X
<i>DKK1</i>	NM_012242	N	Le modèle murin présente des syndactylies et polydactylies (Mukhopadhyay, 2001)	ND	X		X
<i>DLL4</i>	NM_019074	O	#616589 Adams-Oliver syndrome 6	AD		V3	X
<i>DLX5</i>	NM_005221	O	#220600 Split-hand/foot malformation 1 with sensorineural hearing loss	AR/AD	X	V1	X
<i>DLX6</i>	NM_005222	N	Délétion emportant <i>DLX5</i> et <i>DLX6</i> impliquée dans les SHFM1 (Shamseldin, 2012)	ND	X	V1	X
<i>DOCK6</i>	NM_020812	O	#614219 Adams-Oliver syndrome 2	AR		V3	X
<i>DSS1 SHFM1</i>	NM_001201450	O	#186300 Split hand/foot malformation 1	AD		V1	X
<i>DVL1</i>	NM_004421	O	#616331 Robinow syndrome, autosomal dominant 2	AD		V1	X
<i>DVL2</i>	NM_004422	N	Partenaire de <i>DVL1</i> et <i>DVL3</i>	ND		V1	X
<i>DVL3</i>	NM_004423	O	#616894 Robinow syndrome, autosomal dominant 3	AD		V1	X
<i>DYNC1i1</i>	NM_004411	N	Comporte des enhanceurs des gènes <i>DLX5</i> et <i>DLX6</i> dans ses exons (Birnbaum, 2012)	ND		V1	X
<i>DYNC2H1</i>	NM_001080463	O	#613091 Short-rib thoracic dysplasia 3 with or without polydactyly	AR			X
<i>EBP</i>	NM_006579	O	#300960 Chondrodysplasia punctata, X-linked dominant; #300960 MEND syndrome	XLD/XLR			X
<i>ECR2 (Enh BMP2)</i>	Chr20 :6859750-6866500	N	Séquence régulatrice du gène <i>BMP2</i> (Dathe, 2009)	AD		V1	
<i>EDARADD</i>	NM_145861	O	#614940 Ectodermal dysplasia 11A, hypohidrotic/hair/tooth type, autosomal dominant; #614941 Ectodermal dysplasia 11B, hypohidrotic/hair/tooth type, autosomal recessive	AD/AR			X
<i>EFNB1</i>	NM_004429	O	#304110 Craniofrontonasal dysplasia	XLD	X		X
<i>EFTUD2</i>	NM_004247	O	#610536 Mandibulofacial dysostosis, Guion-Almeida type	AD	X	V1	X
<i>EHMT1</i>	NM_024757	O	#610253 Kleefstra syndrome 1	AD			X
<i>EMILIN2</i>	NM_032048	N	Exprimé dans le bourgeon des membres (Doliana, 2001)	ND			X
<i>EN1</i>	NM_001426	N	Expression dans l'ectoderme ventral du bourgeon de membre (Wurst, 1994)	ND	X		X
<i>enhancer</i>	Chr9 : 12929046-	N	Séquence régulatrice de <i>LMX1B</i> (Haro, 2017)	ND		V3	

<i>LMX1B</i>	129297710						
<i>Enhancer TBX5</i>	Chr12 :114840570-114841570	N	Séquence régulatrice de <i>TBX5</i> (Nishimoto, 2015)			V3	
<i>EOGT</i>	NM_001278689	O	#615297 Adams-Oliver syndrome 4	AR		V3	X
<i>EPHA7</i>	NM_004440	N	Expression corrélée à celle de <i>HOXA13</i> et <i>HOXD13</i> dans le bourgeon du membre, comporte des sites de fixations au niveau de son promoteur pour ces deux gènes (Salsi, 2006)	ND			X
<i>ESCO2</i>	NM_001017420	O	#268300 Roberts syndrome; #269000 SC phocomelia syndrome	AR			X
<i>EVC</i>	NM_153717	O	#193530 Weyers acrofacial dysostosis; #225500 Ellis-van Creveld syndrome	AD/AR	X		X
<i>EVC2</i>	NM_147127	O	#225500 Ellis-van Creveld syndrome; #193530 Weyers acrofacial dysostosis	AD/AR	X		
<i>FAM58A</i>	NM_152274	O	#300707 STAR syndrome	XLD	X		X
<i>FANCA</i>	NM_000135	O	#227650 Fanconi anemia, complementation group A	AR			X
<i>FAT4</i>	NM_024582	O	#601390 Van Malderghem syndrome	AR			X
<i>FBLN1</i>	NM_006486	O	#608180 Synpolydactyly, 3/3'4, associated with metacarpal and metatarsal synostoses	AD	X		X
<i>FBLN2</i>	NM_001165035	N	Délétion emportant <i>FBLN2</i> responsable à des synpolydactyly	ND	X		X
<i>FBN1</i>	NM_000138	O	#102370 Acromicric dysplasia; #129600 Ectopia lentis familial; #614185 Geleophysic dysplasia 2; #616914 Marfan lipodystrophy syndrome; #154700 Marfan syndrome; #604308 MASS syndrome; #184900 Stiff skin syndrome; #608328 Weill-Marchesani syndrome 2	AD/AR			X
<i>FBN2</i>	NM_001999	O	#121050 Arachnodactylie contracturale congénitale	AD			X
<i>FBXW4</i>	NM_022039	N	Compris dans la duplication 10q24.31 impliquée dans la SHFM3 (De Mollerat et al., 2003)	ND	X	V2	X
<i>FGD1</i>	NM_004463	O	#305400 Aarskog-Scott syndrome	XLR			X
<i>FGF10</i>	NM_004465	O	#149730 LADD syndrome; #180920 Aplasia of lacrimal and salivary glands;	AD	X	V1	X
<i>FGF16</i>	NM_003868	O	#309630 Metacarpal 4-5 fusion	XLR	X	V1	X
<i>FGF17</i>	NM_003867	O	#615270 Hypogonadotropic hypogonadism 20 with or without anosmia	AD			X
<i>FGF18</i>	NM_003862	N	Modèle murin présent une hypoplasie fibulaire, un retard de fermeture de la voute crânienne, des anomalies costales et maxillaires (Davidson, 2005)	ND			X
<i>FGF2</i>	NM_002006	N	Impliqué dans le voie des <i>FGFs</i> , dans le développement des membres	ND	X		X
<i>FGF4</i>	NM_002007	N	Impliqué dans la boucle épidermo-mésenchymateuse lors du développement du membre	ND	X		X
<i>FGF8</i>	NM_033163	O	#612702 Hypogonadotropic hypogonadism 6 with or without anosmia	AD	X	V2	X
<i>FGF9</i>	NM_002010	O	#612961 Multiple synostoses syndrome 3	AD	X	V1	X
<i>FGFR1</i>	NM_023110	O	#615465 Hartsfield syndrome; #147650 Hypogonadotropic hypogonadism 2 with or without anosmia; #123150 Jackson-Weiss syndrome; #166250 Osteoglophonic dysplasia; #101600 Pfeiffer syndrome; #190440 Trigonocephaly 1	AD	X	V1	X

<i>FGFR2</i>	NM_000141	O	#207410 Antley-Bixler syndrome without genital anomalies or disordered steroidogenesis; #101200 Apert syndrome; #614592 Bent bone dysplasia syndrome; #101600 Craniofacial-skeletal-dermatologic dysplasia; #123500 Crouzon syndrome; #123150 Jackson-Weiss syndrome; #149730 LADD syndrome; #101600 Pfeiffer syndrome; #101400 Saethre Chotzen syndrome; #609579 Scaphocephaly, maxillary retrusion, and mental retardation	AD	X	V1	X
<i>FGFR3</i>	NM_000142	O	#100800 Achondroplasia; #610474 CATSHL syndrome; #612247 Crouzon syndrome; #146000 Hypochondroplasia; #149730 LADD syndrome; #602849 Muenke syndrome	AD/AR	X	V1	X
<i>FIG4</i>	NM_014845	O	#611228 Charcot-Marie-Tooth disease; #216340 Yunis-Varon syndrome	AR			X
<i>FLNA</i>	NM_001110556	O	#300048 Congenital short bowel syndrome; #305620 Frontometaphyseal dysplasia 1; #309350 Melnick-Needles syndrome; #311300 Otopalatodigital syndrome, type I; #304120 Otopalatodigital syndrome, type II; #300244 Terminal osseous dysplasia	XLD/XLR	X		X
<i>FLNB</i>	NM_001457	O	#108720 Atelosteogenesis, type I; #108721 Atelosteogenesis, type II; #112310 Bommerang dysplasia; #150250 Larsen syndrome; #272460 Spondylocarpotarsal synostosis syndrome	AD/AR			X
<i>FMN1</i>	NM_001277313	N	Modèle murin présente une réduction et une fusion des extrémités	ND	X		X
<i>FRAS1</i>	NM_025074	O	#219000 Fraser syndrome	AR	X		X
<i>FREM2</i>	NM_207361	O	#123570 Cryptophthalmos, unilateral or bilateral, isolated; #617666 Fraser syndrome 2	AR	X		X
<i>FTO</i>	NM_001080432	O	#612938 Growth retardation, developmental delay, facial dysmorphism	AR			X
<i>GAS1</i>	NM_002048	N	Modèle murin présente des holoprocéphalies, intervient dans la voie SHH (Allen, 2007)	ND			X
<i>GDF11</i>	NM_005881	N	Modèle murin présente des transformations homéotiques des membres postérieurs (McPherron, 1999)	ND			X
<i>GDF5</i>	NM_000557	O	#201250 Acromesomelic dysplasia, Hunter-Thompson type; #615072 Brachydactyly type A1, C; #112600 Brachydactyly type A2; #113100 Brachydactyly type C; #200700 Chondrodysplasia Grebe type; #228900 Du Pan syndrome; #610017 Multiple synostosis syndrome 2; #615298 Symphalangism proximal 1B	AD/AR	X	V1	X
<i>GDF6</i>	NM_001001557	O	#118100 Klippel-Feil syndrome 1, autosomal dominant; #61536 Leber congenital amaurosis 17; #617898 Multiple synostoses syndrome 4	AD/AR			X
<i>GJA1</i>	NM_000165	O	#218400 Craniometaphyseal dysplasia, autosomal recessive; #164200 Oculodentodigital dysplasia; #186100 Syndactyly type III	AD/AR	X	V2	X
<i>GLI2</i>	NM_005270	O	#61584 Culler-Jones syndrome; #610829 Holoprosencephaly 9	AD		V3	X
<i>GLI3</i>	NM_000168	O	#175700 Greig cephalopolysyndactyly syndrome; #146510 Pallister-Hall syndrome; #174200 Polydactyly postaxial types A1 and B; #174700 Polydactyly preaxial type IV	AD	X	V1	X
<i>GLIS1</i>	NM_147193	N	Exprimé dans le bourgeon de membre (Kim, 2002)	ND			X
<i>GNAS</i>	NM_000516	O	Pseudohypoparathyroïdie d'Albright	AD	X	V1	X
<i>GPC3</i>	NM_004484	O	#312870 Simpson-Golabi-Behmel syndrome, type 1	XLR			X
<i>GREM1</i>	NM_013372	N	Antagoniste des BMPs	ND			X
<i>GREM2</i>	NM_022469	O	#617275 Tooth agenesis, selective, 9	AD			X
<i>GRIP1</i>	NM_021150	O	#617667 Fraser syndrome 3	AR			X

<i>HAND2</i>	NM_021973	N	Délétion emportant <i>HAND2</i> responsable d'ectrodactylie (Niedrist, 2009)	ND	X		
<i>HDAC4</i>	NM_006037	N	Compris dans la délétion 2q37 impliquée dans le syndrome d'Albright (brachydactylie, obésité et déficience intellectuelle (Wheeler, 2014)	ND	X	V1	X
<i>HDAC6</i>	NM_006044	O	#30086 Chondrodysplasia with platyspondyly, distinctive brachydactyly, hydrocephaly, and microphthalmia	XLD			X
<i>HDAC8</i>	NM_001166419	O	#300882 Cornelia de Lange syndrome 5	XLD	X		X
<i>HESX1</i>	NM_003865	O	#182230 Growth hormone deficiency with pituitary anomalies; #182230 Septooptic dysplasia	AD/AR			X
<i>HHIP</i>	NM_022475	N	Impliqué dans le signal Hedgehog notamment via IHH (Back, 2001)	ND			X
<i>HIC1</i>	NM_001098202	N	Modèle murin présente un syndrome polymalformatif avec anomalies des membres, exprimé dans le bourgeon de membres, des délétions emportant <i>HIC1</i> sont impliquées dans le Miller-Dicker (Carter, 2000)	ND			X
<i>HIRA</i>	NM_003325	N	Grande délétion emportant <i>HIRA</i> sont impliquées dans le syndrome DiGeorges, exprimé dans le bourgeon de membre (Wilming, 1997)	ND			X
<i>HNRNPK</i>	NM_002140	O	#616580 Au-Kline syndrome	AD			X
<i>HOXA11</i>	NM_005523	O	#605432 Radioulnar synostosis with amegakaryocytic thrombocytopenia 1	AD	X	X	
<i>HOXA13</i>	NM_000522	O	#176305 Guttmacher syndrome; #140000 Hand-foot-uterus syndrome	AD	X	V1	X
<i>HOXD10</i>	NM_002148	O	#192950 Charcot-Marie-Tooth disease, foot deformity of	AD	X		X
<i>HOXD11</i>	NM_021192	N	Cluster <i>HOX</i>	ND			X
<i>HOXD12</i>	NM_021193	N	Cluster <i>HOX</i>	ND	X		X
<i>HOXD13</i>	NM_000523	O	#610713 Brachydactyly-syndactyly syndrome; #113200 Brachydactyly type D; #113300 Brachydactyly type E; #186300 syndactyly type V; #186000 Synpolydactyly 1	AD	X	V1	X
<i>HOXD9</i>	NM_014213	N	Cluster <i>HOX</i>	ND			X
<i>HYLS1</i>	NM_145014	O	#236680 Hydrolethalus syndrome	AR			X
<i>ICK</i>	NM_016513	O	#612651 Endocrine osteocerebrodysplasia				X
<i>IFT122</i>	NM_052985	O	#218330 Cranioectodermal dysplasia 1	AR			X
<i>IFT140</i>	NM_014714	O	#617781 Retinitis pigmentosa 80; #266920 Short-rib thoracic dysplasia 9 with or without polydactyly	AR			X
<i>IFT172</i>	NM_015662	O	#616394 Retinitis pigmentosa 71; #615630 Short-rib thoracic dysplasia 10 with or without polydactyly	AR			X
<i>IFT27</i>	NM_006860	O	#615996 Bardet-Biedl syndrome 19	AR			X
<i>IFT43</i>	NM_052873	O	#614099 Cranioectodermal dysplasia 3; #617871 Retinitis pigmentosa 81; #617866 Short-rib thoracic dysplasia 18 with polydactyly	AR			X
<i>IFT54</i>	NM_015650	O	#616629 Senior-Loken syndrome 9	AR			X
<i>IFT80</i>	NM_020800	O	#611263 Short-rib thoracic dysplasia 2 with or without polydactyly	AR			X
<i>IHH</i>	NM_002181	O	#112500 Brachydactyly type A1/ #607778 Acrocapitofemoral dysplasia	AD/AR	X	V1	X

<i>IL11RA</i>	NM_001142784	O	#614188 Craniosynostosis and dental anomalies	AR			X
<i>IMPAD1</i>	NM_017813	O	#614078 Chondrodysplasia with joint dislocations, GPAPP type	AR			X
<i>INPP5E</i>	NM_019892	O	#213300 Joubert syndrome 1	AR			X
<i>IRF6</i>	NM_006147	O	#119500 Popliteal pterygium syndrome 1; #119300 van der Woude syndrome	AD	X		X
<i>JAG2</i>	NM_002226	N	modèle murin présente une fusion langue-palais, une fente palatine et des syndactylies (Jiang, 1998)	ND			X
<i>KAT6B</i>	NM_012330	O	#606170 Genitopatellar syndrome; #603736 SBBYSS syndrome	AD			X
<i>KCNJ2</i>	NM_000891	O	#170390 Andersen syndrome	AD			X
<i>KCP</i>	NM_001135914	N	Exprimé dans le bourgeon de membre et dans la voie des BMPs (Lin, 2005)	ND			X
<i>KDM5C/JARID1C</i>	NM_004187	O	#300534 Mental retardation, X-linked, syndromic, Claes-Jensen type	XLR			X
<i>KIAA0196</i>	NM_014846	O	#220210 Ritscher-Schinzel syndrome 1	AR			X
<i>KIAA0586/TALPID3</i>	NM_001244189	O	#616490 Joubert syndrome 23; #616546 Short-rib thoracic dysplasia 14 with polydactyly	AR			X
<i>KIF26B</i>	NM_018012	N	Exprimé dans le bourgeon de membre, le rein et le système nerveux central, réprimé par SALL1, le modèle murin présente des anomalies rénales (Uchiyama, 2010)	ND			X
<i>KIF7</i>	NM_198525	O	#607131 Al-Gazali-Bakalynova syndrome; #200990 Joubert syndrome 12	AR			X
<i>KMT2A</i>	NM_001197104	O	#605130 Wiedemann-Steiner syndrome	AD			X
<i>LARM</i>	Chr9 : 12929046-129297710	N	Séquence régulatrice de <i>LMX1B</i> (Haro, 2017)	AD		V3	
<i>LBH</i>	NM_030915	N	Impliqué dans de développement précoce du bourgeon (Briegel, 2001)	ND			X
<i>LBN/EVC2</i>	NM_147127	O	#225500 Ellis-van Creveld syndrome; #193530 Weyers acrofacial dysostosis	AD/AR			X
<i>LBR</i>	NM_002296	O	#613471 Reynolds syndrome; #215140 Greenberg skeletal dysplasia; #169400 Pelger-Huet anomaly; #618019 Pelger-Huet anomaly with mild skeletal anomalies	AD/AR			X
<i>LBX1</i>	NM_006562	N	Compris dans la duplication 10q24.31 impliquée dans la SHFM3 (De Mollerat et al., 2003)	AD		V2	X
<i>LEF1</i>	NM_016269	N	Interaction avec <i>SALL4</i> (Bhöm, 2006)	ND	X	V1	X
<i>LIX1</i>	NM_153234	N	Exprimé dans le bourgeon de membre (Swindell, 2001)	ND			X
<i>LMBR1</i>	NM_022458	O	#200500 Acheiropody; #188740 Hypoplastic or aplastic tibia with polydactyly; #135750 Laurin-Sandrow syndrome; #174500 Polydactyly, preaxial type II; #186200 Syndactyly, type IV; #174500 Triphalangeal thumb, type I	AD/AR	X		X
<i>LMNA</i>	NM_170707	O	#605588 Charcot-Marie-Tooth disease, type 2B1	AR			X
<i>LMO4</i>	NM_003476	N	Exprimé dans le mésenchyme dorsal du bourgeon de membre (Kenny, 1998)	ND			X
<i>LMX1B</i>	NM_002316	O	#161200 Nail-patella syndrome	AD	X	V1	X
<i>LNP</i>	NM_016359	O	#618090 Neurodevelopmental disorder with epilepsy and hypoplasia of the corpus callosum	AR			X

<i>LRP4</i>	NM_002334	O	#616304 Myasthenic syndrome, congenital, 17; #212780 Cenani-Lenz syndactyly syndrome	AR	X		X
<i>LRP5</i>	NM_002335	O	#607634 Osteopetrosis, autosomal dominant 1; #259770 Osteoporosis-pseudoglioma syndrome; #607636 van Buchem disease, type 2; #601884 Bone mineral density variability 1	AD	X		X
<i>LRP6</i>	NM_002336	O	#616724 Tooth agenesis, selective, 7	AD	X		X
<i>LTBP2</i>	NM_000428	O	#614819 Weill-Marchesani syndrome 3, recessive	AR			X
<i>LUNAPARK/LNP/KIAA1715</i>	NM_001305008	O	#618090 Neurodevelopmental disorder with epilepsy and hypoplasia of the corpus callosum	AR			X
<i>LZTFL1</i>	NM_020347	O	#615994 Bardet-Biedl syndrome 17	AR			X
<i>MAF</i>	NM_005360	O	#601088 Ayme-Gripp syndrome	AD			X
<i>MATN3</i>	NM_002381	O	#608728 Spondyloepimetaphyseal dysplasia; #607078 Epiphyseal dysplasia, multiple, 5	AD/AR			X
<i>MBOAT1</i>	NM_001080480	N	Point de cassure décrit, interrompant MBOAT1, chez un patient présentant une brachydactylie et syndactylie (Dauwers, 2007)	ND			X
<i>MED12</i>	NM_005120	O	#309520 Lujan-Fryns syndrome; #300895 Ohdo syndrome, X-linked; #305450 Opitz-Kaveggia syndrome	XLR			X
<i>MEGF8</i>	NM_001271938	O	#614976 Carpenter type 2	AR			X
<i>MEIS1</i>	NM_002398	N	Impliqué dans le développement des membres via les gènes <i>HOX</i> (Mercader, 1999)	ND	X		X
<i>MEIS2</i>	NM_170677	O	#600987 Cleft palate, cardiac defects, and mental retardation	AD	X		X
<i>MEOX1</i>	NM_004527	O	#214300 Klippel-Feil syndrome 2	AR			X
<i>MEOX2</i>	NM_005924	N	#214300 Klippel-Feil syndrome 2	ND			X
<i>MGA</i>	NM_001164273	N	Exprimé dans le bourgeon de membre (Hurlin, 2000)	ND			X
<i>MIPOL1</i>	NM_138731	N	Localisé au point de translocation d'un patient présentant une polydactylie en miroir (kamnasaran, 2003)	ND	X		X
<i>MIR17HG</i>	chr13:92000074-92006829	O	#614326 Feingold syndrome 2	AD	X		X
<i>MKKS</i>	NM_018848	O	#605231 Bardet-Biedl syndrome 6; #236700 McKusick-Kaufman syndrome	AR			X
<i>MKS1</i>	NM_017777	O	#615990 Bardet-Biedl syndrome 13; #217121 Joubert syndrome 28; #249000 Meckel syndrome 1	AR			X
<i>MRPS16</i>	NM_016065	O	#610498 Combined oxidative phosphorylation deficiency 2	AR			X
<i>MSX1</i>	NM_002448	O	#189500 Ectodermal dysplasia 3, Witkop type; #608874 Orofacial cleft 5; #106600 Tooth agenesis, selective, 1, with or without orofacial cleft	AD	X		X
<i>MSX2</i>	NM_002449	O	#604737 Craniosynostosis 2; #168500 Parietal foramina 1; #168550 Parietal Foramina with cleidocranial dysplasia	AD	X		X
<i>MXD3</i>	NM_031300	N	Exprimé dans le bourgeon de membres	ND			X
<i>MYCN</i>	NM_005378	O	#164280 Feingold syndrome 1	AD			X
<i>NAA10</i>	NM_003491	O	#309800 Microphthalmia, syndromic 1; #300855 Odgen syndrome	XLD/XLR			X

<i>NEK1</i>	NM_001199397	O	#263520 Short-rib thoracic dysplasia 6 with or without polydactyly	AR			X
<i>NEURL1B</i>	NM_001142651	N	Exprimé dans le bourgeon de membre et dans le signal NOTCH (Rullinkov, 2009)	ND			X
<i>NFE2L2</i>	NM_006164	O	#617744 Immunodeficiency, developmental delay, and hypohomocysteinemia	AD			X
<i>NIPB2/TRAPPC9</i>	NM_031466	O	#613192 Mental retardation, autosomal recessive 13	AR	X		
<i>NIPBL</i>	NM_133433	O	#122470 Cornelia de Lange syndrome 1	AD			X
<i>NOG</i>	NM_005450	O	#611377 Brachydactyly, type B2; #186500 Multiple synostoses ; #185800 Symphalangism proximal 1A	AD	X	V1	X
<i>NOTCH1</i>	NM_017617	O	#616028 Adams-Oliver syndrome 5	AD		V3	X
<i>NPR2</i>	NM_003995	O	#602875 Acromesomelic dysplasia, Maroteaux type; #615923 Epiphyseal chondrodysplasia, Miura type	AD/AR			X
<i>NRBP2</i>	NM_178564	N	Grande délétion emportant NRBP2 impliquée dans le Verheij syndrome	ND			X
<i>NSDHL</i>	NM_015922	O	#308050 CHILD syndrome	XLD			X
<i>OFD1/CxOrf5</i>	NM_003611	O	#300804 Joubert syndrome 10; #311200 Orofaciodigital syndrome I; #300209 Simpson-Golabi-Behmel syndrome, type 2	XLD/XLR			X
<i>ORC1</i>	NM_004153	O	#224690 Meier-Gorlin syndrome 1	AR	X		X
<i>ORC4</i>	NM_001190879	O	#613800 Meier-Gorlin syndrome 2	AR	X		
<i>ORC6</i>	NM_014321	O	#613803 Meier-Gorlin syndrome 3	AR	X		
<i>OSR2</i>	NM_001286841	N	Exprimé dans le bourgeon de membres, les modèles murins présentent des fentes labio palatines (Lan, 2001)	ND			X
<i>PAX3</i>	NM_181457	O	#122880 Craniofacial-deafness-hand syndrome; #193500 Waardenburg syndrome	AD			X
<i>PBX1</i>	NM_002585	O	#617641 Congenital anomalies of kidney and urinary tract syndrome with or without hearing loss, abnormal ears, or developmental delay	AD	X		X
<i>PCGF1</i>	NM_032673	N	Exprimé précocément dans le bourgeon de membre (Nunes, 2001)	ND			X
<i>PCQAP/MED15</i>	NM_001003891	N	Grande délétion emportant MED15 impliquée dans le syndrome de DiGeorges	ND			X
<i>PDE3A</i>	NM_000921	O	#112410 Hypertension and brachydactyly syndrome	AD			X
<i>PDE4D</i>	NM_001104631	O	#614613 Acrodysostosis 2, with or without hormone resistance	AD			X
<i>PDE6D</i>	NM_002601	O	#615665 Joubert syndrome 22	AR			X
<i>PDGFRB</i>	NM_002609	O	#616592 Kosaki overgrowth syndrome	AD			X
<i>PDLIM7</i>	NM_005451	N	Modèle ebrfish présente des anomalies pectorales (Camarata, 2010)	ND	X		X
<i>PHGDH</i>	NM_006623	O	#256520 Neu-Laxova syndrome 1; #601815 Phosphoglycerate dehydrogenase deficiency	AR			X
<i>PIEZO2</i>	NM_022068	O	#248700 Marden-Walker syndrome; #114300 Arthrogryposis distal	AD			X
<i>PIK3R2</i>	NM_005027	O	#603387 Megalencephaly-polymicrogyria-polydactyly-hydrocephalus syndrome 1	AD			X
<i>PITX1</i>	NM_002653	O	#119800 Clubfoot, congenital, with or without deficiency of long bones and/or mirror-image polydactyly	AD	X	V1	X

<i>POC1A</i>	NM_015426	O	#614813 Short stature, onychodysplasia, facial dysmorphism, and hypotrichosis	AR			X
<i>POLL</i>	NM_001174084	N	Compris dans la duplication 10q24.31 impliquée dans la SHFM3 (De Mollerat et al., 2003)	AD	X	V1	X
<i>POLR1A</i>	NM_015425	O	#616462 Acrofacial dysostosis, Cincinnati type	AD			X
<i>POR</i>	NM_000941	O	#201750 Antley-Bixler syndrome with genital anomalies and disordered steroidogenesis	AR			X
<i>PORCN</i>	NM_203475	O	#305600 Focal dermal hypoplasia	XLD			X
<i>PRKAR1A</i>	NM_002734	O	#101800 Acrodysostosis 1, with or without hormone resistance; #160980 Carney complex, type 1	AD			X
<i>PRRX1</i>	NM_006902	O	#202650 Agnathia-otocephaly complex	AD/AR	X		X
<i>PRRX2</i>	NM_016307	N	Modèle murin présente des polydactylies et anoamies craniofaciales (Berge, 1998)	ND	X		X
<i>PTCH1</i>	NM_000264	O	#610828 Holoprosencephaly 7	AD			X
<i>PTCH2</i>	NM_003738	O	#109400 Meier Gorlin				X
<i>PTDSS1</i>	NM_014754	O	#151050 Lenz-Majewski hyperostotic dwarfism	AD			X
<i>PTEN</i>	NM_000314	O	#158350 Cowden syndrome 1; #605309 Macrocephaly/autism syndrome	AD			X
<i>PTHB1</i>	NM_198428	O	#615986 Bardet-Biedl syndrome 9	AR			X
<i>PTHLH</i>	NM_198965	O	#613382 Brachydactyly, type E2	AD	X	V1	X
<i>PUF60</i>	NM_078480	O	#615583 Verheij syndrome	AD		V3	X
<i>PVRL1</i>	NM_002855	O	#225060 Cleft lip/palate-ectodermal dysplasia syndrome; #225060 Orofacial cleft 7	AR			X
<i>PVRL4</i>	NM_030916	O	#613573 Ectodermal dysplasia-syndactyly syndrome 1	AR			X
<i>RAB23</i>	NM_183227	O	#201000 Carpenter syndrome	AR			X
<i>RAB33B</i>	NM_031296	O	#615222 Smith-McCort dysplasia 2	AR			X
<i>RAD21</i>	NM_006265	O	#611376 Mungan syndrome; #614701 Cornelia de Lange syndrome 4	AD/AR	X		X
<i>RBBP8</i>	NM_002894	O	#251255 Jawad syndrome; #606744 Seckel syndrome 2	AR			X
<i>RBM10</i>	NM_005676	O	#311900 TARP syndrome	XLR			X
<i>RBM8A</i>	NM_005105	O	#274000 Thrombocytopenia-absent radius syndrome	AR	X	V1	X
<i>RBPJ</i>	NM_005349	O	#614814 Adams-Oliver syndrome 3	AD		V3	X
<i>RDH10</i>	NM_172037	N	Modèle murin présente une phocomélie (Sandell, 2007)	ND			X
<i>RECQL3</i>	NM_000057	O	#210900 Bloom syndrome	AR			X
<i>RECQL4</i>	NM_004260	O	#218600 Baller-Gerold syndrome; #266280 RAPADILINO syndrome; #268400 Rothmund Thomson syndrome	AR	X	V1	X
<i>RFNG</i>	NM_002917	N	Exprimé dans l'ectoderme dorsal, réprimé par EN1, impliqué dans la mise en place de l'AER (Lauffer, 1997)	ND			X
<i>RIPK4</i>	NM_020639	O	#214350 CHAND syndrome; #263650 Popliteal pterygium syndrome, Bartsocas-Papas type	AR			X

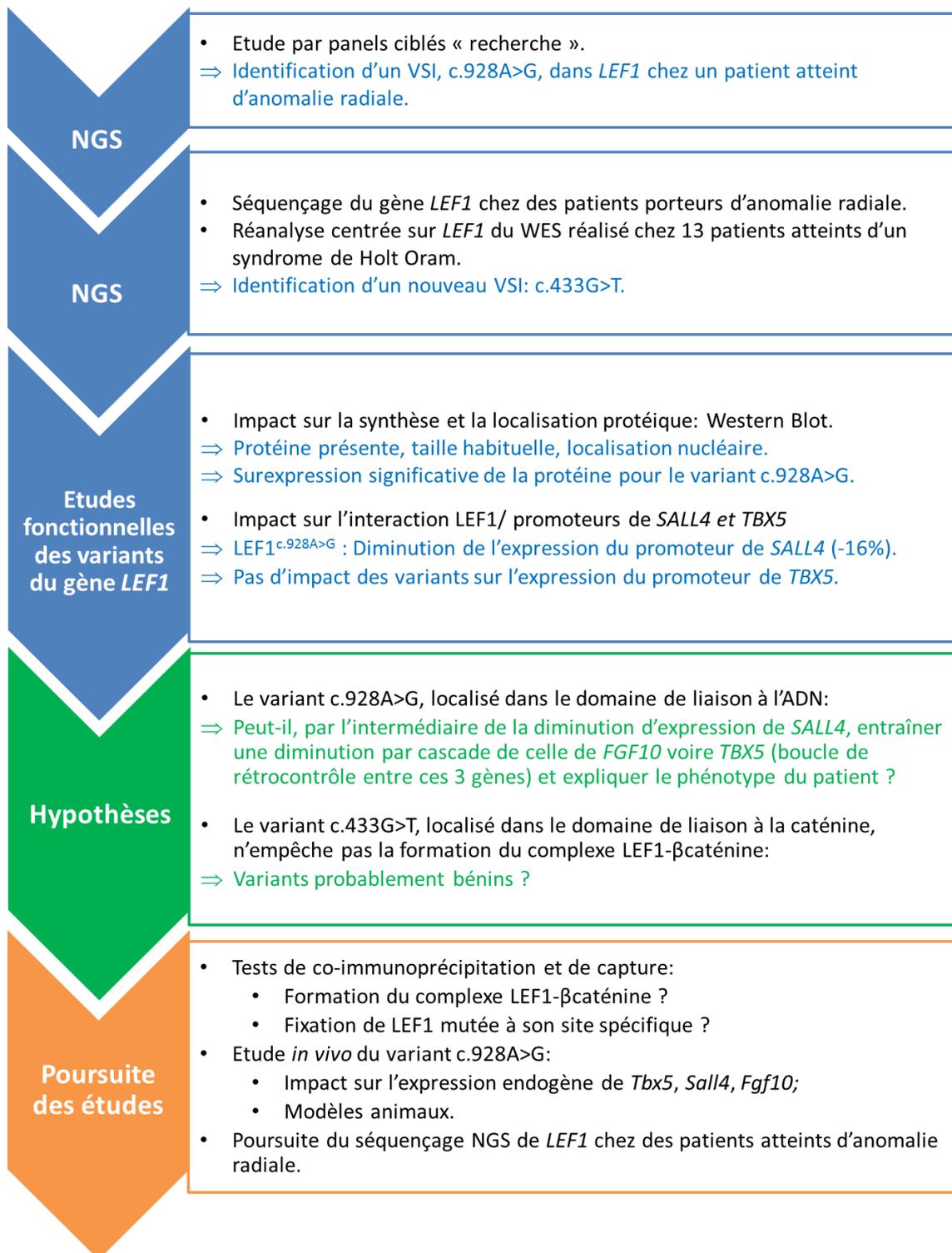
<i>RMRP</i>	chr9:35657748-35658015	O	#607095 Anauxetic dysplasia 1; #250250 Cartilage-hair hypoplasia; #250460 Metaphyseal dysplasia without hypotrichosis	AR	X		X
<i>RNF12</i>	NM_183353	O	#300978 Tonne-Kalscheuer syndrome	XL			X
<i>ROR2</i>	NM_004560	O	#113000 Brachydactyly type B1; #268310 Robinow syndrome	AD/AR	X	V1	X
<i>RPGRIPL1</i>	NM_015272	O	#216360 COACH syndrome; #612285 Joubert syndrome 9; #612284 Meckel syndrome 6	AR			X
<i>RPL35A</i>	NM_000996	O	#612528 Diamond-Blackfan anemia 5	AD			X
<i>RPS11</i>	NM_001015	O	#105650 Diamond-Blackfan anemia 1				X
<i>RPS17</i>	NM_001021	O	#612527 Diamond-Blackfan anemia 4	AD			X
<i>RPS19</i>	NM_001022	O	#105650 Diamond-Blackfan anemia 1	AD			X
<i>RPS24</i>	NM_033022	O	#610629 Diamond-blackfan anemia 3	AD			X
<i>RPS5</i>	NM_001009	N	#105650 Diamond-Blackfan anemia 1	ND			X
<i>RSPO1</i>	NM_001038633	O	#610644 Palmoplantar hyperkeratosis and true hermaphroditism	AR	X		
<i>RSPO4</i>	NM_001029871	O	#206800 Anonychia congenita	AR			X
<i>RUNX2</i>	NM_001024630	O	#119600 Cleidocranial dysplasia; #156510 Metaphyseal dysplasia with maxillary hypoplasia with or without brachydactyly	AD	X		X
<i>SALL1</i>	NM_002968	O	#107480 Townes-Brocks syndrome 1	AD	X	V1	X
<i>SALL4</i>	NM_020436	O	#607323 Duane-radial ray / Okinoh syndrome	AD	X	V1	X
<i>SC5DL</i>	NM_006918	O	#607330 Lathosterolosis	AR	X		X
<i>SCRIB</i>	NM_182706	N	Grande délétion emportant SCRIB impliquée dans le Verheij syndrome	ND			X
<i>SCUBE1</i>	NM_173050	N	Exprimé dans le bourgeon des membres (Grimmond, 2000)	ND			X
<i>SDCCAG8</i>	NM_006642	O	#615993 Bardet-Biedl syndrome 16	AR			X
<i>SEMA3E</i>	NM_012431	O	#214800 CHARGE syndrome	AD			X
<i>SETBP1</i>	NM_015559	O	#269150 Schinzel-Giedion midface retraction syndrome	AD			X
<i>SF3B4</i>	NM_005850	O	#154400 Acrofacial dysostosis 1, Nager type	AD	X	V1	X
<i>SFRP1</i>	NM_003012	N	Impliqué dans la voie WNT (Gopinathan, 2019)	ND	X		
<i>SHH</i>	NM_000193	O	#142945 Holoprosencephaly 3; #611638 Microphthalmia with coloboma 5; #269160 Schizencephaly	AD	X		X
<i>SHOX</i>	NM_000451	O	#2497800 Langer mesomelic dysplasia; #127300 Leri-Weill dyschondrosteosis; #300582 Short stature, idiopathic familial	ND			X
<i>SHOX2</i>	NM_003030	N	Modèle murin présente une absence d'humérus et de fémur (Blaschke, 1998)	ND			X
<i>SIX4</i>	NM_017420	N	Comporte des enhanceurs des gènes DLX5 et DLX6 dans ses exons (Birnbaum, 2012)	ND			X
<i>SLC25A13</i>	NM_014251	O	#603471 Citrullinemia, adult-onset type II; #605814 Citrullinemia, type II neonatal	AR			X

<i>SLC26A2</i>	NM_000112	O	#600972 Achondrogenesis Ib; #256050 Atelosteogenesis, type II; #222600 Diastrophic dysplasia, broad bone-platyspondylic variant; #226900 Epiphyseal dysplasia, multiple, 4	AR			X
<i>SLC35D1</i>	NM_015139	O	#269250 Schneckenbecken dysplasia	AR			X
<i>SLCO5A1</i>	NM_030958	N	Grande délétion emportant <i>SLCO5A1</i> impliquée dans la dysplasie mésomélique et la synostose distale (Isidor, 2010)	ND			X
<i>SLURP1</i>	NM_020427	O	#248300 Meleda disease	AR			X
<i>SMAD1</i>	NM_005900	N	Impliqué dans le voie des BMPs (Han, 2013)	ND	X		
<i>SMAD2</i>	NM_005901	N	Impliqué dans le voie des BMPs	ND			X
<i>SMAD4</i>	NM_005359	O	#139210 Myhre syndrome	AD			X
<i>SMAD6</i>	NM_005585	N	Impliqué dans le voie des BMPs (Han, 2013)	ND	X		
<i>SMAD7</i>	NM_005904	N	Impliqué dans le voie des BMPs (Han, 2013)	ND	X		
<i>SMARCA2</i>	NM_003070	O	#601358 Nicolaidis-Baraitser syndrome	AD			X
<i>SMC1A</i>	NM_006306	O	#300590 Cornelia de Lange syndrome 2	XLD	X		X
<i>SMC3</i>	NM_005445	O	#610759 Cornelia de Lange syndrome 3	AD	X		X
<i>SMOC1</i>	NM_001034852	O	#206920 Microphthalmia with limb anomalies	AR			X
<i>SMURF1</i>	NM_020429	N	Impliqué dans le voie SHH (Yu, 2014)	ND	X		X
<i>SOST</i>	NM_025237	O	#122860 Craniodiaphyseal dysplasia, autosomal dominant; #269500 Sclerosteosis 1; #239100 Van Buchem disease	AD/AR			X
<i>SOX14</i>	NM_004189	N	Exprimé dans l'AER (Wilmore, 2000)	ND			X
<i>SOX9</i>	NM_000346	O	#114290 Acampomelic campomelic dysplasia	AD	X		
<i>SP6</i>	NM_001258248	N	Modèle murin présente des anomalies des doigts, de la peau et des dents (Talamillo, 2010)	ND			X
<i>SP8</i>	NM_182700	N	Modèle murin présente une amputation des membres (Bell, 2003)	ND			X
<i>SPRY4</i>	NM_030964	O	#615266 Hypogonadotropic hypogonadism 17 with or without anosmia	AD	X		
<i>STAMBP</i>	NM_006463	O	#614261 Microcephaly-capillary malformation syndrome	AR			X
<i>STX16</i>	NM_001001433	O	#603233 Pseudohypoparathyroidism, type IB	AD			X
<i>SUFU</i>	NM_016169	O	#617757 Joubert syndrome 32	AR			X
<i>SULF1</i>	NM_001128205	N	Grande délétion emportant <i>SULF1</i> responsable de dysplasie mésomélique et de synostose distale (Isidor, 2010)	ND			X
<i>TBC1D24</i>	NM_001199107	O	#220500 DOORS syndrome	AR			X
<i>TBC1D32</i>	NM_152730	N	Modèle murin présente des encéphalies et des polydactylies préaxiales	ND			X
<i>TBX15</i>	NM_152380	O	#260660 Cousin syndrome	AR	X		X

TBX18	NM_001080508	O	#143400 Congenital anomalies of kidney and urinary tract 2	AD	X		
TBX2	NM_005994	O	#618223 Vertebral anomalies and variable endocrine and T-cell dysfunction	AD	X		X
TBX20	NM_001077653	O	#611363 Atrial septal defect 4	ND			X
TBX22	NM_001109878	O	#303400 Cleft palate with ankyloglossia	XL	X		
TBX3	NM_005996	O	#181450 Ulnar-mammary syndrome	AD	X	V1	X
TBX4	NM_018488	O	#147891 Ischiocoxopodopatellar syndrome with or without pulmonary arterial hypertension	AD	X	V1	X
TBX5	NM_000192	O	#142900 Holt-Oram syndrome	AD	X	V1	X
TCF	NM_001258355	O	#615314 Craniosténose type 3	AD	X		
TCF12	NM_207036	O	#615314 Craniosynostosis 3	AD			X
TCTN2	NM_024809	O	#613885 Meckel syndrome 8; #616654 Joubert syndrome 4	AR			X
TCTN3	NM_015631	O	#614815 Joubert syndrome 18; #258860 Orofaciodigital syndrome IV	AR			X
TFAP2A	NM_003220	O	#113620 Branchiooculofacial syndrome	AD			X
TFAP2B	NM_003221	O	#169100 Char syndrome	AD	X		X
TGDS	NM_014305	O	#61645 Catel-Manzke syndrome	AR			X
TMEM107	NM_032354	O	#617562 Joubert syndrome 29; #617562 Meckel syndrome 13; #617563 Orofaciodigital syndrome XVI	AR			X
TMEM138	NM_016464	O	#614465 Joubert syndrome 16	AR			X
TMEM216	NM_001173990	O	#608091 Joubert syndrome 2; #603194 Meckel syndrome 2	AR			X
TMEM231	NM_001077416	O	#614970 Joubert syndrome 20; #615397 Meckel syndrome 11	AR			X
TMEM237	NM_001044385	O	#614424 Joubert syndrome 14	AR			X
TMEM67	NM_153704	O	#216360 COACH syndrome; #610688 Joubert syndrome 6; #607361 Meckel Syndrome	AR			X
TOB1	NM_005749	N	Interaction avec SMAD (Yoshida, 2000)	ND	X		
TOB2	NM_016272	N	Interaction avec SMAD (Yoshida, 2000)	ND	X		
TP63	NM_003722	O	#103285 ADULT syndrome; #604292 Ectrodactyly, ectodermal dysplasia, and cleft lip/palate syndrome 3; #106260 Hay-Wells syndrome; #603543 Limb-mammary syndrome; #618149 Orofacial cleft 8; #129400 Rapp-Hodgkin syndrome; #605289 Split-hand/foot malformation 4	AD	X	V1	X
TRAF3IP1	NM_015650	O	#616629 Senior-Loken syndrome 9	AR			X
TRIM32	NM_012210	O	#615988 Bardet-Biedl syndrome 11; #254110 Muscular dystrophy, limb-girdle, autosomal recessive 8	AR			X
TRPS1	NM_014112	O	#190350 Trichorhinophalangeal syndrome, type I	AD	X	V1	X
TRPV4	NM_021625	O	#606835 Digital arthropathy-brachydactyly, familial	AD			X
TTC21B	NM_024753	O	#613819 Short-rib thoracic dysplasia 4 with or without polydactyly	AR			X

<i>TTC8</i>	NM_198309	O	#615985 Bardet-Biedl syndrome 8	AR			X
<i>TULP3</i>	NM_001160408	N	Modèle murin présente des anomalies du tubes neural et des polydactylies préaxiales (Patterson, 2009)	ND			X
<i>TWIST1</i>	NM_000474	O	#123100 Craniosynostosis 1; #180750 Robinow-Sorauf syndrome; #101400 Saethre-Chotzen syndrome with or without eyelid anomalies; #617746 Sweeney Cox syndrome	AD	X		X
<i>TWIST2</i>	NM_057179	O	#200110 Ablepharon-macrostomia syndrome; #209885 Barber-Say syndrome; #227260 Focal facial dermal dysplasia 3, Setleis type	AD/AR			X
<i>UNC5D</i>	NM_080872	N	Exprimé dans le bourgeon de membre et la glande mammaire (Wang, 2008)	ND			X
<i>UQCC2</i>	NM_032340	O	#615824 Mitochondrial complex III deficiency, nuclear type 7	AR			X
<i>WDPCP</i>	NM_015910	O	#615992 Bardet-Biedl syndrome 15; #217085 Congenital heart defects, hamartomas of tongue, and polysyndactyly	AR			X
<i>WDR19</i>	NM_025132	O	#614378 Cranioectodermal dysplasia 4; #614376 Short-rib thoracic dysplasia 5 with or without polydactyly	AR			X
<i>WDR34</i>	NM_052844	O	#615633 Short-rib thoracic dysplasia 11 with or without polydactyly	AR			X
<i>WDR35</i>	NM_001006657	O	#613610 Cranioectodermal dysplasia 2; #614091 Short-rib thoracic dysplasia 7 with or without polydactyly	AR			X
<i>WDR60</i>	NM_018051	O	#615503 Short-rib thoracic dysplasia 8 with or without polydactyly	AR			X
<i>WNT10B</i>	NM_003394	O	#225300 Split-hand/foot malformation 6	AR	X	V1	X
<i>WNT3</i>	NM_030753	O	#273395 Tetra-amelia syndrome 1	AR	X	V3	X
<i>WNT5A</i>	NM_003392	O	#180700 Robinow syndrome, autosomal dominant 1	AD	X	V1	X
<i>WNT7A</i>	NM_004625	O	#228930 Fuhrmann syndrome; #276820 Ulna and fibula, absence of, with severe limb deficiency/ Al Awadi-Raas-Rothschild syndrome	AR	X	V1	X
<i>WNT8B</i>	NM_003393	N	Exprimé au cours du développement (majlinda, 1998)	ND	X		
<i>WNT9A</i>	NM_003395	N	Impliqué dans la formation des articulations (Hartmann, 2001)	ND			X
<i>WSB1</i>	NM_015626	N	Interaction avec PTHLH (Dentice, 2005)	ND			X
<i>ZBTB16</i>	NM_006006	O	#612447 Skeletal defects, genital hypoplasia, and mental retardation	AR	X		X
<i>ZBTB7A</i>	NM_006006	N	Exprimé dans le bourgeon des membres et le signal NOTCH	ND			X
<i>ZIC3</i>	NM_003413	O	#314390 VACTERL association, X-linked	XLR			X
<i>ZNF141</i>	NM_003441	O	#615226 Polydactyly, postaxial, type A6	AR	X		X
<i>ZRS</i>	chr7:156583083-156584789	O	#188740 Tibial aplasia polydactyly; #135750 Laurin Sandrow; #186200 Syndactyly type V; #174500 preaxial polydactyly type 2; #200500 Acheiropody	AD	X	V1	
<i>ZSWIM6</i>	NM_020928	O	#603671 Acromelic frontonasal dysostosis	AD			X

ANNEXE II : Organigramme complet de l'étude du gène *LEF1*, hypothèses et perspectives.



BIBLIOGRAPHIE

- Agarwal, Pooja, John N. Wylie, Juan Galceran, Oksana Arkhitko, Cuiling Li, Chuxia Deng, Rudolf Grosschedl, et Benoit G. Bruneau. 2003. « Tbx5 Is Essential for Forelimb Bud Initiation Following Patterning of the Limb Field in the Mouse Embryo ». *Development (Cambridge, England)* 130 (3): 623-33.
- Ansorge, W., H. Voss, U. Wirkner, C. Schwager, J. Stegemann, R. Pepperkok, J. Zimmermann, et H. Erfle. 1989. « Automated Sanger DNA Sequencing with One Label in Less than Four Lanes on Gel ». *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 20 (1): 47-52.
- Aradhya, Swaroop, Rachel Lewis, Tahra Bonaga, Nnenna Nwokekeh, Amanda Stafford, Barbara Boggs, Kathleen Hruska, et al. 2012. « Exon-Level Array CGH in a Large Clinical Cohort Demonstrates Increased Sensitivity of Diagnostic Testing for Mendelian Disorders ». *Genetics in Medicine* 14 (6): 594-603. <https://doi.org/10.1038/gim.2011.65>.
- Arce, L, N N Yokoyama, et M L Waterman. 2006. « Diversity of LEF/TCF Action in Development and Disease ». *Oncogene* 25 (57): 7492-7504. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210056>.
- Bandyopadhyay, Amitabha, Kunikazu Tsuji, Karen Cox, Brian D. Harfe, Vicki Rosen, et Clifford J. Tabin. 2006. « Genetic Analysis of the Roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in Limb Patterning and Skeletogenesis ». *PLoS Genetics* 2 (12): e216. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020216>.
- Basson, C. T., D. R. Bachinsky, R. C. Lin, T. Levi, J. A. Elkins, J. Soultz, D. Grayzel, et al. 1997. « Mutations in Human TBX5 [Corrected] Cause Limb and Cardiac Malformation in Holt-Oram Syndrome ». *Nature Genetics* 15 (1): 30-35. <https://doi.org/10.1038/ng0197-30>.
- Behjati, Sam, et Patrick S. Tarpey. 2013. « What Is next Generation Sequencing? » *Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition* 98 (6): 236-38. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>.
- Bejjani, Bassem A, Aaron P Theisen, Blake C Ballif, et Lisa G Shaffer. 2005. « Array-Based Comparative Genomic Hybridization in Clinical Diagnosis ». *Expert Review of Molecular Diagnostics* 5 (3): 421-29. <https://doi.org/10.1586/14737159.5.3.421>.
- Bénazet, Jean-Denis, Mirko Bischofberger, Eva Tiecke, Alexandre Gonçalves, James F. Martin, Aimée Zuniga, Felix Naef, et Rolf Zeller. 2009. « A Self-Regulatory System of Interlinked Signaling Feedback Loops Controls Mouse Limb Patterning ». *Science (New York, N.Y.)* 323 (5917): 1050-53. <https://doi.org/10.1126/science.1168755>.
- Bergant, Gaber, Ales Maver, Luca Lovrecic, Goran Čuturilo, Alenka Hodzic, et Borut Peterlin. 2018. « Comprehensive Use of Extended Exome Analysis Improves Diagnostic Yield in Rare Disease: A Retrospective Survey in 1,059 Cases ». *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 20 (3): 303-12. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.142>.
- Birnbaum, Ramon Y., David B. Everman, Karl K. Murphy, Fiorella Gurrieri, Charles E. Schwartz, et Nadav Ahituv. 2012. « Functional Characterization of Tissue-Specific Enhancers in the DLX5/6 Locus ». *Human Molecular Genetics* 21 (22): 4930-38. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddc336>.
- Boeke, J. D., G. Church, A. Hessel, N. J. Kelley, A. Arkin, Y. Cai, R. Carlson, et al. 2016. « The Genome Project-Write ». *Science* 353 (6295): 126-27. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6850>.
- Böhm, Johann, Claudio Sustmann, Christian Wilhelm, et Jürgen Kohlhase. 2006. « SALL4 Is Directly Activated by TCF/LEF in the Canonical Wnt Signaling Pathway ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 348 (3): 898-907. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.07.124>.
- Borozdin, W., D. Boehm, M. Leipoldt, C. Wilhelm, W. Reardon, J. Clayton-Smith, K. Becker, et al. 2004. « SALL4 Deletions Are a Common Cause of Okhiro and Acro-Renal-Ocular Syndromes and Confirm Haploinsufficiency as the Pathogenic Mechanism ». *Journal of Medical Genetics* 41 (9): e113. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.019901>.
- Bottomley, Matthew J., Paola Lo Surdo, Paolo Di Giovine, Agostino Cirillo, Rita Scarpelli, Federica Ferrigno, Philip Jones, et al. 2008. « Structural and Functional Analysis of the Human HDAC4 Catalytic Domain Reveals a Regulatory Structural Zinc-Binding Domain ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (39): 26694-704. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803514200>.
- Boulet, Anne M., et Mario R. Capecchi. 2012. « Signaling by FGF4 and FGF8 Is Required for Axial Elongation of the Mouse Embryo ». *Developmental Biology* 371 (2): 235-45. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.08.017>.
- Brunelle, Perrine, Anne-Sophie Jourdain, Fabienne Escande, Jelena Martinovic, Juliette Dupont, Tiffany Busa, Anne Moncla, et al. 2019. « WNT10B Variants in Split Hand/Foot Malformation: Report of Three Novel

- Families and Review of the Literature ». *American Journal of Medical Genetics. Part A* 179 (7): 1351-56. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61177>.
- Cadigan, K. M., et M. L. Waterman. 2012. « TCF/LEFs and Wnt Signaling in the Nucleus ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (11): a007906-a007906. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007906>.
- Capellini, Terence D., Vincenzo Zappavigna, et Licia Selleri. 2011. « Pbx Homeodomain Proteins: TALEnted Regulators of Limb Patterning and Outgrowth ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 240 (5): 1063-86. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22605>.
- Carvill, Gemma L., et Heather C. Mefford. 2015. « Next-Generation Sequencing in Intellectual Disability ». *Journal of Pediatric Genetics* 4 (3): 128-35. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1564439>.
- Chen, H., Y. Lun, D. Ovchinnikov, H. Kokubo, K. C. Oberg, C. V. Pepicelli, L. Gan, B. Lee, et R. L. Johnson. 1998. « Limb and Kidney Defects in Lmx1b Mutant Mice Suggest an Involvement of LMX1B in Human Nail Patella Syndrome ». *Nature Genetics* 19 (1): 51-55. <https://doi.org/10.1038/ng0598-51>.
- Chen, Haixu, et Randy L. Johnson. 2002. « Interactions between Dorsal-Ventral Patterning Genes Lmx1b, Engrailed-1 and Wnt-7a in the Vertebrate Limb ». *The International Journal of Developmental Biology* 46 (7): 937-41.
- Cheng, Yu-Wei, Christopher A Tan, Agata Minor, Kelly Arndt, Latrice Wysinger, Dorothy K Grange, Beth A Kozel, et al. 2014. « Copy number analysis of NIPBL in a cohort of 510 patients reveals rare copy number variants and a mosaic deletion ». *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 2 (2): 115-23. <https://doi.org/10.1002/mgg3.48>.
- Cheung, Sau W, et Weimin Bi. 2018. « Novel Applications of Array Comparative Genomic Hybridization in Molecular Diagnostics ». *Expert Review of Molecular Diagnostics* 18 (6): 531-42. <https://doi.org/10.1080/14737159.2018.1479253>.
- Chiang, C., Y. Litingtung, M. P. Harris, B. K. Simandl, Y. Li, P. A. Beachy, et J. F. Fallon. 2001. « Manifestation of the Limb Prepatterning: Limb Development in the Absence of Sonic Hedgehog Function ». *Developmental Biology* 236 (2): 421-35. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0346>.
- Collins, F. S. 2003. « The Human Genome Project: Lessons from Large-Scale Biology ». *Science* 300 (5617): 286-90. <https://doi.org/10.1126/science.1084564>.
- Creighton, Thomas E. 1993. *Proteins: Structures and Molecular Properties*. W. H. Freeman.
- Crossley, P. H., et G. R. Martin. 1995. « The Mouse Fgf8 Gene Encodes a Family of Polypeptides and Is Expressed in Regions That Direct Outgrowth and Patterning in the Developing Embryo ». *Development (Cambridge, England)* 121 (2): 439-51.
- Cunningham, Thomas J., Joseph J. Lancman, Marie Berenguer, P. Duc Si Dong, et Gregg Duester. 2018. « Genomic Knockout of Two Presumed Forelimb Tbx5 Enhancers Reveals They Are Nonessential for Limb Development ». *Cell Reports* 23 (11): 3146-51. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.052>.
- Cygan, J. A., R. L. Johnson, et A. P. McMahon. 1997. « Novel Regulatory Interactions Revealed by Studies of Murine Limb Pattern in Wnt-7a and En-1 Mutants ». *Development (Cambridge, England)* 124 (24): 5021-32.
- Dai, Limeng, Dan Liu, Min Song, Xueqing Xu, Gang Xiong, Kang Yang, Kun Zhang, Hui Meng, Hong Guo, et Yun Bai. 2014. « Mutations in the Homeodomain of HOXD13 Cause Syndactyly Type 1-c in Two Chinese Families ». *PLoS One* 9 (5): e96192. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096192>.
- Daniels, Danette L., et William I. Weis. 2005. « Beta-Catenin Directly Displaces Groucho/TLE Repressors from Tcf/Lef in Wnt-Mediated Transcription Activation ». *Nature Structural & Molecular Biology* 12 (4): 364-71. <https://doi.org/10.1038/nsmb912>.
- Danyel, Magdalena, Fanny Kortüm, Katarina Dathe, Kerstin Kutsche, et Denise Horn. 2018. « Autosomal Dominant Robinow Syndrome Associated with a Novel DVL3 Splice Mutation ». *American Journal of Medical Genetics. Part A* 176 (4): 992-96. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38635>.
- Dauber, Andrew, Christelle Golzio, Cécile Guenot, Francine M. Jodelka, Maria Kibaek, Susanne Kjaergaard, Bruno Leheup, et al. 2013. « SCRIB and PUF60 Are Primary Drivers of the Multisystemic Phenotypes of the 8q24.3 Copy-Number Variant ». *American Journal of Human Genetics* 93 (5): 798-811. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.09.010>.
- David, A., M. Vincent, M.-P. Quéré, T. Lefrançois, E. Frampas, et A. David. 2016. « Brachydactylies isolées et syndromiques : apport de la radiographie des mains ». [/data/revues/22115706/v97i1/S2211570616000126/ mars. https://www.em-consulte.com/en/article/1039237](https://www.em-consulte.com/en/article/1039237).

- DeLaurier, April, Cynthia Lizzet Alvarez, et Kali J. Wiggins. 2019. « Hdac4 Mediates Perichondral Ossification and Pharyngeal Skeleton Development in the Zebrafish ». *PeerJ* 7: e6167. <https://doi.org/10.7717/peerj.6167>.
- Dhamija, Radhika, et Chelsea Chambers. 2015. « Diagnostic NGS for Severe Neuromuscular Disorders ». *Pediatric Neurology Briefs* 29 (11): 82. <https://doi.org/10.15844/pedneurbriefs-29-11-1>.
- Dijk, Erwin L. van, Hélène Auger, Yan Jaszczyszyn, et Claude Thermes. 2014. « Ten Years of Next-Generation Sequencing Technology ». *Trends in Genetics: TIG* 30 (9): 418-26. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.07.001>.
- Dimitrov, B. I., T. de Ravel, J. Van Driessche, C. de Die-Smulders, A. Toutain, J. R. Vermeesch, J. P. Fryns, K. Devriendt, et P. Debeer. 2010. « Distal Limb Deficiencies, Micrognathia Syndrome, and Syndromic Forms of Split Hand Foot Malformation (SHFM) Are Caused by Chromosome 10q Genomic Rearrangements ». *Journal of Medical Genetics* 47 (2): 103-11. <https://doi.org/10.1136/jmg.2008.065888>.
- Dohrn, Maike F., Nicola Glöckle, Lejla Mulahasanovic, Corina Heller, Julia Mohr, Christine Bauer, Erik Riesch, et al. 2017. « Frequent Genes in Rare Diseases: Panel-Based next Generation Sequencing to Disclose Causal Mutations in Hereditary Neuropathies ». *Journal of Neurochemistry* 143 (5): 507-22. <https://doi.org/10.1111/jnc.14217>.
- Doumpas, Nikolaos, Franziska Lampart, Mark D. Robinson, Antonio Lentini, Colm E. Nestor, Claudio Cantù, et Konrad Basler. 2019. « TCF/LEF Dependent and Independent Transcriptional Regulation of Wnt/ β -Catenin Target Genes ». *The EMBO Journal* 38 (2). <https://doi.org/10.15252/embj.201798873>.
- Dragojlovic, Nick, Alison M. Elliott, Shelin Adam, Clara van Karnebeek, Anna Lehman, Jill C. Mwenifumbo, Tanya N. Nelson, Christèle du Souich, Jan M. Friedman, et Larry D. Lynd. 2018. « The Cost and Diagnostic Yield of Exome Sequencing for Children with Suspected Genetic Disorders: A Benchmarking Study ». *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 20 (9): 1013-21. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.226>.
- Dreyer, S. D., G. Zhou, A. Baldini, A. Winterpacht, B. Zabel, W. Cole, R. L. Johnson, et B. Lee. 1998. « Mutations in LMX1B Cause Abnormal Skeletal Patterning and Renal Dysplasia in Nail Patella Syndrome ». *Nature Genetics* 19 (1): 47-50. <https://doi.org/10.1038/ng0598-47>.
- Duboc, Veronique, et Malcolm P. O. Logan. 2011. « Regulation of Limb Bud Initiation and Limb-Type Morphology ». *Developmental Dynamics* 240 (5): 1017-27. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22582>.
- Eastman, Q., et R. Grosschedl. 1999. « Regulation of LEF-1/TCF Transcription Factors by Wnt and Other Signals ». *Current Opinion in Cell Biology* 11 (2): 233-40.
- El Chehadeh, Salima, Wilhelmina S. Kerstjens-Frederikse, Julien Thevenon, Paul Kuentz, Ange-Line Bruel, Christel Thauvin-Robinet, Candace Bensignor, et al. 2016. « Dominant Variants in the Splicing Factor PUF60 Cause a Recognizable Syndrome with Intellectual Disability, Heart Defects and Short Stature ». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 25 (1): 43-51. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2016.133>.
- Ellingford, Jamie M, Bradley Horn, Christopher Campbell, Gavin Arno, Stephanie Barton, Catriona Tate, Sanjeev Bhaskar, et al. 2018. « Assessment of the Incorporation of CNV Surveillance into Gene Panel Next-Generation Sequencing Testing for Inherited Retinal Diseases ». *Journal of Medical Genetics* 55 (2): 114-21. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-104791>.
- Elliott, A. M., J. A. Evans, et A. E. Chudley. 2005. « Split Hand Foot Malformation (SHFM) ». *Clinical Genetics* 68 (6): 501-5. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2005.00530.x>.
- Estefanía, E., R. Ramírez-Camacho, M. Gomar, A. Trinidad, B. Arellano, J. R. García-Berrocal, J. M. Verdaguer, et C. Vilches. 2006. « Point Mutation of an EYA1-Gene Splice Site in a Patient with Oto-Facio-Cervical Syndrome ». *Annals of Human Genetics* 70 (Pt 1): 140-44. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2005.00204.x>.
- Fan, Yanjie, Xia Zhang, Lili Wang, Ruifang Wang, Zhuo Huang, Yu Sun, Ruen Yao, et al. 2017. « Diagnostic Application of Targeted Next-Generation Sequencing of 80 Genes Associated with Disorders of Sexual Development ». *Scientific Reports* 7: 44536. <https://doi.org/10.1038/srep44536>.
- Feldman, B., W. Poueymirou, V. E. Papaioannou, T. M. DeChiara, et M. Goldfarb. 1995. « Requirement of FGF-4 for Postimplantation Mouse Development ». *Science (New York, N.Y.)* 267 (5195): 246-49. <https://doi.org/10.1126/science.7809630>.
- Fernandez-Teran, Marian, et Maria A. Ros. 2008. « The Apical Ectodermal Ridge: Morphological Aspects and Signaling Pathways ». *The International Journal of Developmental Biology* 52 (7): 857-71. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072416mf>.

- Fisher, A. L., et M. Caudy. 1998. « Groucho Proteins: Transcriptional Corepressors for Specific Subsets of DNA-Binding Transcription Factors in Vertebrates and Invertebrates ». *Genes & Development* 12 (13): 1931-40. <https://doi.org/10.1101/gad.12.13.1931>.
- Flöttmann, Ricarda, Bjørnt K Kragesteen, Sinje Geuer, Magdalena Socha, Lila Allou, Anna Sowińska-Seidler, Laure Bosquillon de Jarcy, et al. 2018. « Noncoding Copy-Number Variations Are Associated with Congenital Limb Malformation ». *Genetics in Medicine* 20 (6): 599-607. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.154>.
- Frade-Proud'Hon-Clerc, Sara, Thomas Smol, Frédéric Frenois, Olivier Sand, Emmanuel Vaillant, Véronique Dhennin, Amélie Bonnefond, et al. 2019. « A Novel Rare Missense Variation of the NOD2 Gene: Evidences of Implication in Crohn's Disease ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (4). <https://doi.org/10.3390/ijms20040835>.
- Furniss, D, S-h Kan, I B Taylor, D Johnson, P S Critchley, H P Giele, et A O M Wilkie. 2009. « Genetic Screening of 202 Individuals with Congenital Limb Malformations and Requiring Reconstructive Surgery ». *Journal of Medical Genetics* 46 (11): 730-35. <https://doi.org/10.1136/jmg.2009.066027>.
- Galceran, J., I. Fariñas, M. J. Depew, H. Clevers, et R. Grosschedl. 1999. « Wnt3a-/-like Phenotype and Limb Deficiency in Lef1(-/-)Tcf1(-/-) Mice ». *Genes & Development* 13 (6): 709-17.
- Ghaedi, Hamid, Samira Molaei Ramsheh, Maryam Erfanian Omidvar, Afsaneh Labbaf, Elham Alehabib, Sanaz Akbari, Fatemeh Pourfatemi, et Hossein Darvish. 2019. « Whole-exome sequencing identified a novel mutation of MLH1 in an extended family with lynch syndrome ». *Genes & Diseases*, juillet. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.07.011>.
- Ghosh, T. K., E. A. Packham, A. J. Bonser, T. E. Robinson, S. J. Cross, et J. D. Brook. 2001. « Characterization of the TBX5 Binding Site and Analysis of Mutations That Cause Holt-Oram Syndrome ». *Human Molecular Genetics* 10 (18): 1983-94. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.18.1983>.
- Ghoulid, Jamal, Florence Petit, Muriel Holder-Espinasse, Anne-Sophie Jourdain, José Guerra, Anne Dieux-Coeslier, Martin Figeac, Nicole Porchet, Sylvie Manouvrier-Hanu, et Fabienne Escande. 2016. « Nail-Patella Syndrome: Clinical and Molecular Data in 55 Families Raising the Hypothesis of a Genetic Heterogeneity ». *European Journal of Human Genetics* 24 (1): 44-50. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.77>.
- Ghoulid, Jamal, Morgane Stichelbout, Anne-Sophie Jourdain, Frederic Frenois, Sophie Lejeune-Dumoulin, Marie-Pierre Alex-Cordier, Marine Lebrun, et al. 2017. « Blepharocheilodontic Syndrome Is a CDH1 Pathway-Related Disorder Due to Mutations in CDH1 and CTNND1 ». *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 19 (9): 1013-21. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.11>.
- Giese, K., A. Amsterdam, et R. Grosschedl. 1991. « DNA-Binding Properties of the HMG Domain of the Lymphoid-Specific Transcriptional Regulator LEF-1 ». *Genes & Development* 5 (12B): 2567-78. <https://doi.org/10.1101/gad.5.12b.2567>.
- Gordon, Christopher T., Florence Petit, Peter M. Kroisel, Linda Jakobsen, Roseli Maria Zechi-Ceide, Myriam Oufadem, Christine Bole-Feysot, et al. 2013. « Mutations in Endothelin 1 Cause Recessive Auriculocondylar Syndrome and Dominant Isolated Question-Mark Ears ». *American Journal of Human Genetics* 93 (6): 1118-25. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.10.023>.
- Gordon, Christopher T, Florence Petit, Myriam Oufadem, Charles Decaestecker, Anne-Sophie Jourdain, Joris Andrieux, Valérie Malan, et al. 2012. « EFTUD2 Haploinsufficiency Leads to Syndromic Oesophageal Atresia ». *Journal of Medical Genetics* 49 (12): 737-46. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-101173>.
- Grandel, Heiner, et Michael Brand. 2011. « Zebrafish Limb Development Is Triggered by a Retinoic Acid Signal during Gastrulation ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 240 (5): 1116-26. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22461>.
- Green, Eric. 2015. « Twenty-five years of big biology » 526 (7571): 29-31. <https://doi.org/10.1038/526029a>.
- Green, Eric D., Mark S. Guyer, et National Human Genome Research Institute. 2011. « Charting a Course for Genomic Medicine from Base Pairs to Bedside ». *Nature* 470 (7333): 204-13. <https://doi.org/10.1038/nature09764>.
- Green, Robert C., Jonathan S. Berg, Wayne W. Grody, Sarah S. Kalia, Bruce R. Korf, Christa L. Martin, Amy L. McGuire, et al. 2013. « ACMG Recommendations for Reporting of Incidental Findings in Clinical Exome and Genome Sequencing ». *Genetics in Medicine* 15 (7): 565-74. <https://doi.org/10.1038/gim.2013.73>.
- Gross, Andrew M., Subramanian S. Ajay, Vani Rajan, Carolyn Brown, Krista Bluske, Nicole J. Burns, Aditi Chawla, et al. 2019. « Copy-Number Variants in Clinical Genome Sequencing: Deployment and Interpretation

- for Rare and Undiagnosed Disease ». *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 21 (5): 1121-30. <https://doi.org/10.1038/s41436-018-0295-y>.
- Grzeschik, Karl-Heinz. 2002. « Human Limb Malformations; an Approach to the Molecular Basis of Development », 9.
- Haro, Endika, Billy A. Watson, Jennifer M. Feenstra, Luke Tegeler, Charmaine U. Pira, Subburaman Mohan, et Kerby C. Oberg. 2017. « Lmx1b-Targeted Cis-Regulatory Modules Involved in Limb Dorsalization ». *Development (Cambridge, England)* 144 (11): 2009-20. <https://doi.org/10.1242/dev.146332>.
- Harvey, S. A. 2006. « Sall4 Acts Downstream of Tbx5 and Is Required for Pectoral Fin Outgrowth ». *Development* 133 (6): 1165-73. <https://doi.org/10.1242/dev.02259>.
- Hastings, Michelle L., Eric Allemand, Dominik M. Duelli, Michael P. Myers, et Adrian R. Krainer. 2007. « Control of Pre-mRNA Splicing by the General Splicing Factors PUF60 and U2AF65 ». Édité par Juan Valcarcel. *PLoS ONE* 2 (6): e538. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000538>.
- Hegele, Robert A. 2007. « Copy-Number Variations and Human Disease ». *The American Journal of Human Genetics* 81 (2): 414-15. <https://doi.org/10.1086/519220>.
- Heintzman, Nathaniel D, et Bing Ren. 2009. « Finding Distal Regulatory Elements in the Human Genome ». *Current Opinion in Genetics & Development* 19 (6): 541-49. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.09.006>.
- Holder-Espinasse, Muriel, Aleksander Jamsheer, Fabienne Escande, Joris Andrieux, Florence Petit, Anna Sowinska-Seidler, Magdalena Socha, et al. 2019. « Duplication of 10q24 Locus: Broadening the Clinical and Radiological Spectrum ». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 27 (4): 525-34. <https://doi.org/10.1038/s41431-018-0326-9>.
- Hrckulak, Dusan, Michal Kolar, Hynek Strnad, et Vladimir Korinek. 2016. « TCF/LEF Transcription Factors: An Update from the Internet Resources ». *Cancers* 8 (7). <https://doi.org/10.3390/cancers8070070>.
- Hua, Juan, et Yang-yang Wan. 2019. « Whole-Exome Sequencing Identified a Novel Mutation of AURKC in a Chinese Family with Macrozoospermia ». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 36 (3): 529-34. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1374-3>.
- Ibrahim, Daniel M., Naeimeh Tayebi, Alexej Knaus, Asita C. Stiege, Afsaneh Saheb Zamani, Jochen Hecht, Stefan Mundlos, et Malte Spielmann. 2016. « A Homozygous HOXD13 Missense Mutation Causes a Severe Form of Synpolydactyly with Metacarpal to Carpal Transformation ». *American Journal of Medical Genetics. Part A* 170 (3): 615-21. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37464>.
- Inobe, Tomonao, et Andreas Matouschek. 2014. « Paradigms of protein degradation by the proteasome ». *Current opinion in structural biology* 0 (février): 156-64. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.02.002>.
- Ionita-Laza, Iuliana, Angela J. Rogers, Christoph Lange, Benjamin A. Raby, et Charles Lee. 2009. « Genetic Association Analysis of Copy-Number Variation (CNV) in Human Disease Pathogenesis ». *Genomics* 93 (1): 22-26. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2008.08.012>.
- Isogai, Tadamoto, et Metello Innocenti. 2016. « New Nuclear and Perinuclear Functions of Formins ». *Biochemical Society Transactions* 44 (6): 1701-8. <https://doi.org/10.1042/BST20160187>.
- Jamuar, Saumya Shekhar, Jyn Ling Kuan, Maggie Brett, Zenia Tiang, Wilson Lek Wen Tan, Jiin Ying Lim, Wendy Kein Meng Liew, et al. 2016. « Incidentalome from Genomic Sequencing: A Barrier to Personalized Medicine? ». *EBioMedicine* 5 (mars): 211-16. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.01.030>.
- Jennings, Barbara H, et David Ish-Horowicz. 2008. « The Groucho/TLE/Grg family of transcriptional co-repressors ». *Genome Biology* 9 (1): 205. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-1-205>.
- Jindal, Geetanjali, Veenar Parmar, et Vipul Gupta Kumar. 2009. « Ectrodactyly/Split Hand Feet Malformation ». *Indian Journal of Human Genetics* 15 (3): 140. <https://doi.org/10.4103/0971-6866.60191>.
- Joseph, Andrew W., Ashley H. Shoemaker, et Emily L. Germain-Lee. 2011. « Increased Prevalence of Carpal Tunnel Syndrome in Albright Hereditary Osteodystrophy ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 96 (7): 2065-73. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-0013>.
- Jourdain, Anne-Sophie, Florence Petit, Marie-Françoise Odou, Malika Balduyck, Perrine Brunelle, William Dufour, Simon Bousson, et al. 2019. « Multiplex Targeted High-throughput Sequencing in a Series of 352 Patients with Congenital Limb Malformations ». *Human Mutation*, septembre. <https://doi.org/10.1002/humu.23912>.
- Kantaputra, Piranit N., et Bruce M. Carlson. 2019. « Genetic regulatory pathways of split-hand/foot malformation ». *Clinical Genetics* 95 (1): 132-39. <https://doi.org/10.1111/cge.13434>.
- Kashevarova, Anna A., Lyudmila P. Nazarenko, Nikolay A. Skryabin, Olga A. Salyukova, Nataliya N. Chechetkina, Ekaterina N. Tolmacheva, Elena A. Sazhenova, et al. 2014. « Array CGH Analysis of a Cohort of Russian

- Patients with Intellectual Disability ». *Gene* 536 (1): 145-50. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.11.029>.
- Kawakami, Y., J. Capdevila, D. Büscher, T. Itoh, C. Rodríguez Esteban, et J. C. Izpisua Belmonte. 2001. « WNT Signals Control FGF-Dependent Limb Initiation and AER Induction in the Chick Embryo ». *Cell* 104 (6): 891-900. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00285-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00285-9).
- Ke, Rongqin, Marco Mignardi, Thomas Hauling, et Mats Nilsson. 2016. « Fourth Generation of Next-Generation Sequencing Technologies: Promise and Consequences ». *Human Mutation* 37 (12): 1363-67. <https://doi.org/10.1002/humu.23051>.
- Kengaku, M., J. Capdevila, C. Rodriguez-Esteban, J. De La Peña, R. L. Johnson, J. C. Izpisua Belmonte, et C. J. Tabin. 1998. « Distinct WNT Pathways Regulating AER Formation and Dorsoventral Polarity in the Chick Limb Bud ». *Science (New York, N.Y.)* 280 (5367): 1274-77. <https://doi.org/10.1126/science.280.5367.1274>.
- Keyal, K, Bg Joshi, R Pandey, et Bm Shrestha. 2011. « Ectrodactyly: A rare anomaly of limbs ». *Journal of Nepal Paediatric Society* 31 (3): 235-37. <https://doi.org/10.3126/jnps.v31i3.4429>.
- Kmita, Marie, Basile Tarchini, Jozsef Zákány, Malcolm Logan, Clifford J. Tabin, et Denis Duboule. 2005. « Early Developmental Arrest of Mammalian Limbs Lacking HoxA/HoxD Gene Function ». *Nature* 435 (7045): 1113-16. <https://doi.org/10.1038/nature03648>.
- Kock, Leanne de, Yu Chang Wang, Timothée Revil, Dunarel Badescu, Barbara Rivera, Nelly Sabbaghian, Mona Wu, et al. 2016. « High-Sensitivity Sequencing Reveals Multi-Organ Somatic Mosaicism Causing DICER1 Syndrome ». *Journal of Medical Genetics* 53 (1): 43-52. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103428>.
- Korswagen, H. C., et H. C. Clevers. 1999. « Activation and Repression of Wingless/Wnt Target Genes by the TCF/LEF-1 Family of Transcription Factors ». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 64: 141-47. <https://doi.org/10.1101/sqb.1999.64.141>.
- Koshiba-Takeuchi, Kazuko, Jun K Takeuchi, Eric P Arruda, Irfan S Kathiriya, Rong Mo, Chi-chung Hui, Deepak Srivastava, et Benoit G Bruneau. 2006a. « Cooperative and Antagonistic Interactions between Sall4 and Tbx5 Pattern the Mouse Limb and Heart ». *Nature Genetics* 38 (2): 175-83. <https://doi.org/10.1038/ng1707>.
- Koshiba-Takeuchi, Kazuko, Jun K. Takeuchi, Eric P. Arruda, Irfan S. Kathiriya, Rong Mo, Chi-chung Hui, Deepak Srivastava, et Benoit G. Bruneau. 2006b. « Cooperative and Antagonistic Interactions between Sall4 and Tbx5 Pattern the Mouse Limb and Heart ». *Nature Genetics* 38 (2): 175-83. <https://doi.org/10.1038/ng1707>.
- Kothur, Kavitha, Katherine Holman, Elizabeth Farnsworth, Gladys Ho, Michelle Lorentzos, Christopher Troedson, Sachin Gupta, et al. 2018. « Diagnostic Yield of Targeted Massively Parallel Sequencing in Children with Epileptic Encephalopathy ». *Seizure* 59 (juillet): 132-40. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2018.05.005>.
- Krahn, Martin, Mathieu Cerino, Emmanuelle Campana-Salort, et Mireille Cossée. 2017. « [Towards a national standardisation of NGS studies in the diagnosis of myopathies] ». *Medecine Sciences: M/S* 33 Hors série n°1 (novembre): 30-33. <https://doi.org/10.1051/medsci/201733s106>.
- Kurban, Mazen, Muhammad Wajid, Lynn Petukhova, Yutaka Shimomura, et Angela M. Christiano. 2011. « A Nonsense Mutation in the HOXD13 Gene Underlies Synpolydactyly with Incomplete Penetrance ». *Journal of Human Genetics* 56 (10): 701-6. <https://doi.org/10.1038/jhg.2011.84>.
- Lango Allen, Hana, Richard Caswell, Weijia Xie, Xiao Xu, Christopher Wragg, Peter D. Turnpenny, Claire L. S. Turner, Michael N. Weedon, et Sian Ellard. 2014. « Next Generation Sequencing of Chromosomal Rearrangements in Patients with Split-Hand/Split-Foot Malformation Provides Evidence for DYNC111 Exonic Enhancers of DLX5/6 Expression in Humans ». *Journal of Medical Genetics* 51 (4): 264-67. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-102142>.
- Lee, C.-N., S.-Y. Lin, C.-H. Lin, J.-C. Shih, T.-H. Lin, et Y.-N. Su. 2012. « Clinical Utility of Array Comparative Genomic Hybridisation for Prenatal Diagnosis: A Cohort Study of 3171 Pregnancies ». *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 119 (5): 614-25. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2012.03279.x>.
- Lehmann, Katarina, Petra Seemann, Jan Boergemann, Gilles Morin, Silke Reif, Petra Knaus, et Stefan Mundlos. 2006. « A Novel R486Q Mutation in BMPR1B Resulting in Either a Brachydactyly Type C/Symphalangism-like Phenotype or Brachydactyly Type A2 ». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 14 (12): 1248-54. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201708>.

- Leroy, Camille, Emilie Landais, Sylvain Briault, Albert David, Olivier Tassy, Nicolas Gruchy, Bruno Delobel, et al. 2013. « The 2q37-Deletion Syndrome: An Update of the Clinical Spectrum Including Overweight, Brachydactyly and Behavioural Features in 14 New Patients ». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 21 (6): 602-12. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.230>.
- Lettice, Laura A., Simon J. H. Heaney, Lorna A. Purdie, Li Li, Philippe de Beer, Ben A. Oostra, Debbie Goode, Greg Elgar, Robert E. Hill, et Esther de Graaff. 2003. « A Long-Range Shh Enhancer Regulates Expression in the Developing Limb and Fin and Is Associated with Preaxial Polydactyly ». *Human Molecular Genetics* 12 (14): 1725-35. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg180>.
- Lettice, Laura A., Iain Williamson, Paul S. Devenney, Fiona Kilanowski, Julia Dorin, et Robert E. Hill. 2014. « Development of Five Digits Is Controlled by a Bipartite Long-Range Cis-Regulator ». *Development (Cambridge, England)* 141 (8): 1715-25. <https://doi.org/10.1242/dev.095430>.
- Levrán, O., T. Erlich, N. Magdalena, J. J. Gregory, S. D. Batish, P. C. Verlander, et A. D. Auerbach. 1997. « Sequence Variation in the Fanconi Anemia Gene FAA ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (24): 13051-56. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.13051>.
- Li, Lin, et Xiang-Jiao Yang. 2016. « Molecular and Functional Characterization of Histone Deacetylase 4 (HDAC4) ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1436: 31-45. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3667-0_4.
- Li, Q. Y., R. A. Newbury-Ecob, J. A. Terrett, D. I. Wilson, A. R. Curtis, C. H. Yi, T. Gebuhr, et al. 1997. « Holt-Oram Syndrome Is Caused by Mutations in TBX5, a Member of the Brachyury (T) Gene Family ». *Nature Genetics* 15 (1): 21-29. <https://doi.org/10.1038/ng0197-21>.
- Low, Karen J., Morad Ansari, Rami Abou Jamra, Angus Clarke, Salima El Chehadeh, David R. FitzPatrick, Mark Greenslade, et al. 2017. « PUF60 Variants Cause a Syndrome of ID, Short Stature, Microcephaly, Coloboma, Craniofacial, Cardiac, Renal and Spinal Features ». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 25 (5): 552-59. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2017.27>.
- Low, Karen J., Ruth A. Newbury-Ecob, et Ruth A. Newbury-Ecob. 2012. « Homozygous Nonsense Mutation in HOXD13 Underlies Synpolydactyly with a Cleft ». *Clinical Dysmorphology* 21 (3): 141-43. <https://doi.org/10.1097/MCD.0b013e32835306f0>.
- Lu, Fu-l., Yong-Hua Sun, Chang-Yong Wei, Christine Thisse, et Bernard Thisse. 2014. « Tissue-Specific Derepression of TCF/LEF Controls the Activity of the Wnt/ β -Catenin Pathway ». *Nature Communications* 5 (1): 1-10. <https://doi.org/10.1038/ncomms6368>.
- Lupiáñez, Darío G., Malte Spielmann, et Stefan Mundlos. 2016. « Breaking TADs: How Alterations of Chromatin Domains Result in Disease ». *Trends in Genetics: TIG* 32 (4): 225-37. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.01.003>.
- Malik, S. 2014. « Polydactyly: Phenotypes, Genetics and Classification ». *Clinical Genetics* 85 (3): 203-12. <https://doi.org/10.1111/cge.12276>.
- Manolakos, Emmanouil, Annalisa Vetro, Konstantinos Kefalas, Stamatia-Maria Rapti, Eirini Louizou, Antonios Garas, George Kitsos, et al. 2010. « The Use of Array-CGH in a Cohort of Greek Children with Developmental Delay ». *Molecular Cytogenetics* 3 (1): 22. <https://doi.org/10.1186/1755-8166-3-22>.
- Manouvrier-Hanu, S., M. Holder-Espinasse, et S. Lyonnet. 1999. « Genetics of Limb Anomalies in Humans ». *Trends in Genetics: TIG* 15 (10): 409-17.
- Manouvrier-Hanu, S., et A. Mezel. 2010. « Classification des malformations congénitales des membres ». *EMC - Appareil locomoteur* 5 (4): 1-6. [https://doi.org/10.1016/S0246-0521\(10\)50139-6](https://doi.org/10.1016/S0246-0521(10)50139-6).
- Mansour, Tamer A., Katherine Lucot, Sara E. Konopelski, Peter J. Dickinson, Beverly K. Sturges, Karen L. Vernau, Shannon Choi, et al. 2018. « Whole Genome Variant Association across 100 Dogs Identifies a Frame Shift Mutation in DISHEVELLED 2 Which Contributes to Robinow-like Syndrome in Bulldogs and Related Screw Tail Dog Breeds ». *PLoS Genetics* 14 (12): e1007850. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007850>.
- Mardis, Elaine R. 2013. « Next-Generation Sequencing Platforms ». *Annual Review of Analytical Chemistry (Palo Alto, Calif.)* 6: 287-303. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-062012-092628>.
- Mariani, Francesca V., Christina P. Ahn, et Gail R. Martin. 2008. « Genetic Evidence That FGFs Have an Instructive Role in Limb Proximal-Distal Patterning ». *Nature* 453 (7193): 401-5. <https://doi.org/10.1038/nature06876>.
- Martin, G. R. 1998. « The Roles of FGFs in the Early Development of Vertebrate Limbs ». *Genes & Development* 12 (11): 1571-86. <https://doi.org/10.1101/gad.12.11.1571>.

- Martínez, Francisco, Alfonso Caro-Llopis, Mónica Roselló, Silvestre Oltra, Sonia Mayo, Sandra Monfort, et Carmen Orellana. 2017. « High Diagnostic Yield of Syndromic Intellectual Disability by Targeted Next-Generation Sequencing ». *Journal of Medical Genetics* 54 (2): 87-92. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2016-103964>.
- Maxam, A. M., et W. Gilbert. 1977. « A New Method for Sequencing DNA. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74 (2): 560-64. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.2.560>.
- Medina-Martínez, O., A. Bradley, et R. Ramírez-Solis. 2000. « A Large Targeted Deletion of Hoxb1-Hoxb9 Produces a Series of Single-Segment Anterior Homeotic Transformations ». *Developmental Biology* 222 (1): 71-83.
- Metzker, Michael L. 2010. « Sequencing Technologies - the next Generation ». *Nature Reviews. Genetics* 11 (1): 31-46. <https://doi.org/10.1038/nrg2626>.
- Mills, A. A., B. Zheng, X. J. Wang, H. Vogel, D. R. Roop, et A. Bradley. 1999. « P63 Is a P53 Homologue Required for Limb and Epidermal Morphogenesis ». *Nature* 398 (6729): 708-13. <https://doi.org/10.1038/19531>.
- Mollerat, Xavier J. de, Fiorella Gurrieri, Chad T. Morgan, Eugenio Sangiorgi, David B. Everman, Paola Gaspari, Jeanne Amiel, et al. 2003. « A Genomic Rearrangement Resulting in a Tandem Duplication Is Associated with Split Hand-Split Foot Malformation 3 (SHFM3) at 10q24 ». *Human Molecular Genetics* 12 (16): 1959-71. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg212>.
- Morine, Mikio, Tomohiro Kohmoto, Kiyoshi Masuda, Hidehito Inagaki, Miki Watanabe, Takuya Naruto, Hiroki Kurahashi, Kazuhisa Maeda, et Issei Imoto. 2015. « A Unique TBX5 Microdeletion with Microinsertion Detected in Patient with Holt-Oram Syndrome ». *American Journal of Medical Genetics. Part A* 167A (12): 3192-96. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37359>.
- Muenke, M., U. Schell, A. Hehr, N. H. Robin, H. W. Losken, A. Schinzel, L. J. Pulleyn, P. Rutland, W. Reardon, et S. Malcolm. 1994. « A Common Mutation in the Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Gene in Pfeiffer Syndrome ». *Nature Genetics* 8 (3): 269-74. <https://doi.org/10.1038/ng1194-269>.
- Nagalski, A., M. Irimia, L. Szewczyk, J. L. Ferran, K. Misztal, J. Kuznicki, et M. B. Wisniewska. 2013. « Postnatal Isoform Switch and Protein Localization of LEF1 and TCF7L2 Transcription Factors in Cortical, Thalamic, and Mesencephalic Regions of the Adult Mouse Brain ». *Brain Structure and Function* 218 (6): 1531-49. <https://doi.org/10.1007/s00429-012-0474-6>.
- Nakamoto, J. M., D. Zimmerman, E. A. Jones, K. Y. Loke, K. Siddiq, M. A. Donlan, A. S. Brickman, et C. Van Dop. 1996. « Concurrent Hormone Resistance (Pseudohypoparathyroidism Type Ia) and Hormone Independence (Testotoxicosis) Caused by a Unique Mutation in the G Alpha s Gene ». *Biochemical and Molecular Medicine* 58 (1): 18-24.
- Nishimoto, Satoko, Susan M. Wilde, Sophie Wood, et Malcolm P. O. Logan. 2015. « RA Acts in a Coherent Feed-Forward Mechanism with Tbx5 to Control Limb Bud Induction and Initiation ». *Cell Reports* 12 (5): 879-91. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.06.068>.
- Ohtaka, Kohnosuke, Yasuko Fujisawa, Fumio Takada, Yukihiko Hasegawa, Tatsuya Miyoshi, Tomonobu Hasegawa, Hideaki Miyoshi, et al. 2017. « FGFR1 Analyses in Four Patients with Hypogonadotropic Hypogonadism with Split-Hand/Foot Malformation: Implications for the Promoter Region ». *Human Mutation* 38 (5): 503-6. <https://doi.org/10.1002/humu.23178>.
- Page-McCaw, P. S., K. Amonlirdviman, et P. A. Sharp. 1999. « PUF60: A Novel U2AF65-Related Splicing Activity ». *RNA (New York, N.Y.)* 5 (12): 1548-60. <https://doi.org/10.1017/s1355838299991938>.
- Petit, F., A.-S. Jourdain, J. Andrieux, G. Baujat, C. Baumann, C. Beneteau, A. David, et al. 2014. « Split Hand/Foot Malformation with Long-Bone Deficiency and BHLHA9 Duplication: Report of 13 New Families ». *Clinical Genetics* 85 (5): 464-69. <https://doi.org/10.1111/cge.12219>.
- Petit, Florence, Anne-Sophie Jourdain, Muriel Holder-Espinasse, Boris Keren, Joris Andrieux, Martine Duterque-Coquillaud, Nicole Porchet, Sylvie Manouvrier-Hanu, et Fabienne Escande. 2016. « The Disruption of a Novel Limb Cis-Regulatory Element of SHH Is Associated with Autosomal Dominant Preaxial Polydactyly-Hypertrichosis ». *European Journal of Human Genetics* 24 (1): 37-43. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.53>.
- Petit, Florence, Karen E. Sears, et Nadav Ahituv. 2017. « Limb Development: A Paradigm of Gene Regulation ». *Nature Reviews Genetics* 18 (4): 245-58. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.167>.
- Pizette, S., C. Abate-Shen, et L. Niswander. 2001. « BMP Controls Proximodistal Outgrowth, via Induction of the Apical Ectodermal Ridge, and Dorsoventral Patterning in the Vertebrate Limb ». *Development (Cambridge, England)* 128 (22): 4463-74.
- Pizette, S., et L. Niswander. 1999. « BMPs Negatively Regulate Structure and Function of the Limb Apical Ectodermal Ridge ». *Development (Cambridge, England)* 126 (5): 883-94.

- Poss, K. D., J. Shen, et M. T. Keating. 2000. « Induction of Lef1 during Zebrafish Fin Regeneration ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 219 (2): 282-86. [https://doi.org/10.1002/1097-0177\(2000\)9999:9999<::AID-DVDY1045>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1097-0177(2000)9999:9999<::AID-DVDY1045>3.0.CO;2-C).
- Potuijt, Jacob W P, Martijn Baas, Rivka Sukenik-Halevy, Hannie Douben, Picard Nguyen, Deon J Venter, Renée Gallagher, et al. 2018. « A Point Mutation in the Pre-ZRS Disrupts Sonic Hedgehog Expression in the Limb Bud and Results in Triphalangeal Thumb–Polysyndactyly Syndrome ». *Genetics in Medicine* 20 (11): 1405-13. <https://doi.org/10.1038/gim.2018.18>.
- Rallis, Charalampos, Benoit G. Bruneau, Jo Del Buono, Christine E. Seidman, J. G. Seidman, Sahar Nissim, Clifford J. Tabin, et Malcolm P. O. Logan. 2003. « Tbx5 Is Required for Forelimb Bud Formation and Continued Outgrowth ». *Development (Cambridge, England)* 130 (12): 2741-51.
- Redin, Claire, Bénédicte Gérard, Julia Lauer, Yvan Herenger, Jean Muller, Angélique Quartier, Alice Masurel-Paulet, et al. 2014. « Efficient Strategy for the Molecular Diagnosis of Intellectual Disability Using Targeted High-Throughput Sequencing ». *Journal of Medical Genetics* 51 (11): 724-36. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2014-102554>.
- Reid, Emma S., Apostolos Papandreou, Suzanne Drury, Christopher Boustred, Wyatt W. Yue, Yehani Wedatilake, Clare Beesley, et al. 2016. « Advantages and pitfalls of an extended gene panel for investigating complex neurometabolic phenotypes ». *Brain* 139 (11): 2844-54. <https://doi.org/10.1093/brain/aww221>.
- Richards, Sue, Nazneen Aziz, Sherri Bale, David Bick, Soma Das, Julie Gastier-Foster, Wayne W. Grody, et al. 2015. « Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology ». *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 17 (5): 405-24. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>.
- Rickard, S., M. Parker, W. van't Hoff, A. Barnicoat, I. Russell-Eggitt, R. M. Winter, et M. Bitner-Glindzicz. 2001. « Oto-Facio-Cervical (OFC) Syndrome Is a Contiguous Gene Deletion Syndrome Involving EYA1: Molecular Analysis Confirms Allelism with BOR Syndrome and Further Narrows the Duane Syndrome Critical Region to 1 CM ». *Human Genetics* 108 (5): 398-403. <https://doi.org/10.1007/s004390100495>.
- Riddle, R. D., M. Ensini, C. Nelson, T. Tsuchida, T. M. Jessell, et C. Tabin. 1995. « Induction of the LIM Homeobox Gene Lmx1 by WNT7a Establishes Dorsoventral Pattern in the Vertebrate Limb ». *Cell* 83 (4): 631-40. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90103-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90103-5).
- Riddle, R. D., R. L. Johnson, E. Laufer, et C. Tabin. 1993. « Sonic Hedgehog Mediates the Polarizing Activity of the ZPA ». *Cell* 75 (7): 1401-16. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90626-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90626-2).
- Rohmann, Edyta, Han G. Brunner, Hülya Kayserili, Oya Uyguner, Gudrun Nürnberg, Erin D. Lew, Angus Dobbie, et al. 2006. « Mutations in Different Components of FGF Signaling in LADD Syndrome ». *Nature Genetics* 38 (4): 414-17. <https://doi.org/10.1038/ng1757>.
- Rowe, D. A., J. M. Cairns, et J. F. Fallon. 1982. « Spatial and Temporal Patterns of Cell Death in Limb Bud Mesoderm after Apical Ectodermal Ridge Removal ». *Developmental Biology* 93 (1): 83-91. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(82\)90241-x](https://doi.org/10.1016/0012-1606(82)90241-x).
- Samorodnitsky, Eric, Jharna Datta, Benjamin M. Jewell, Raffi Hagopian, Jharna Miya, Michele R. Wing, Senthilkumar Damodaran, et al. 2015. « Comparison of Custom Capture for Targeted Next-Generation DNA Sequencing ». *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD* 17 (1): 64-75. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2014.09.009>.
- Samorodnitsky, Eric, Benjamin M. Jewell, Raffi Hagopian, Jharna Miya, Michele R. Wing, Ezra Lyon, Senthilkumar Damodaran, et al. 2015. « Evaluation of Hybridization Capture Versus Amplicon-Based Methods for Whole-Exome Sequencing ». *Human Mutation* 36 (9): 903-14. <https://doi.org/10.1002/humu.22825>.
- Sanger, F., et A. R. Coulson. 1978. « The Use of Thin Acrylamide Gels for DNA Sequencing ». *FEBS Letters* 87 (1): 107-10. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(78\)80145-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(78)80145-8).
- Sanger, F., S. Nicklen, et A. R. Coulson. 1977. « DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (12): 5463-67. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>.
- Santos-Simarro, F., E. Vallespin, A. Del Pozo, K. Ibañez, J. C. Silla, L. Fernandez, J. Nevado, et al. 2017. « Eye Coloboma and Complex Cardiac Malformations Belong to the Clinical Spectrum of PUF60 Variants ». *Clinical Genetics* 92 (3): 350-51. <https://doi.org/10.1111/cge.12965>.

- Saunders, J. W., M. T. Gasseling, et J. E. Errick. 1976. « Inductive Activity and Enduring Cellular Constitution of a Supernumerary Apical Ectodermal Ridge Grafted to the Limb Bud of the Chick Embryo ». *Developmental Biology* 50 (1): 16-25.
- Schadt, Eric E., Steve Turner, et Andrew Kasarskis. 2010. « A Window into Third-Generation Sequencing ». *Human Molecular Genetics* 19 (R2): R227-240. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq416>.
- Scherz, P. J. 2004. « The Limb Bud Shh-Fgf Feedback Loop Is Terminated by Expansion of Former ZPA Cells ». *Science* 305 (5682): 396-99. <https://doi.org/10.1126/science.1096966>.
- Schmidt, Maike, Margaret Patterson, Elizabeth Farrell, et Andrea Münsterberg. 2004. « Dynamic Expression of Lef/Tcf Family Members and Beta-Catenin during Chick Gastrulation, Neurulation, and Early Limb Development ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 229 (3): 703-7. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20010>.
- Schuijers, Jurian, Michal Mokry, Pantelis Hatzis, Edwin Cuppen, et Hans Clevers. 2014. « Wnt-induced transcriptional activation is exclusively mediated by TCF/LEF ». *The EMBO Journal* 33 (2): 146-56. <https://doi.org/10.1002/embj.201385358>.
- Sekine, K., H. Ohuchi, M. Fujiwara, M. Yamasaki, T. Yoshizawa, T. Sato, N. Yagishita, et al. 1999. « Fgf10 Is Essential for Limb and Lung Formation ». *Nature Genetics* 21 (1): 138-41. <https://doi.org/10.1038/5096>.
- Shimizu, Emi, Nagarajan Selvamurugan, Jennifer J. Westendorf, Eric N. Olson, et Nicola C. Partridge. 2010. « HDAC4 Represses Matrix Metalloproteinase-13 Transcription in Osteoblastic Cells, and Parathyroid Hormone Controls This Repression ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (13): 9616-26. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.094862>.
- Shinawi, Marwan, et Sau Wai Cheung. 2008. « The array CGH and its clinical applications ». *Drug Discovery Today* 13 (17): 760-70. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.06.007>.
- Simonis, Nicolas, Isabelle Migeotte, Nelle Lambert, Camille Perazzolo, Deepthi C. de Silva, Boyan Dimitrov, Claudine Heinrichs, et al. 2013. « FGFR1 Mutations Cause Hartsfield Syndrome, the Unique Association of Holoprosencephaly and Ectrodactyly ». *Journal of Medical Genetics* 50 (9): 585-92. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-101603>.
- Singer, Stephan, Volker Ehemann, Antje Brauckhoff, Martina Keith, Sebastian Vreden, Peter Schirmacher, et Kai Breuhahn. 2007. « Protumorigenic Overexpression of Stathmin/Op18 by Gain-of-Function Mutation in P53 in Human Hepatocarcinogenesis ». *Hepatology* 46 (3): 759-68. <https://doi.org/10.1002/hep.21736>.
- Soper, S. A., D. C. Williams, Y. Xu, S. J. Lassiter, Y. Zhang, S. M. Ford, et R. C. Bruch. 1998. « Sanger DNA-Sequencing Reactions Performed in a Solid-Phase Nanoreactor Directly Coupled to Capillary Gel Electrophoresis ». *Analytical Chemistry* 70 (19): 4036-43. <https://doi.org/10.1021/ac980288z>.
- Spielmann, Malte, et Eva Klopocki. 2013. « CNVs of Noncoding Cis-Regulatory Elements in Human Disease ». *Current Opinion in Genetics & Development* 23 (3): 249-56. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2013.02.013>.
- Stoddard, Jennifer L., Julie E. Niemela, Thomas A. Fleisher, et Sergio D. Rosenzweig. 2014. « Targeted NGS: A Cost-Effective Approach to Molecular Diagnosis of PIDs ». *Frontiers in Immunology* 5: 531. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00531>.
- Su, Peiqiang, Hongke Ding, Dongsheng Huang, Yan Zhou, Weijun Huang, Liangying Zhong, Tim J. Vyse, et Yiming Wang. 2011. « A 4.6 Kb Genomic Duplication on 20p12.2-12.3 Is Associated with Brachydactyly Type A2 in a Chinese Family ». *Journal of Medical Genetics* 48 (5): 312-16. <https://doi.org/10.1136/jmg.2010.084814>.
- Suemori, H., et S. Noguchi. 2000. « Hox C Cluster Genes Are Dispensable for Overall Body Plan of Mouse Embryonic Development ». *Developmental Biology* 220 (2): 333-42. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9651>.
- Summerbell, D. 1974. « A Quantitative Analysis of the Effect of Excision of the AER from the Chick Limb-Bud ». *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 32 (3): 651-60.
- Sun, Xin, Mark Lewandoski, Erik N. Meyers, Yi-Hsin Liu, Robert E. Maxson, et Gail R. Martin. 2000. « Conditional Inactivation of Fgf4 Reveals Complexity of Signalling during Limb Bud Development ». *Nature Genetics* 25 (1): 83-86. <https://doi.org/10.1038/75644>.
- Tanaka, K. 2000. « Formin Family Proteins in Cytoskeletal Control ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 267 (2): 479-81. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1707>.
- Tayebi, Naeimeh, Aleksander Jamsheer, Ricarda Flöttmann, Anna Sowinska-Seidler, Sandra C. Doelken, Barbara Oehl-Jaschkowitz, Wiebke Hülsemann, et al. 2014. « Deletions of Exons with Regulatory Activity at the

- DYNC111 Locus Are Associated with Split-Hand/Split-Foot Malformation: Array CGH Screening of 134 Unrelated Families ». *Orphanet Journal of Rare Diseases* 9 (juillet): 108. <https://doi.org/10.1186/s13023-014-0108-6>.
- Todt, W. L., et J. F. Fallon. 1987. « Posterior Apical Ectodermal Ridge Removal in the Chick Wing Bud Triggers a Series of Events Resulting in Defective Anterior Pattern Formation ». *Development (Cambridge, England)* 101 (3): 501-15.
- Tompa, P., J. Prilusky, I. Silman, et J. L. Sussman. 2008. « Structural Disorder Serves as a Weak Signal for Intracellular Protein Degradation ». *Proteins* 71 (2): 903-9. <https://doi.org/10.1002/prot.21773>.
- Ugur, Sibel Aylin, et Aslihan Tolun. 2008. « Homozygous WNT10b Mutation and Complex Inheritance in Split-Hand/Foot Malformation ». *Human Molecular Genetics* 17 (17): 2644-53. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn164>.
- Umair, M., A. Ullah, S. Abbas, F. Ahmad, S. Basit, et W. Ahmad. 2018. « First Direct Evidence of Involvement of a Homozygous Loss-of-Function Variant in the EPS15L1 Gene Underlying Split-Hand/Split-Foot Malformation ». *Clinical Genetics* 93 (3): 699-702. <https://doi.org/10.1111/cge.13152>.
- Vanlerberghe, C., A.-S. Jourdain, A. Dieux, A. Toutain, B. Callewaert, S. Dupuis-Girod, S. Unger, et al. 2017. « Small Patella Syndrome: New Clinical and Molecular Insights into a Consistent Phenotype ». *Clinical Genetics* 92 (6): 676-78. <https://doi.org/10.1111/cge.13103>.
- Vanlerberghe, Clémence, Anne-Sophie Jourdain, Jamal Ghoumid, Frédéric Frenois, Aurélie Mezel, Guy Vaksman, Bruno Lenne, et al. 2019. « Holt-Oram Syndrome: Clinical and Molecular Description of 78 Patients with TBX5 Variants ». *European Journal of Human Genetics* 27 (3): 360-68. <https://doi.org/10.1038/s41431-018-0303-3>.
- Vargesson, Neil. 2019. « The Teratogenic Effects of Thalidomide on Limbs ». *The Journal of Hand Surgery, European Volume* 44 (1): 88-95. <https://doi.org/10.1177/1753193418805249>.
- Vega, Rick B., Koichi Matsuda, Junyoung Oh, Ana C. Barbosa, Xiangli Yang, Eric Meadows, John McAnally, et al. 2004. « Histone Deacetylase 4 Controls Chondrocyte Hypertrophy during Skeletogenesis ». *Cell* 119 (4): 555-66. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.10.024>.
- Vergult, Sarah, A. Jeannette M. Hoogeboom, Emilia K. Bijlsma, Tom Sante, Eva Klopocki, Bram De Wilde, Marjolijn Jongmans, et al. 2013. « Complex Genetics of Radial Ray Deficiencies: Screening of a Cohort of 54 Patients ». *Genetics in Medicine* 15 (3): 195-202. <https://doi.org/10.1038/gim.2012.120>.
- Verheij, J. B. G. M., S. A. de Munnik, T. Dijkhuizen, N. de Leeuw, D. Olde Weghuis, G. J. van den Hoek, R. S. Rijlaarsdam, et al. 2009. « An 8.35 Mb Overlapping Interstitial Deletion of 8q24 in Two Patients with Coloboma, Congenital Heart Defect, Limb Abnormalities, Psychomotor Retardation and Convulsions ». *European Journal of Medical Genetics* 52 (5): 353-57. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2009.05.006>.
- Villanueva, Carine, Elka Jacobson-Dickman, Cheng Xu, Sylvie Manouvrier, Andrew A. Dwyer, Gerasimos P. Sykiotis, Andrew Beenken, et al. 2015. « Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism with Split Hand/Foot Malformation: A Clinical Entity with a High Frequency of FGFR1 Mutations ». *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 17 (8): 651-59. <https://doi.org/10.1038/gim.2014.166>.
- Vogel, A., C. Rodriguez, W. Warnken, et J. C. Izpisua Belmonte. 1995. « Dorsal Cell Fate Specified by Chick Lmx1 during Vertebrate Limb Development ». *Nature* 378 (6558): 716-20. <https://doi.org/10.1038/378716a0>.
- Wang, Binbin, Baoqiang Xu, Zhi Cheng, Xueya Zhou, Jing Wang, Guang Yang, Longfei Cheng, Jun Yang, et Xu Ma. 2012. « A Novel Non-Synonymous Mutation in the Homeodomain of HOXD13 Causes Synpolydactyly in a Chinese Family ». *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 413 (13-14): 1049-52. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.02.015>.
- Wang, Cindy C., David C. Chan, et Philip Leder. 1997. « The Mouseformin(Fmn) Gene: Genomic Structure, Novel Exons, and Genetic Mapping ». *Genomics* 39 (3): 303-11. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.4519>.
- Wang, Jason, Garrett Gotway, Juan M. Pascual, et Jason Y. Park. 2014. « Diagnostic Yield of Clinical Next-Generation Sequencing Panels for Epilepsy ». *JAMA Neurology* 71 (5): 650-51. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.405>.
- Wang, Zhengke, Gangjian Qin, et Ting C Zhao. 2014. « HDAC4: Mechanism of Regulation and Biological Functions ». *Epigenomics* 6 (1): 139-50. <https://doi.org/10.2217/epi.13.73>.
- Warren, Madhuri, Wei Wang, Sarah Spiden, Dongrong Chen-Murphy, David Tannahill, Karen P. Steel, et Allan Bradley. 2007. « A Sall4 Mutant Mouse Model Useful for Studying the Role of Sall4 in Early Embryonic Development and Organogenesis ». *Genesis (New York, N.Y.: 2000)* 45 (1): 51-58. <https://doi.org/10.1002/dvg.20264>.

- Watson, J. D., et F. H. Crick. 1953. « The Structure of DNA ». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 18: 123-31.
- Wilkie, Andrew O M. 2003. « Why Study Human Limb Malformations? BlackwellScience,Ltd », 9.
- Williams, Stephen R., Micheala A. Aldred, Vazken M. Der Kaloustian, Fahed Halal, Gordon Gowans, D. Ross McLeod, Sara Zondag, Helga V. Toriello, R. Ellen Magenis, et Sarah H. Elsea. 2010. « Haploinsufficiency of HDAC4 Causes Brachydactyly Mental Retardation Syndrome, with Brachydactyly Type E, Developmental Delays, and Behavioral Problems ». *American Journal of Human Genetics* 87 (2): 219-28. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.07.011>.
- Wooderchak-Donahue, Whitney, Chad VanSant-Webb, Tatiana Tvrdik, Parker Plant, Tracey Lewis, Jennifer Stocks, Joshua A. Raney, et al. 2015. « Clinical Utility of a next Generation Sequencing Panel Assay for Marfan and Marfan-like Syndromes Featuring Aortopathy ». *American Journal of Medical Genetics. Part A* 167A (8): 1747-57. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37085>.
- Wynshaw-Boris, A., G. Ryan, C. X. Deng, D. C. Chan, L. Jackson-Grusby, D. Larson, J. H. Dunmore, et P. Leder. 1997. « The Role of a Single Formin Isoform in the Limb and Renal Phenotypes of Limb Deformity ». *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)* 3 (6): 372-84.
- Xiang, Ying, Limin Jiang, Bo Wang, Yunlan Xu, Haiqing Cai, et Qihua Fu. 2017. « Mutational Screening of GLI3, SHH, PreZRS, and ZRS in 102 Chinese Children with Nonsyndromic Polydactyly ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 246 (5): 392-402. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24488>.
- Xu, X., M. Weinstein, C. Li, M. Naski, R. I. Cohen, D. M. Ornitz, P. Leder, et C. Deng. 1998. « Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (FGFR2)-Mediated Reciprocal Regulation Loop between FGF8 and FGF10 Is Essential for Limb Induction ». *Development (Cambridge, England)* 125 (4): 753-65.
- Yamoto, Kaori, Hiroto Saito, Gen Nishimura, Rika Kosaki, Shinichiro Takayama, Nobuhiko Haga, Hidefumi Tonoki, et al. 2019. « Comprehensive Clinical and Molecular Studies in Split-Hand/Foot Malformation: Identification of Two Plausible Candidate Genes (LRP6 and UBA2) ». *European Journal of Human Genetics: EJHG*, juillet. <https://doi.org/10.1038/s41431-019-0473-7>.
- Yan, Xiaoyi, Jie Lin, Yifan Wang, Junli Xuan, Ping Yu, Tingwei Guo, et Fan Jin. 2019. « A Novel Small Deletion of LMX1B in a Large Chinese Family with Nail-Patella Syndrome ». *BMC Medical Genetics* 20 (1): 71. <https://doi.org/10.1186/s12881-019-0801-3>.
- Yang, A., R. Schweitzer, D. Sun, M. Kaghad, N. Walker, R. T. Bronson, C. Tabin, et al. 1999. « P63 Is Essential for Regenerative Proliferation in Limb, Craniofacial and Epithelial Development ». *Nature* 398 (6729): 714-18. <https://doi.org/10.1038/19539>.
- Yohe, Sophia, Adam Hauge, Kari Bunjer, Teresa Kemmer, Matthew Bower, Matthew Schomaker, Getiria Onsongo, et al. 2015. « Clinical Validation of Targeted Next-Generation Sequencing for Inherited Disorders ». *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 139 (2): 204-10. <https://doi.org/10.5858/arpa.2013-0625-OA>.
- Zákány, J., M. Kmita, P. Alarcon, J. L. de la Pompa, et D. Duboule. 2001. « Localized and Transient Transcription of Hox Genes Suggests a Link between Patterning and the Segmentation Clock ». *Cell* 106 (2): 207-17.
- Zeller, Rolf, Javier López-Ríos, et Aimée Zuniga. 2009. « Vertebrate Limb Bud Development: Moving towards Integrative Analysis of Organogenesis ». *Nature Reviews. Genetics* 10 (12): 845-58. <https://doi.org/10.1038/nrg2681>.
- Zhang, Feng, Wenli Gu, Matthew E. Hurles, et James R. Lupski. 2009. « Copy Number Variation in Human Health, Disease, and Evolution ». *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 10 (1): 451-81. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164217>.
- Zhang, J., P. Barbaro, Y. Guo, A. Alodaib, J. Li, W. Gold, L. Adès, et al. 2015. « Utility of Next-Generation Sequencing Technologies for the Efficient Genetic Resolution of Haematological Disorders ». *Clinical Genetics*, février. <https://doi.org/10.1111/cge.12573>.
- Zhao, Mei, Lingling Hou, Huajing Teng, Jinchun Li, Jiesi Wang, Kunlin Zhang, et Lin Yang. 2019. « Whole-Exome Sequencing Identified a Novel Compound Heterozygous Genotype in ASL in a Chinese Han Patient with Argininosuccinate Lyase Deficiency ». *BioMed Research International* 2019 (avril): 1-7. <https://doi.org/10.1155/2019/3530198>.
- Zhou, F., P. Leder, A. Zuniga, et M. Dettenhofer. 2009. « Formin1 Disruption Confers Oligodactylism and Alters Bmp Signaling ». *Human Molecular Genetics* 18 (13): 2472-82. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp185>.
- Zhou, Nianwei, Lu Tang, Yingying Jiang, Shengmei Qin, Jie Cui, Yanan Wang, Wenqing Zhu, Weipeng Zhao, Cuizhen Pan, et Xianhong Shu. 2019. « Whole-exome sequencing reveals a novel mutation of MT-ND5 gene in a mitochondrial cardiomyopathy pedigree: Patients who show biventricular hypertrophy,

hyperlactacidemia, pulmonary hypertension, and decreased exercise tolerance ». *Anatolian Journal of Cardiology* 21 (1): 18-24. <https://doi.org/10.14744/AnatolJCardiol.2018.53258>.

Zuniga, Aimée, Rolf Zeller, et Simone Probst. 2012. « The Molecular Basis of Human Congenital Limb Malformations ». *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology* 1 (6): 803-22. <https://doi.org/10.1002/wdev.59>.