

UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE - LILLE 2
FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG
Année : 2017

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE

**Apport de l'étude de l'inactivation du chromosome X dans
l'interprétation des microremaniements détectés par ACPA dans le
bilan étiologique des anomalies du développement**

Présentée et soutenue publiquement le 10/10/2017 à 16h
au Pôle Formation
Par Frédérique PAYET

JURY

Président :

Madame le Professeur Sylvie MANOUVRIER-HANU

Assesseurs :

Madame le Professeur Bérénice DORAY

Madame le Professeur Catherine ROCHE

Directeur de Thèse :

Madame le Docteur Sonia BOUQUILLON

AVERTISSEMENT

« La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs. »

Résumé

Introduction : Chez l'Homme, la paire de chromosomes sexuels diffère entre la femme XX et l'homme XY. Pour pallier à ce déséquilibre génique, la femme inactive aléatoirement, lors d'un phénomène moléculaire complexe l'un ou l'autre de ses chromosomes dans chacune de ses cellules (ratio 50 :50). Cependant, chez certaines femmes, il existe un biais d'inactivation en faveur de l'un deux, notamment en raison d'anomalies chromosomiques de grande taille, visible au caryotype, touchant l'un des 2 chromosomes X ou une anomalie génique pathogène. Depuis l'avènement de l'ACPA (Analyse chromosomique sur Puce à ADN), de nombreux remaniements (CNV) du chromosome X, non visibles sur le caryotype conventionnel, ont été mis en évidence mais sont d'interprétation difficile du fait de la nécessité de prendre en compte le sexe du patient et un éventuel biais d'inactivation. Cependant, hormis une étude montrant une fréquence plus élevée de CNV de taille >5 Mb chez les femmes ayant un biais d'inactivation de l'X, aucune étude n'a été réalisée sur le lien entre la présence de CNV et un biais d'inactivation. L'objectif de cette étude était d'évaluer la pertinence de l'étude de l'inactivation du chromosome X dans l'interprétation des CNV du chromosome X mis en évidence dans le bilan étiologique des anomalies du développement.

Méthodes : Nous avons réalisé une étude de l'inactivation du chromosome X au locus HUMARA chez 189 sujets porteurs d'un CNV du chromosome X détecté en CGH-array au sein de la Plateforme Puce à ADN du CHRU de Lille (58 propositus et 128 apparentées).

Résultats : Il existe une fréquence statistiquement plus élevée de biais d'inactivation chez les sujets porteurs de CNV interprétés comme pathogène avant l'étude de l'inactivation par rapport au sujets porteurs de CNV de signification clinique incertaine ($p < 0.05$). La taille du CNV semble également être un facteur influençant la présence d'un biais d'inactivation.

Conclusion : L'étude de l'inactivation de l'X est un outil qui peut s'avérer pertinent dans l'interprétation des CNV du chromosome X. Néanmoins, il reste un argument parmi d'autres dans la classification des variants, nécessitant la confrontation avec des données phénotypiques précises, une étude familiale étendue et le traitement au cas par cas des remaniements rare de signification clinique incertaine. A ce jour, l'interprétation des CNV du chromosome X reste un challenge en ACPA.

Sommaire

Résumé.....	4
Tableau des abréviations.....	8
Glossaire.....	9
I. Introduction	10
A. Les chromosomes sexuels : origine et évolution	11
1. Généralités	11
2. Le chromosome Y	11
3. Chromosome X et régions pseudo-autosomiques	12
B. Compensation du dosage génique entre le mâle et la femelle	14
C. Mécanismes moléculaires de l'inactivation du chromosome X.....	16
D. Gènes échappant à l'inactivation de l'X.....	24
1. Expression bi-allélique de certains gènes sur le chromosome X	24
2. Bases moléculaires de l'échappement à l'inactivation du chromosome X	26
3. Variabilité d'expression des gènes échappant à l'inactivation.....	27
E. Biais d'inactivation du chromosome X	27
1. Inactivation non aléatoire du chromosome X	27
2. Causes du biais d'inactivation	28
F. Méthodes d'études de l'inactivation du chromosome X	29
1. Comptage des corpuscules de Barr	29
2. Visualisation des chromosomes X inactifs en cytogénétique conventionnelle	30
3. Techniques de biologie moléculaire	32
G. Evolution des techniques de cytogénétique et impact sur l'étude du chromosome X	32
1. Apport de l'analyse chromosomique par puce à ADN (ACPA).....	32
2. Interprétation de la CGH-array	34

3.	Interprétation des CNV du chromosome X.....	35
4.	CNV et inactivation du chromosome X.....	36
H.	Objectif de l'étude	37
II.	Matériels et Méthodes	38
A.	Population étudiée	39
B.	Recherche des CNV par CGH-array.....	39
1.	Technique utilisée.....	39
2.	Interprétation des résultats.....	40
3.	Validation des résultats et étude familiale par qPCR	42
C.	Etude de l'inactivation de l'X.....	43
1.	Technique utilisée.....	43
2.	Analyse et interprétation des résultats	45
3.	Contrôle qualité	46
III.	Résultats	48
A.	Description de la population	49
1.	Propositus féminins	49
2.	Propositus masculins.....	50
3.	Répartition des CNV détectés par CGH-array.....	50
B.	Etude de l'inactivation du chromosome X.....	51
1.	En fonction de la pathogénicité du CNV.....	51
2.	En fonction de la taille du CNV.....	53
3.	Cas particuliers.....	55
IV.	Discussion	58
A.	Pathogénicité du CNV et inactivation du chromosome X	59
B.	Taille du CNV et inactivation du chromosome X.....	60
C.	Interprétation des CNV de signification incertaine	60
1.	Les CNV de la région Xp22.31	61
2.	Les CNV non récurrents.....	62

D. Limites de l'analyse de l'inactivation du chromosome X	63
1. Limites techniques : recombinaisons méiotiques et homozygotie.....	63
2. Limites cytogénomiques.....	65
V. Conclusion-Perspectives	68
VI. Bibliographie	71
VIII. Annexes	80

Tableau des abréviations

ACPA : Analyse chromosomique sur puce à ADN

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

CGH-array : Hybridation génomique comparative sur micro-réseau

CNV : Copy Number Variant

FISH : Fluorescence *in situ* hybridization

Kb : Kilobase

Mb : Mégabase

PAR : Pseudo-autosomal region

PCR : Polymérase Chain réaction

pb : paire de bases

qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction

Xa : X actif

Xi : X inactif

Glossaire

Chromatine : ensemble formé par la molécule d'ADN et les histones.

Diploïde : se dit d'une cellule qui contient chaque chromosome en double exemplaire formant une paire ($2n$ chromosomes).

Euchromatine : forme décondensée de la chromatine, accessible à la machinerie transcriptionnelle et qui contient donc des gènes actifs.

Hétérochromatine : Forme condensée de la chromatine, transcriptionnellement inactive.

Mutation faux-sens : mutation ponctuelle de la séquence nucléotidique d'un gène dans laquelle un nucléotide d'un codon est changé, entraînant la modification de l'acide aminé associé.

Plaquette équatoriale : désigne l'ensemble des chromosomes lorsqu'ils sont situés à l'équateur de la cellule lors de la métaphase.

Séquence LINE-1 (*Long interspersed nuclear elements*): séquence transposable répétée de l'ADN, en générale inactive.

I. Introduction

A. Les chromosomes sexuels : origine et évolution

1. Généralités

Dans la plupart des espèces eucaryotes, le sexe de l'individu est déterminé à partir de la paire de chromosomes sexuels (ou gonosomes). En effet, contrairement aux autres paires de chromosomes (ou autosomes) qui sont identiques deux à deux sur le plan morphologique, les gonosomes sont hétéromorphiques, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas nécessairement homologues dans la même paire. Chez les mammifères, la femelle est homogamétique avec 2 chromosomes X et le mâle est hétérogamétique avec 1 chromosome X et un chromosome Y formant la paire de chromosomes sexuels (1).

L'accès à la génomique depuis le début des années 2000 a permis d'avancer dans la compréhension de la fonction des gènes des gonosomes et de leur évolution.

2. Le chromosome Y

Les études comparatives ont démontré que les chromosomes X et Y sont issus d'une même paire d'autosomes qui ont divergé il y a 300 millions d'années. Un de ces 2 autosomes a acquis le locus déterminant l'orientation vers le sexe masculin (locus SRY), formant ainsi le proto-chromosome Y. Cette divergence s'expliquerait par la survenue de mutations sur le proto-chromosome Y favorables aux mâles et potentiellement délétères pour les femelles. La pression de sélection limiterait alors la transmission des proto-chromosomes X porteurs de ces mutations après recombinaison méiotique. Cette diminution des recombinaisons entre les 2 chromosomes a entraîné la divergence du proto-chromosome Y par accumulation de mutations et de recombinaisons, et notamment de délétions, pour aboutir au chromosome Y actuel (1) (Figure 1).

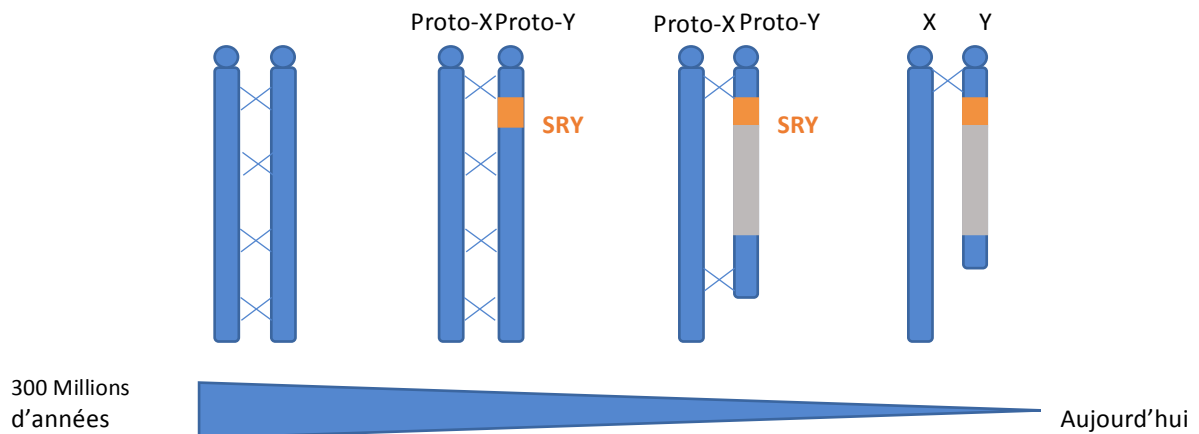


Figure 1 : Représentation de l'évolution des gonosomes. L'autosome acquiert le locus *SRY*, facteur de détermination sexuelle masculine, puis les recombinaisons méiotiques diminuent progressivement, entraînant la divergence entre les chromosomes X et Y.

Chez l'Homme, le chromosome Y est un petit chromosome de 59 Mb. Il contient environ 70 gènes essentiellement impliqués dans la différenciation sexuelle masculine (*SRY*) et la spermatogénèse (locus AZFa, b et c) (2). Aujourd'hui, seuls 54 gènes sont communs aux 2 gonosomes et 15 gènes ne sont présents que sur le chromosome Y. Une grande partie de ses bras longs est constituée d'hétérochromatine de taille très variable (3).

3. Chromosome X et régions pseudo-autosomiques

Le chromosome X humain, séquencé en 2005, est un grand chromosome de 155 Mb qui contient environ 1000 gènes (4).

Il existe des régions de très forte homologie entre les chromosomes X et Y, appelées régions pseudo-autosomiques (PAR) (Figure 2) :

- **PAR1**, d'une taille de 2,7 Mb, vestige de l'autosome ancestral, est située à l'extrémité des bras courts des chromosomes X et Y (Xp22.33/Yp11.3) et contient 24 gènes (Annexe 1) dont le gène *SHOX* (*Short Stature Homeobox*),

seul gène des régions PAR formellement en lien avec une pathologie du développement (Dyschondrostéose de Léri-Weil, OMIM127300) (5);

- **PAR2**, d'une taille de 330 kb, issu d'une duplication du chromosome X insérée dans le chromosome Y ayant eu lieu lors de la divergence Homme-Chimpanzé, est située à l'extrémité des bras longs des gonosomes (Xq28/Yq12) et contient 3 gènes OMIM (*VAMP7*, *SPRY3* et *IL9R*) (6);
- **PAR3 (XTR/YTR)**, plus récemment décrite, d'une taille de 3,5 Mb, est située en Xq21.3/Yp11.2 et contient 3 gènes (*PCDH11X*, *TGIF2LX* et *PABPC5*). Elle est également issue d'une duplication-insertion du chromosome X dans le chromosome Y ayant eu lieu il y a 4,7 millions d'années (7).

Ces régions PAR sont essentielles lors de la 1^{ère} division méiotique masculine. En effet, la bonne ségrégation des chromosomes homologues lors de la division réductionnelle méiotique nécessite des recombinaisons, appelées aussi crossing-over, entre les chromosomes homologues afin d'assurer une tension entre les chromosomes homologues sur la plaque équatoriale et permettre leur séparation correcte dans les deux cellules-filles. Ce phénomène de crossing-over est aussi essentiel au brassage génique. Pour les gonosomes hétéromorphiques, les homologies de séquences permettant l'appariement sont restreinte, l'appariement n'étant possible que dans les régions fortement homologues que constituent les régions PAR. Ainsi, la région PAR1 est le lieu d'un crossing-over obligatoire durant la première division méiotique masculine (8).

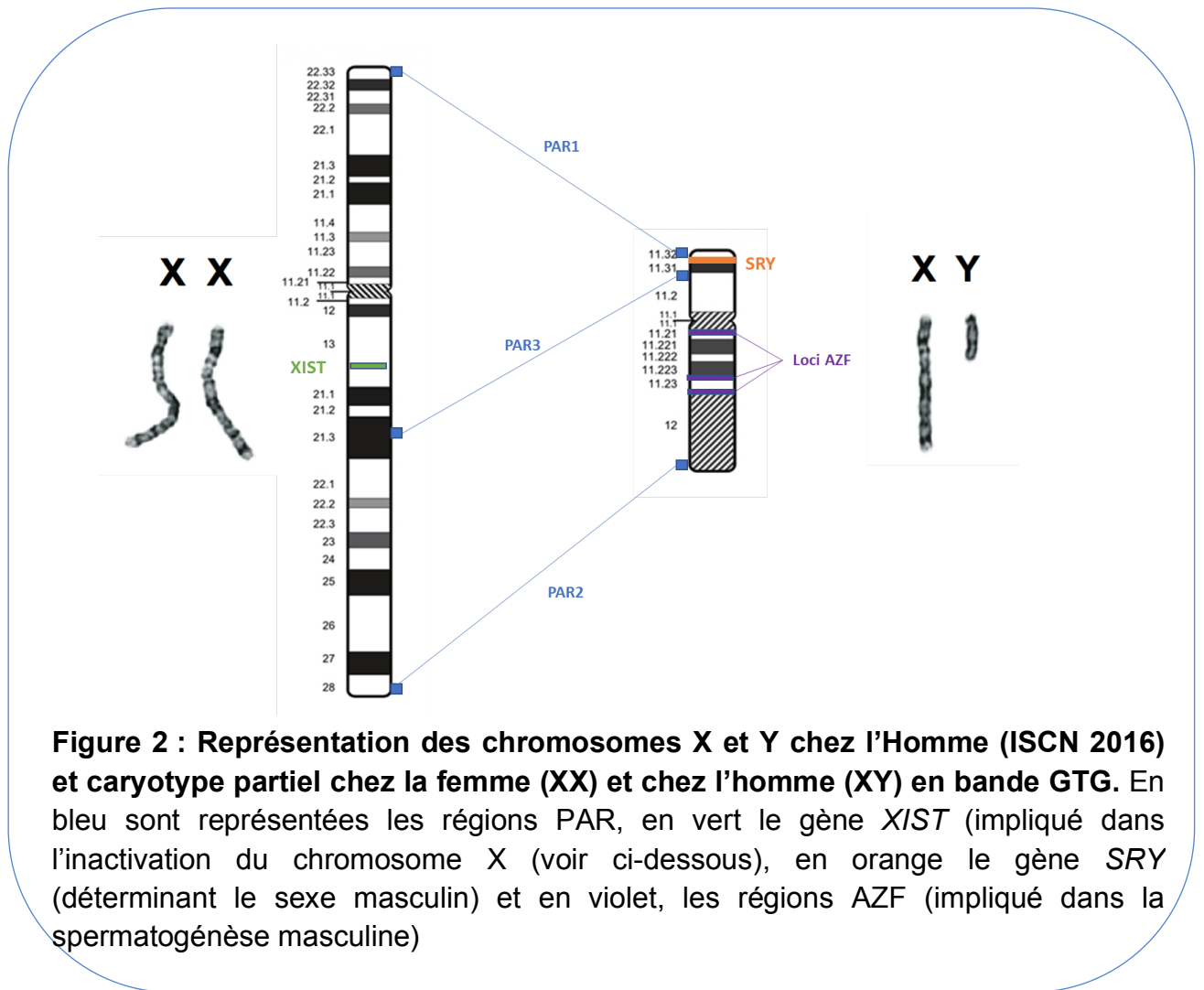


Figure 2 : Représentation des chromosomes X et Y chez l'Homme (ISCN 2016) et caryotype partiel chez la femme (XX) et chez l'homme (XY) en bande GTG. En bleu sont représentées les régions PAR, en vert le gène *XIST* (impliqué dans l'inactivation du chromosome X (voir ci-dessous), en orange le gène *SRY* (déterminant le sexe masculin) et en violet, les régions AZF (impliqué dans la spermatogénèse masculine)

B. Compensation du dosage génique entre le mâle et la femelle

Il existe deux niveaux de compensation de dosage génique. Un 1^{er} niveau est constitué par une sur-expression du chromosome X actif dans les deux sexes pour compenser l'expression bi-allélique des gènes autosomiques. Le 2^{ème} niveau permet de pallier le déséquilibre génique entre le mâle et la femelle : les différentes espèces ont mis en place divers mécanismes. Chez la drosophile, il existe une hyper-transcription du chromosome X chez le mâle, alors que chez le nématode, il y a, au contraire, une hypo-transcription des 2 chromosomes X chez la femelle. Chez les mammifères et notamment chez l'Homme, le mécanisme de compensation est basé sur l'inactivation de l'un des 2 chromosomes X chez la femelle (9) (Figure 3).

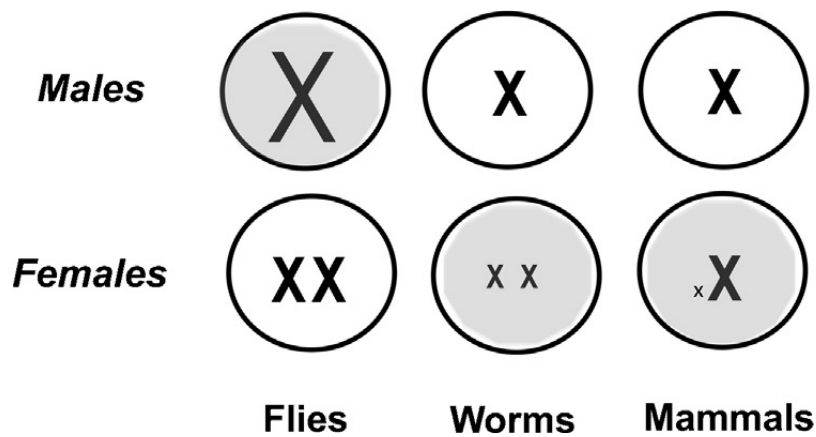


Figure 3 : Représentation des différents mécanismes de compensation de dosage génique chez les drosophiles, les nématodes et les mammifères. Les cellules en gris sont les cellules qui sont la cible moléculaire de la compensation. (Migeon, 2016)

Chez les mammifères, le phénomène d'inactivation de l'X a été décrit pour la première fois en 1961 chez la souris par Mary Lyon, d'où le nom de lyonisation donné au phénomène (10). Il aboutit à la présence d'un seul chromosome X actif par lot diploïde de chromosomes (2n chromosomes), la transcription de l'autre chromosome X étant réprimée. C'est un phénomène épigénétique, c'est-à-dire une régulation de l'expression des gènes sans altération de la séquence nucléotidique, par une modification des histones, une méthylation de l'ADN ou l'action d'ARN non codant. Le chromosome X va alors passer d'un état euchromatique actif à un état hétérochromatique inactif. Ce phénomène d'inactivation du chromosome X survient très précocement durant le développement embryonnaire.

Chez les marsupiaux, ainsi que dans le placenta des souris, le phénomène d'inactivation de l'X est soumis à empreinte parentale et 100% des chromosomes X

inactifs sont d'origine paternelle (11). Chez l'Homme, au contraire, l'inactivation est aléatoire entre le chromosome X d'origine paternelle et celui d'origine maternelle. Cette inactivation a lieu précocement, durant les stades primaires de l'embryogénèse (gastrulation) (12). La transmission du chromosome X inactivé se fait ensuite de façon clonale et stable aux cellules filles. Cette répartition théorique de 50% de cellules présentant le chromosome X d'origine paternelle inactif et 50% de cellules présentant le chromosome X d'origine maternelle inactif est en fait variable selon les individus, suivant une courbe de Gauss (13), et varie également avec l'âge (14).

C. Mécanismes moléculaires de l'inactivation du chromosome X

La mise en place de l'inactivation du chromosome X se déroule en 3 étapes : l'initiation de l'inactivation, sa propagation sur l'ensemble du chromosome X et son maintien au cours de la vie cellulaire.

L'initiation est sous le contrôle du centre d'inactivation de l'X (XIC), situé en Xq13.2 chez l'Homme, qui est la région nécessaire et suffisante pour déclencher l'inactivation (15). Cette région contient notamment le gène *XIST* (*X Inactive Specific Transcript*), principal acteur de ce phénomène. Le gène *XIST*, décrit en 1991 chez la souris puis en 1992 chez l'Homme, code un ARN non codant, non traduit, de grande taille (17 kb), exprimé à partir du chromosome X inactif (16). Cet ARN constitué de 8 exons chez l'Homme subit ensuite un épissage, le transcrit final ne conservant que les exons 1 et 6, présentant 6 domaines répétés. Le domaine A en 5' est le plus conservé et joue vraisemblablement un rôle critique dans la fonction de répression du gène *XIST* (17,18).

Les 1^{ères} études ayant permis de mieux appréhender les phénomènes moléculaires de l'inactivation du chromosome X ont été menées chez la souris, longtemps modèle de référence pour l'étude de l'inactivation de l'X.

L'initiation commence par l'appariement en *trans* des deux chromosomes X. Cet appariement permet de compter le nombre de chromosomes X dans la cellule (étape de « *sensing* ») et ainsi de n'autoriser l'inactivation de l'X qu'en présence de plusieurs chromosomes X. Le locus Xpr/XPR situé à 200-300 kb de *Xist/XIST* a été évoqué comme le site d'appariement. Des études ont montré qu'il n'était pas indispensable à cette étape (19). Dans le modèle murin où les mécanismes ont été mieux étudiés, l'interaction des deux chromosomes X va jouer un rôle de transactivateur de *Xist* en *trans* sur le futur chromosome X actif en libérant son promoteur de l'action répressive de la protéine CTCF, *insulator*, qui va se lier à des ARN non codant codés dans la région Xic (*Jpx* essentiellement).

Au contraire, sur le futur X inactif, CTCF restera lié au promoteur de *Xist* et permettra la transcription de *Tsix* (20).

La cellule va déterminer également sa ploïdie par l'établissement du *ratio* X/autosomes (étape de « comptage »). L'inactivation va être déclenchée dans les cellules comportant un nombre de locus Xic/XIC supérieur à 1 et un seul X va être actif par lot diploïde de chromosomes (étape de « choix »). Ainsi, dans une cellule tétraploïde, deux X vont rester actifs alors qu'un seul X restera actif dans une cellule diploïde (20,21). Ce choix, chez l'Homme, est aléatoire et l'organisme féminin résultant sera donc une mosaïque cellulaire, toutes les cellules n'exprimant pas le même chromosome X.

Chez la souris, le gène *Tsix*, codant pour un ARN anti-sens de *Xist*, va alors réguler négativement *Xist* sur les chromosomes X qui vont rester actifs. *Xist* va alors

s'exprimer de façon mono-allélique et s'accumuler en *cis* sur les chromosomes X destinés à être inactivés par ancrage notamment sur les facteurs de transcription YY1 qui assurent à *Xist* de s'accumuler sur le chromosome X duquel il est transcrit (20,22). Plus récemment, deux autres candidats ont été mis à jour : *Rex1*, activateur de *Tsix* qui régule négativement *Xist* et *Rnf12*, ubiquitinylant *Rex1* et ciblant sa dégradation (20)(Figure 4).

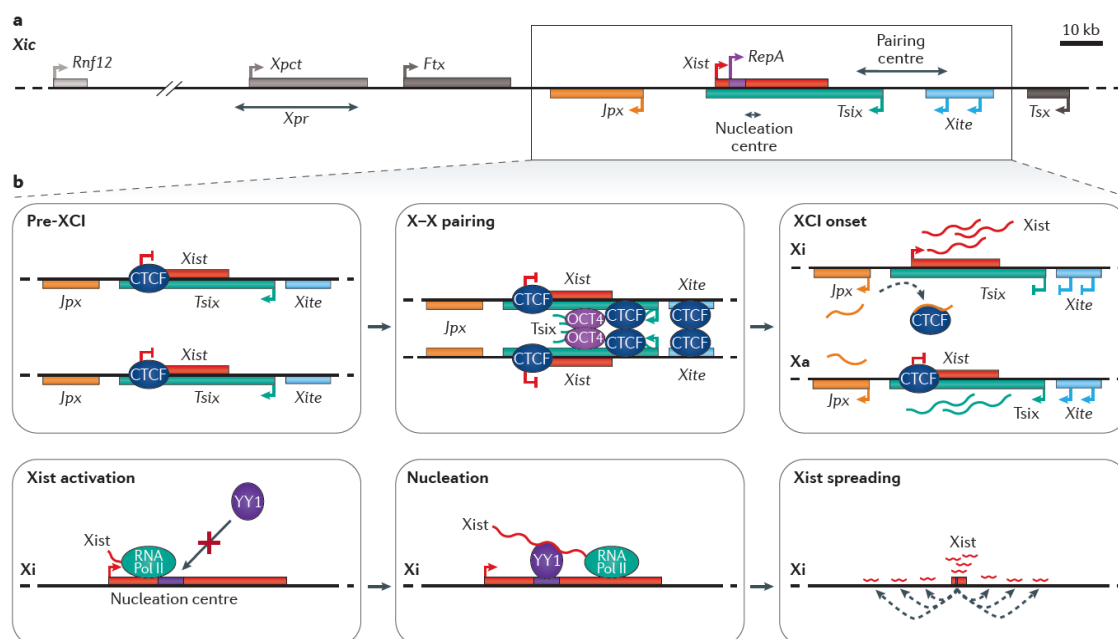


Figure 4 : a) Schématisation de la région Xic chez la souris. En gris les gènes candidats dans l'inactivation qui n'ont pas prouvés leur implication. En couleur les gènes impliqués dans l'inactivation.

b) Processus d'appariement et de propagation de *Xist*. Avant l'inactivation, *Xist* n'est pas transcrit, son promoteur étant réprimé par CTCF. Lors de l'appariement, faisant intervenir *Tsix*, CTCF et OCT4, l'un des loci va permettre la transcription de *Xist* par la capture de CTCF par l'ARN *Jpx*. *Xist* est alors capturé par la protéine YY1 qui est fixé sur le centre de nucléation. S'ensuit alors la propagation de *Xist* en cis le long du chromosome X qui s'inactive. (Jégu 2017)

Chez l'Homme, le processus est différent sur certains points. *XIST* est exprimé plus précocement que chez la souris par les deux chromosomes X, dès le stade de blastocyste (23)(Figure 5).

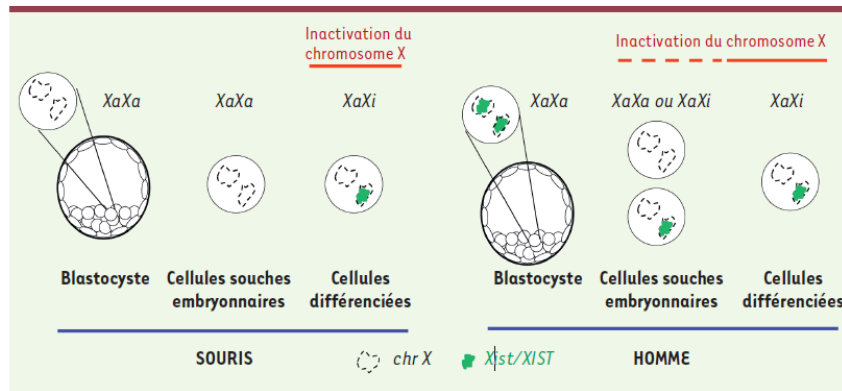
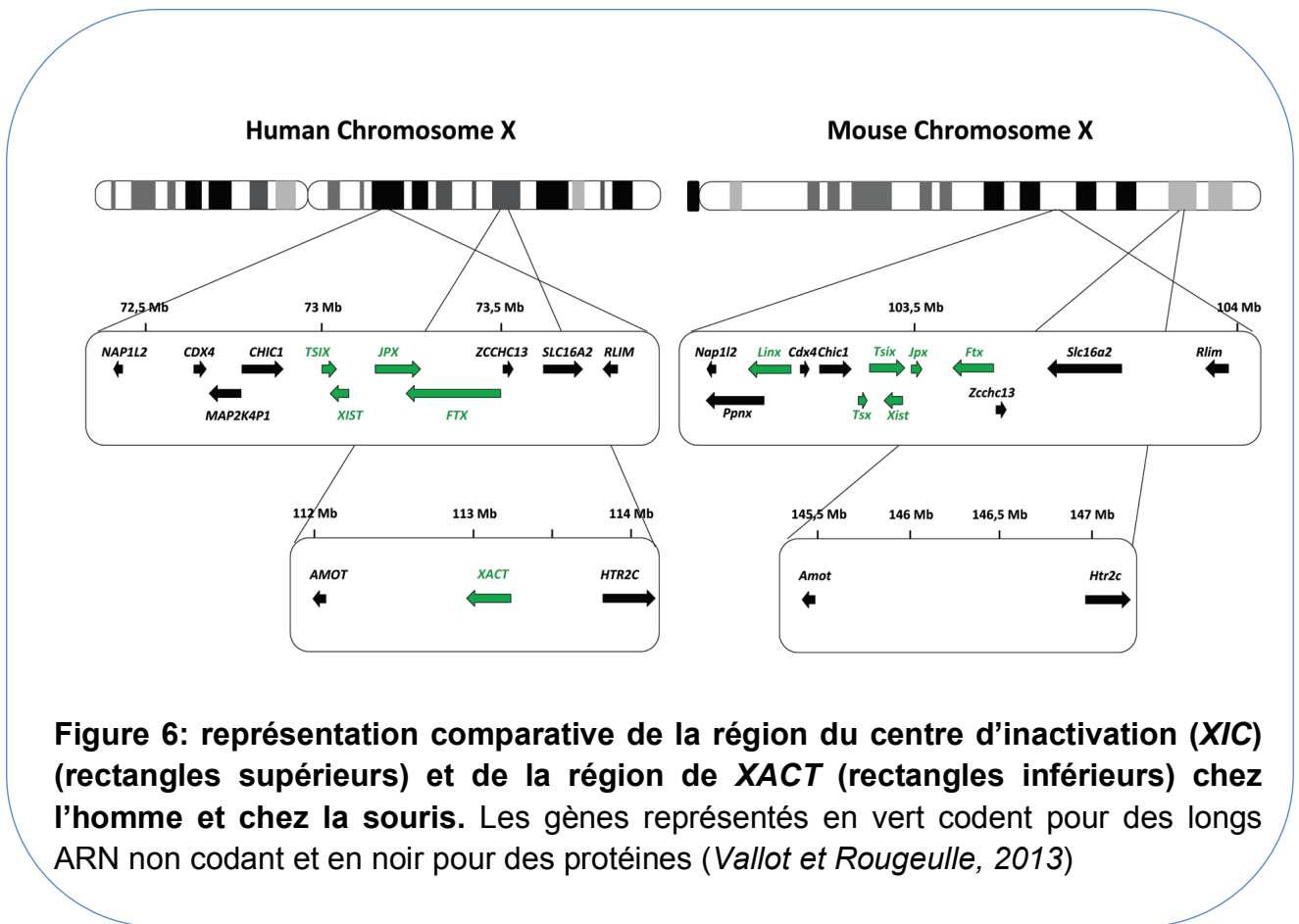


Figure 5 : Expression de *Xist/XIST* chez la souris et chez l'humain : chez la souris, *Xist* n'est exprimé qu'au niveau de l'X inactif des cellules différenciées. Chez l'homme, *XIST* est exprimé faiblement au niveau des 2 chromosomes X dans les blastocystes, puis ne s'accumule que sur l'X inactif dans les cellules différenciées (Vallot et Rougeulle, 2013).

Néanmoins, à ce stade, les deux chromosomes X restent transcriptionnellement actifs, ce qui sous-entend que le recouvrement des chromosomes X par l'ARN *XIST* n'est pas suffisant pour entraîner l'inactivation. En effet, les marques épigénétiques d'inactivation, et notamment la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3, ne sont pas apposées. Des études sur cellules souches embryonnaires humaines ont montré qu'à ce stade, l'inactivation du chromosome X pouvait débuter, mais était encore instable puisque réversible en culture. Ces constatations laissent donc à penser qu'une régulation spécifique intervient à ce stade, modulant l'action de *XIST*. *TSIX* présente peu de similarités avec *Tsix* murin

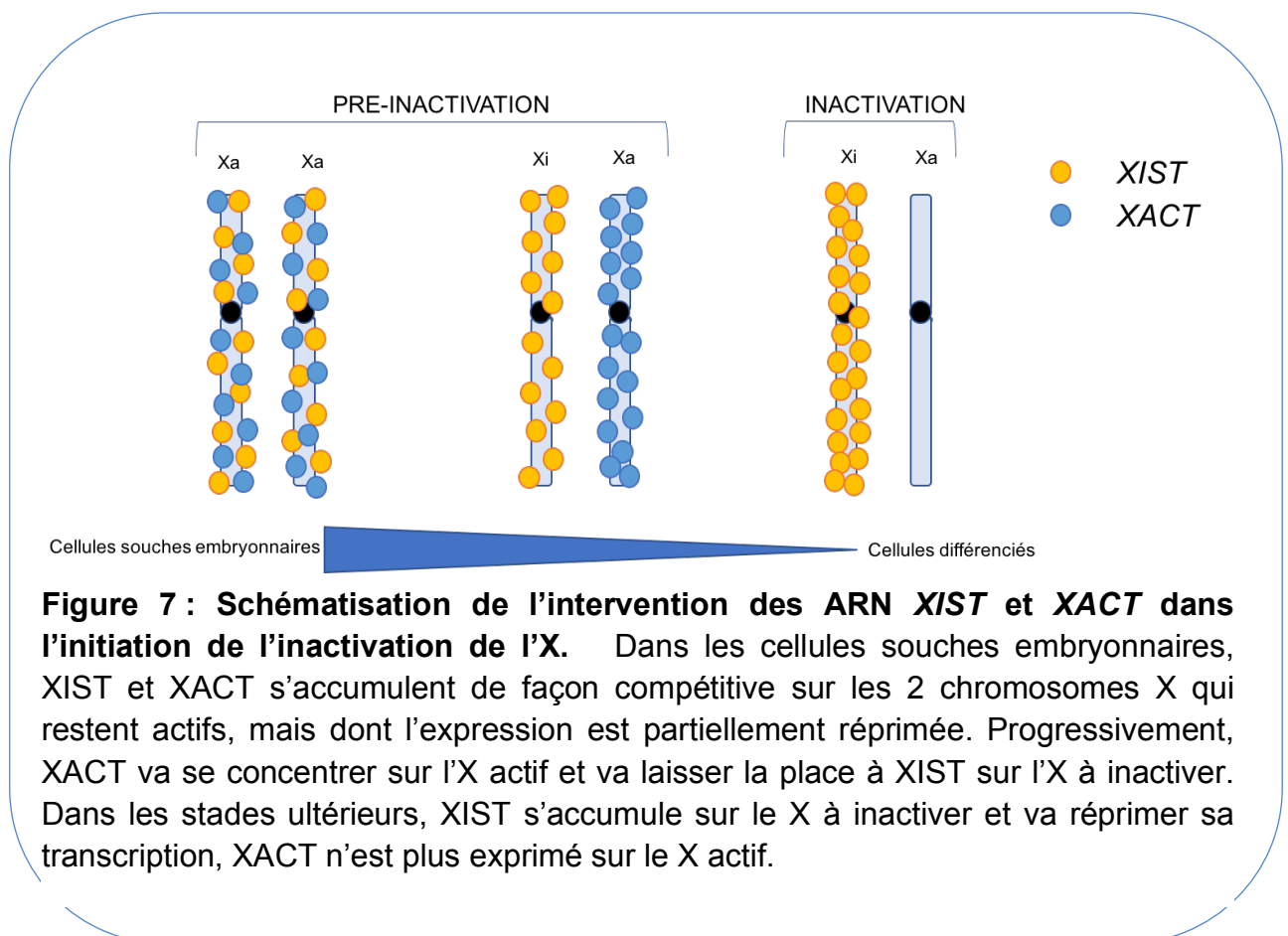
et ne semble pas jouer le même rôle chez l'Homme que chez la souris(20,24,25)
(Figure 6).



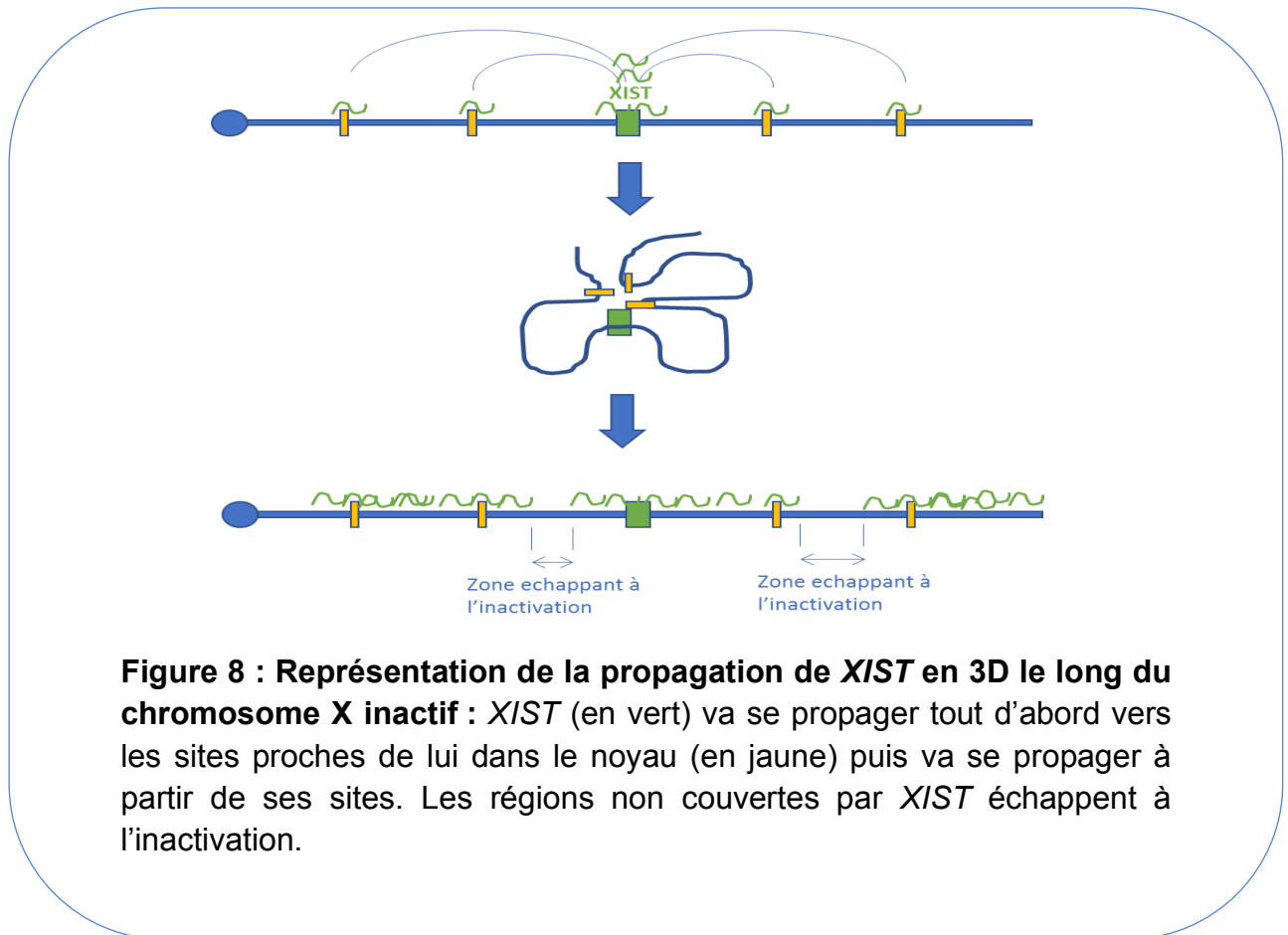
Un deuxième locus, *XACT*, qui code également un long ARN non codant de 250 kb a été identifié par séquençage haut débit de la totalité des ARN de cellules souches embryonnaires humaines. Il est situé en Xq23 dans un désert génique de 1,7 Mb. Son action n'est mise en évidence que lors des stades précoces de l'embryogenèse, lorsque les cellules restent pluripotentes. Cet ARN s'accumule dans le noyau autour du chromosome X actif, jouant un rôle antagoniste à *XIST*, empêchant le verrouillage de l'inactivation du chromosome X durant les stades embryonnaires pré-implantatoires, définissant un état de « pré-inactivation ». Aucune expression de *XACT* n'a été mise en évidence dans les cellules

différenciées. Par ailleurs, *XACT* n'est pas exprimé chez la souris et son promoteur n'est présent que chez les primates (25). On peut donc résumer l'initiation de l'inactivation du chromosome X chez l'Homme en deux étapes (Figure 7) :

- Une « pré-inactivation » où *XIST* et *XACT* agissent de façon antagoniste sur les deux chromosomes X restant actifs (compensation génique par répression partielle de la transcription des deux chromosomes X) lors de la phase pré-implantatoire (26)
- Une inactivation de l'un des deux chromosomes X par propagation : accumulation de *XIST* de façon plus dense et homogène sur le futur X inactif et recrutement protéique permettant l'inactivation stable (accumulation de triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 notamment) par remodelage chromatinien, structuration chromosomique et organisation nucléaire (25).



La propagation en *cis* (sur le même chromosome où il est transcrit) de *XIST* le long du chromosome X se fait ensuite de proche en proche dans les 3 dimensions, à des loci qui se retrouvent proches de XIC du fait de la conformation spatiale de l'ADN (27,28)(Figure 8).



Le recrutement de complexes protéiques va entraîner des changements de conformation de la chromatine du chromosome X inactif et induire la formation d'un compartiment nucléaire inactif, où les facteurs de transcription et l'ARN polymérase II sont exclus, induisant un silence transcriptionnel (22). Il existe deux types d'hétérochromatine selon la composition protéique (18) :

- Hétérochromatine du domaine 1 : dans ce domaine, XIST recrute les protéines du complexe Polycomb (PRC2 et PRC1). S'ensuivent des modifications des histones (H3K27me3, MacroH2A et H2AK119ub) correspondant à de l'hétérochromatine facultative.
- Hétérochromatine du domaine 2 : dans ce domaine, il s'agit d'hétérochromatine péricentromérique issue d'autosomes présentant des modifications spécifiques (H3K9me3, H4K20me3 et HP1).

Entre ces deux types de domaines, des protéines (SMCHD1, HbiX1 et HP1) forment des ponts de stabilité aux régions frontières.

Ces marques épigénétiques assurent le maintien de l'état inactif, indépendant du gène *XIST* (22).

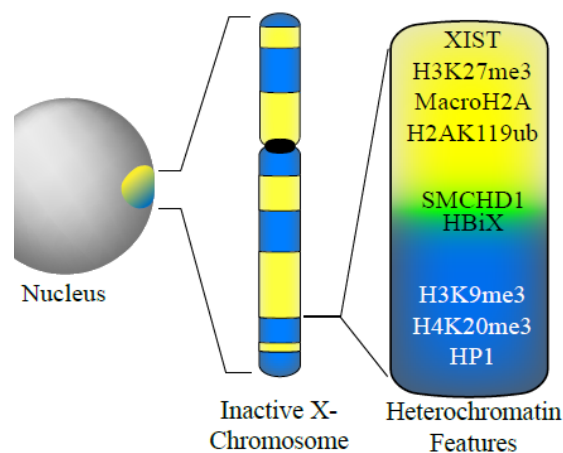


Figure 9 : Marques épigénétiques présent sur le chromosome X inactif : En jaune, les régions d'hétérochromatine facultative, inactivé par XIST. En bleu, les régions d'hétérochromatine constitutive (centromère, régions pauvres en gènes) (Dixon-McDougall and Brown, 2016)

Des études récentes ont montré que les territoires nucléaires et l'organisation architecturale des deux chromosomes X s'avéraient spécifiques de leur statut transcriptionnel. Ces mouvements chromosomiques et l'organisation 3D seraient eux-aussi déterminés par les ARN non codant de la région XIC (20).

Ces études mettent en lumière l'intrication de l'organisation architecturale du chromosome dans les 3 dimensions et la régulation de l'expression génique et ceci plus généralement, au-delà même de l'exemple de l'inactivation de l'X.

D. Gènes échappant à l'inactivation de l'X

1. *Expression bi-allélique de certains gènes sur le chromosome X*

Certains gènes du chromosome X, dont le nombre varie selon les espèces, conservent néanmoins une expression bi-allélique. En effet, si l'inactivation d'un chromosome X chez la femme était complète, la monosomie X serait sans conséquence phénotypique. Or, le syndrome Turner par monosomie X (formule chromosomique 45,X) est associé à des particularités phénotypiques (petite taille, dysgénésie gonadique et parfois malformations rénales et cardiaques) (29).

Chez l'Homme, environ 15% des gènes du chromosomes X échappent à l'inactivation (contre 3% chez la Souris) (30).

Les principales régions contenant des gènes échappant à l'inactivation sont (Figure 10) :

- les régions pseudo-autosomiques PAR, dont les gènes sont présents en double exemplaires chez le mâle et chez la femelle car communs aux deux gonosomes.

- des gènes situés en dehors des régions PAR, regroupés en clusters de taille variant entre 100 kb et 7 Mb (31,32). Il s'agit de gènes qui possèdent une copie sur le chromosome Y et vont, eux aussi, s'exprimer de façon bi-allélique quel que soit le sexe, même si la copie de l'Y a acquis des mutations Y-spécifiques(11,30) ou de gènes qui ont, eux, perdu leur homologue sur le chromosome Y et sont vraisemblablement plus exprimés chez la femme que chez l'homme.

La plupart des gènes échappant à l'inactivation du chromosome X sont situés sur les bras courts du chromosome X. Plusieurs hypothèses ont été posées quant à cette fréquence plus élevée(33) :

- La difficulté pour l'ARN *XIST* de passer la barrière de l'hétérochromatine centromérique ;
- La divergence plus récente des bras courts avec le chromosome Y.

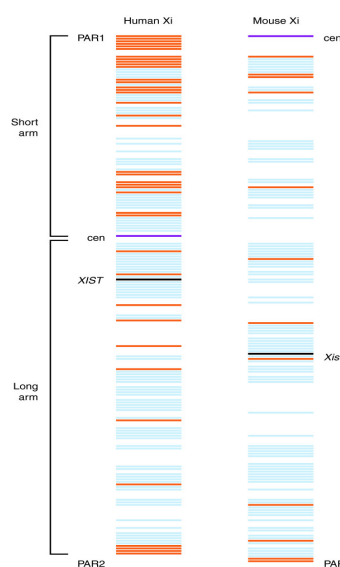


Figure 10 : Schématisation de la répartition des gènes sur le chromosome X humain (à gauche) et murin (à droite). En violet, le centromère ; en noir, le gène *XIST/Xist* ; en bleu les gènes inactivés, en orange les gènes échappant à l'inactivation dont PAR1 et PAR2. (Berletch *et al.*, 2010)

2. Bases moléculaires de l'échappement à l'inactivation du chromosome X

Au niveau moléculaire, même si la totalité des mécanismes ne sont pas encore élucidés, certaines caractéristiques des régions échappant à l'inactivation sont relevées.

Au niveau de l'ADN, il semble que des séquences répétées de type LINE-1, réparties sur le chromosome X, soient un facteur d'ancrage de l'ARN *XIST*. Or les régions échappant à l'inactivation sont appauvries en LINE-1(34).

Au niveau épigénétique, les marques épigénétiques caractéristiques de l'état chromatinien transcriptionnellement actif sont enrichies dans ces régions : acétylation des histones H3 et H4 et triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3, hypométhylation des îlots CpG. Au contraire, on observe un appauvrissement des marqueurs de l'état chromatinien inactif : triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3, triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 et incorporation de l'histone macroH2A (30).

La présence de régions échappant à l'inactivation avoisinant des régions inactives sous-entend qu'il existe des structures frontières, *insulators*, comme la protéine CTCF, empêchant l'apposition des modifications épigénétiques et/ou la propagation du changement conformationnel aux zones à protéger (30).

Conséquence de ces modifications épigénétiques, la réplication de ces régions de l'Xi est intermédiaire : plus tardive que sur l'Xa mais plus précoce que les régions inactivées de l'Xi (35).

L'Xi est cantonné à son territoire nucléaire, néanmoins, ces domaines transcriptionnellement actifs vont se situer en périphérie, permettant l'accès à la machinerie transcriptionnelle (33).

3. Variabilité d'expression des gènes échappant à l'inactivation

L'échappement à l'inactivation de ces gènes n'est que partiel. En effet, leur expression bi-allélique chez la femme n'est pas le double de l'expression chez l'homme, elle, mono-allélique. Les mécanismes de régulation fine de l'expression de ces gènes depuis le chromosome Xi sont complexes et encore mal compris : il existe une variabilité d'expression inter-individuelle, et même intra-individuelle (d'un tissu à l'autre) pour 10% d'entre eux (36–38). De plus le profil d'expression des gènes varie en fonction de l'âge de la femme (39,40).

Deux mécanismes sont proposés pour expliquer que le taux d'expression des gènes de l'Xi soit moindre que celui de l'Xa. Le 1^{er} est lié à la « up-regulation » du chromosome X actif, acquise durant l'évolution, pour compenser son expression mono-allélique par rapport aux autosomes (41). Le 2nd est la répression de l'expression des domaines échappant à l'inactivation sur le Xi du fait de leur environnement hétérochromatinien, rendant moins accessible leur promoteur à la machinerie transcriptionnelle (11,42).

E. Biais d'inactivation du chromosome X

1. Inactivation non aléatoire du chromosome X

En théorie, l'inactivation étant aléatoire dans les cellules et transmise de façon clonale aux cellules-filles, l'X inactivé est d'origine paternelle dans 50% des cellules et d'origine maternelle dans les 50 % de cellules restantes.

Cependant chez certaines femmes, il existe un biais d'inactivation, c'est-à-dire que l'un des 2 chromosomes X est préférentiellement inactivé par rapport à l'autre, dans plus de 85% des cellules. La répartition du pourcentage de d'inactivation de l'X dans la population féminine suit une courbe de Gauss (13).

2. Causes du biais d'inactivation

La principale cause primaire d'un biais d'inactivation du chromosome X est une altération du locus XIC, et notamment une délétion du gène *XIST*. En effet, l'absence de transcription de *XIST* à partir de l'un des 2 chromosomes X va aboutir nécessairement à une inactivation de l'autre chromosome, l'effet de la présence de 2 chromosomes X actif étant très délétère pour la cellule.

D'autre part, il existe plusieurs situations pathologiques comme une pathologie génique ou des déséquilibres génomiques où la femme présentera un biais d'inactivation en faveur de la situation la plus favorable. Par exemple, la majorité des femmes porteuses d'une altération génique pathogène du gène *DMD*, responsable de la myopathie de Duchenne, seront asymptomatiques car il existera un biais d'inactivation en faveur de l'X normal, la population ayant l'X anormal subissant une pression de sélection négative.

L'inactivation du chromosome X chez les femmes porteuses de grandes anomalies de structures du chromosome X est plus complexe. En règle générale, l'inactivation va créer une situation normale ou proche de la normale (43) (Figure 11):

- Lors d'une anomalie déséquilibrée ne concernant que l'un des chromosomes X (duplication, délétion, anneau), c'est le chromosome X anormal qui va s'inactiver (à condition que le gène *XIST* ne soit pas concerné par l'anomalie).
- Lors d'une translocation X : autosome équilibrée, c'est le chromosome X normal qui va s'inactiver
- Dans le cas d'une translocation X : autosome déséquilibré avec présence du dérivé du chromosome X, l'inactivation va se faire sur le dérivé de l'X, avec possible propagation au moins partielle de l'inactivation sur le fragment issu de l'autre chromosome.

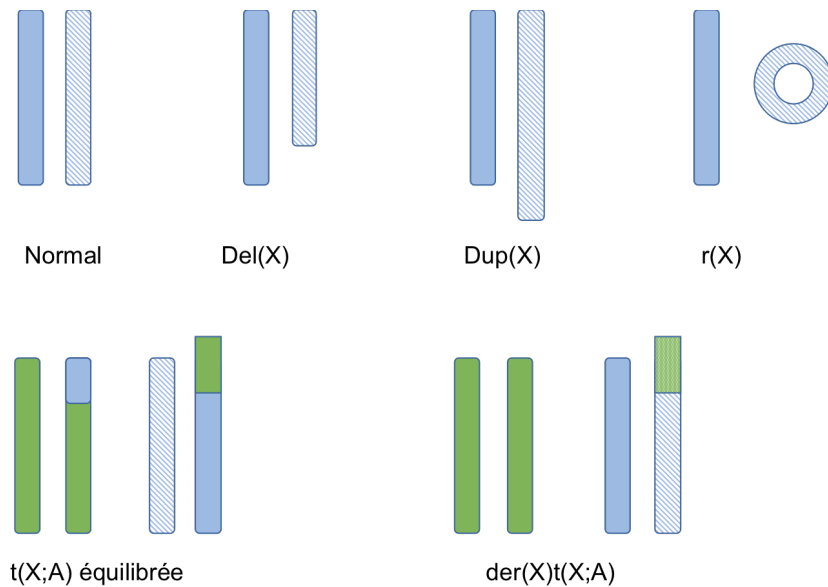


Figure 11 : Schématisation de quelques anomalies de structure du chromosome X et de leur inactivation classique. En bleu, le chromosome X, en vert, les autosomes, en quadrillé, les segments inactivés. Lors de délétions ou de duplications, c'est le chromosome X anormal qui est préférentiellement inactivé. Lors d'une translocation équilibrée, c'est le chromosome X normal qui est préférentiellement inactivé.

F. Méthodes d'études de l'inactivation du chromosome X

1. Comptage des corpuscules de Barr

Le corpuscule de Barr est un corps intra-nucléaire, situé juste en dessous de la membrane nucléaire, décrit en 1948 par le Docteur M. Barr (44). En 1950, Barr a également démontré que ce corpuscule n'était visible que dans les cellules féminines et a posé l'hypothèse qu'il était constitué de chromatine sexuelle (45). En 1959, Ohno *et al.*, démontre que le corpuscule de Barr est constitué de l'hétérochromatine très condensée du chromosome X inactivé (46).

Le corpuscule de Barr est donc visible sur les noyaux interphasiques issus d'un frottis buccal après coloration par Orcéine/Giemsa (dans 10 à 15% des cellules) ou par immunofluorescence (Figure 12) On peut ainsi faire le diagnostic d'aneuploïdie des gonosomes puisqu' il existe autant de corpuscules de Barr que de

chromosomes X inactifs dans la cellule. Ainsi, chez une femme 46,XX il existe 1 corpuscule de Barr, et chez une femme 47,XXX, il en existe 2. Chez les hommes, la visualisation d'un corpuscule de Barr équivaut à un caryotype de formule 47,XXY (47,48) .

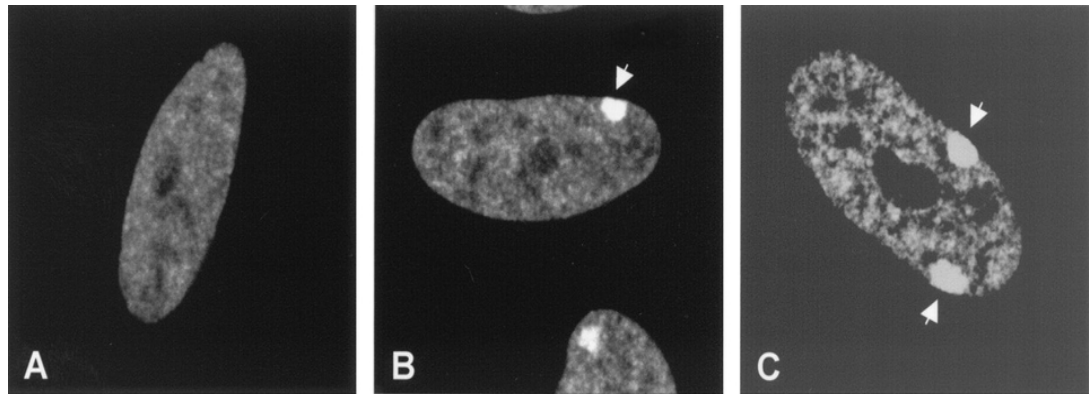


Figure 12 : Observation des corpuscules de Barr (CB) par Immunofluorescence : A- absence de CB chez un individu ne présentant qu'un seul chromosome X (caryotype 45,X ou 46,XY) ; B- Présence d'un CB chez un individu présentant 2 chromosomes X (caryotype 46,XX ou 47,XXY) ; C - Présence de 2 CB chez un individu présentant 3 chromosomes X (Photo extraite de l'article de Hong *et al*, 2001).

2. Visualisation des chromosomes X inactifs en cytogénétique conventionnelle

Les chromosomes X actif et inactif présentent une asynchronie de réplication. En effet, la réplication du chromosome X inactivé est plus tardive du fait qu'il soit constitué d'hétérochromatine (49).

Il est donc possible de distinguer les 2 chromosomes X par des techniques de cytogénétique conventionnelle. La technique consiste à synchroniser les cultures cellulaires et à introduire du BrDU (bromodésoxyuridine, analogue structurel de la

thymidine) en fin de phase S, après la réplication du chromosome X actif. Le chromosome X inactif va alors, en se répliquant, incorporer le BrDU à la place de la thymidine, alors que le chromosome X actif aura lui incorporé de la thymidine. Après dénaturation et coloration au Hoechst-Giemsa, le chromosome X inactif ayant incorporé le BrDU ne prendra pas la coloration et apparaîtra pâle(50,51) (Figure 13).

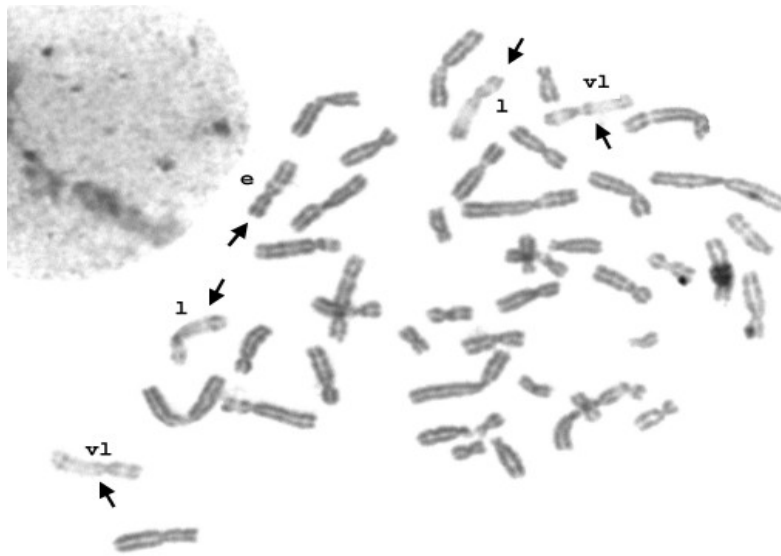


Figure 13 : Métaphase 49, XXXXX après incorporation de BrDU. Les flèches pointent les différents chromosomes X. Le chromosome X actif est marqué d'un « e », les chromosomes X inactifs, plus pâles, sont marqués d'un « l »(late) ou d'un « vl » (very late) (Moraes *and al.*, 2009)

Cependant, la détermination de l'origine parentale du chromosome X inactif n'est possible qu'en cas de grande anomalie de structure héritée, visible au caryotype.

3. Techniques de biologie moléculaire

Dans les années 1990, les techniques de biologie moléculaire ont permis de distinguer plus facilement l'origine parentale des 2 chromosomes X. Il s'agit d'une étude indirecte associant une étude de la méthylation différentielle entre le chromosome X actif et le chromosome X inactif et d'une étude de SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) ou de STR (*Short tandem Repeat*) pour distinguer le chromosome paternel et le chromosome maternel (52).

La méthode la plus fréquemment utilisée est l'étude de l'inactivation de l'X au locus HUMARA. Elle consiste en la recherche du nombre de triplet (CAG)_n dans le premier exon du gène du récepteur aux androgènes (*AR*), très variable d'un individu à l'autre, localisé à côté de sites différentiellement méthylés entre l'X actif et l'X inactif, sensibles aux enzymes de restriction méthylation sensible *HpaII* et *HhaI* (53).

G. Evolution des techniques de cytogénétique et impact sur l'étude du chromosome X

1. Apport de l'analyse chromosomique par puce à ADN (ACPA)

Depuis le début des années 2000, les avancées de la génomique, de l'informatique et de la miniaturisation ont permis de mettre au point des techniques permettant une analyse pangénomique de résolution supérieure au caryotype de haute résolution, appelé analyse chromosomique par puce à ADN (ACPA). Deux techniques sont référencées sous ce terme (54) :

- **La CGH-array**, dont le principe est une co-hybridation de l'ADN d'un patient et de l'ADN d'un témoin marqués par 2 fluorochromes différents sur une lame où se situent des millions de sondes dont on connaît la localisation précise sur le génome humain. Après traitement statistique informatisé des *ratios* de

fluorescence, les « profils » sont constituées pour chacun des chromosomes et les variations du nombre de copies (CNV) sont soumises à interprétation (Figure 14). La résolution de cette technique repose sur le type de sondes utilisé, leur nombre et leur espacement sur le génome, mais elles sont en moyenne 100 à 1000 fois plus résolutive que le caryotype standard.

- **La SNP-array**, qui compare les *Single-Nucléotide Polymorphisms* de l'ADN du patient à une séquence de référence informatisée, permet un haplotypage du patient et la détection à la fois de déséquilibres génomiques mais également des régions de perte d'hétérozygotie, notamment les isodisomies uniparentales.

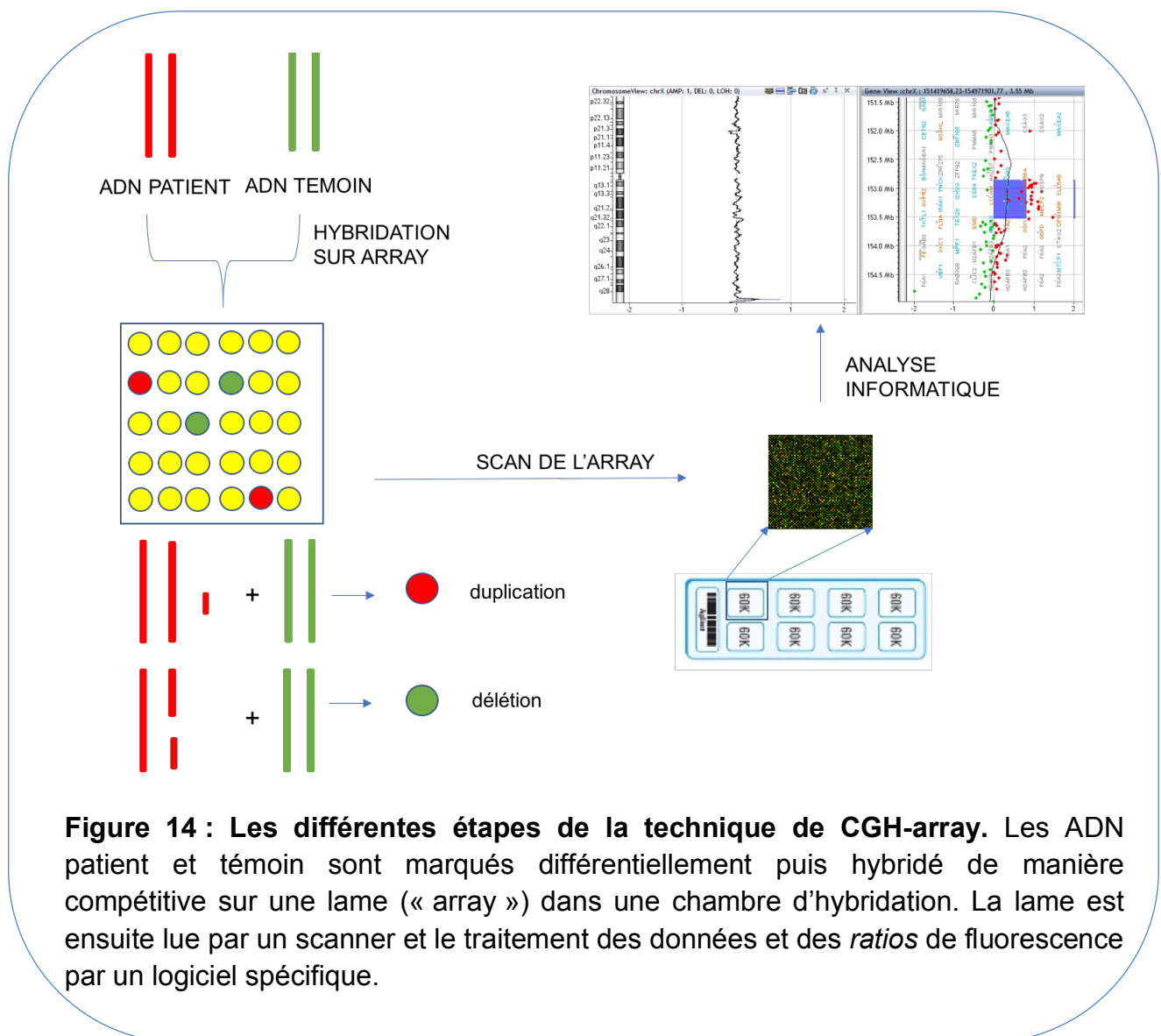


Figure 14 : Les différentes étapes de la technique de CGH-array. Les ADN patient et témoin sont marqués différemment puis hybridé de manière compétitive sur une lame (« array ») dans une chambre d'hybridation. La lame est ensuite lue par un scanner et le traitement des données et des *ratios* de fluorescence par un logiciel spécifique.

Ces techniques ont progressivement supplanté le caryotype conventionnel dans le diagnostic des déficiences intellectuelles et des syndromes malformatifs, en permettant de mettre en évidence des variations quantitatives de l'ADN de petite taille (< 5Mb) non visibles à la meilleure résolution du caryotype (5Mb en haute résolution), appelées CNV (Copy Number Variations) (55). Cependant, ces analyses ne permettent pas de mettre en évidence des anomalies de structure équilibrées (translocations réciproques, translocation robertsonienne, inversions), ainsi que les mosaïques de faible pourcentage.

Ainsi, depuis la mise en place en première ligne de ces techniques, environ 15% de diagnostics supplémentaires ont été réalisés dans le domaine de la déficience intellectuelle et anomalies du développement (54).

2. Interprétation de la CGH-array

L'interprétation des CNV détectés en CGH-array fait appel à un faisceau d'argument comportant le type de l'anomalie (délétion ou duplication), sa taille (quelques kb à plusieurs Mb), sa richesse en gènes et notamment en gènes déjà décrit en pathologie humaine (bases de données UCSC <https://genome.ucsc.edu/>, OMIM <https://www.omim.org/>, OMIM Morbid), le caractère hérité ou de novo de l'anomalie. L'interprétation fait aussi appel aux bases de données de population de patients, comme DECIPHER (*Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources*, <https://decipher.sanger.ac.uk/>) ou ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), et aux bases de données de population générale, comme DGV (*Database of Genomic Variant*, dgv.tcag.ca/). En effet, les analyses d'ACPA ont mis en évidence de nombreuses variations quantitatives de

l'ADN chez des individus « sains », qui participent à la diversité de notre génome sans être pathogène.

Suite à cette interprétation, les CNV sont classés en fonction de leur pathogénicité (56):

- Les **CNVs « pathogènes »** ou **« probablement pathogènes »** sont des CNV dont les points de cassure sont récurrents et correspondant à des syndromes décrits dans la littérature médicale ou des CNV contenant des gènes décrits en pathologie humaine et pouvant expliquer le phénotype du patient ;
- Les **CNVs « bénins »** ou **« probablement bénins »** rapportés à une fréquence élevée dans les bases de données de population générale, sans gènes impliqués en pathologie humaine ;
- Les **CNV de « signification inconnue »** (**VOUS, variants of unknown significance**) dont les données actuelles ne sont pas suffisantes pour conclure à leur pathogénicité ou leur bénignité.

3. Interprétation des CNV du chromosome X

Le chromosome X est particulièrement étudié dans les troubles neuro-développementaux. Il existe une fréquence plus élevée de ces troubles chez les garçons que chez les filles (sex ratio de 3 :1), ce qui est en faveur d'une grande abondance de gènes responsables de ces troubles sur ce chromosome sexuel (57).

En effet, sur le millier de gènes que contient le chromosome X, 10% sont décrits comme responsables de déficience intellectuelle (*versus* 3% des gènes autosomiques). Le grand nombre de gènes du développement sur ce chromosome a d'ailleurs justifié le développement d'analyse de séquençage haut débit par panels ciblés sur le chromosome X (58). Dans l'expérience de la plateforme de Puces à

ADN du CHRU de Lille, la proportion de CNV du chromosome X est significativement plus élevée que celle des CNV impliquant les autosomes : 8,5% des CNV détectés concernent le chromosome X, alors que celui-ci ne représente que 4,7% du génome (données de 2016, 423 CNV dont 36 concernant le chromosome X) (Test exact de Fisher : *p-value* : 0.002). L'interprétation des déséquilibres génomiques du chromosome X est donc une part importante de l'activité de CGH-array dans le bilan étiologique des troubles neuro-développementaux.

L'interprétation des CNV de ce chromosome est plus délicate que celles des CNV des autosomes. En effet, elle doit tenir également compte du sexe du sujet et d'un éventuel biais d'inactivation chez la fille et des gènes échappant à l'inactivation. Le caractère hérité d'une mère asymptomatique n'est pas un argument qui aide à l'interprétation car il peut exister un biais d'inactivation chez elle. De plus, les bases de données de population générale sont moins nombreuses et le sexe du sujet rapporté est difficilement accessible. De même dans les bases de données de patients, le sexe du patient n'est pas toujours renseigné. Dans ces situations, une étude familiale plus étendue est le seul recours pour établir une corrélation génotype phénotype chez les individus masculins porteurs. Elle est cependant parfois peu informative (petite fratrie, enfant unique) ou difficile en pratique (famille éloignée, perdue de vue...) ne permettant pas de conclure à la pathogénicité ou non du CNV retrouvé.

4. CNV et inactivation du chromosome X

Une seule étude réalisée en 2012, a cherché à démontrer si les CNV du chromosome X était en lien avec les biais totaux d'inactivation de du chromosome X retrouvé chez certaines patientes. Les patientes étudiées étaient alors des patientes qui avait bénéficié d'une étude du biais d'inactivation en rapport avec des fausses

couches répétitives et qui avait détecté un biais total d'inactivation et un caryotype normal. Cette étude avait montré une fréquence plus importante de CNV de taille > 5Mb chez les patientes ayant un biais d'inactivation comparé à celles n'ayant pas de biais (59).

H. Objectif de l'étude

L'objectif de notre étude était d'évaluer la pertinence et l'apport de l'étude de l'inactivation de l'X en biologie moléculaire comme aide à l'interprétation des CNV du chromosome X mis en évidence dans le cadre d'un bilan étiologique de déficiences intellectuelle, troubles des apprentissage et/ou anomalies du développement.

II. Matériels et Méthodes

A. Population étudiée

Nous avons analysé l'inactivation de l'X chez 189 patients issus de 155 familles chez lesquelles nous avons détecté un CNV du chromosome X en CGH-array, validé par qPCR, entre 2010 et 2016, sur la Plateforme Puces à ADN du CHRU de Lille. Les propositus des familles nous avaient été adressés dans le cadre de troubles développementaux divers. Les critères d'inclusions dans l'étude étaient les apparentés féminins porteurs de l'anomalie retrouvée chez le propositus, ainsi que tous les propositus de sexe féminin.

Nous avons exclu les patients masculins dont l'anomalie était survenue de novo car l'étude de l'inactivation de l'X chez la mère n'était pas possible dans ce cas, ainsi que les anomalies impliquant uniquement les régions pseudo-autosomiques PAR 1 et PAR2 car le phénotype ne dépend pas de l'inactivation du chromosome X (phénotype identique chez les filles et chez les garçons, gènes échappant à l'inactivation).

B. Recherche des CNV par CGH-array

1. Technique utilisée

Nous avons utilisé des lames de CGH-array pangénomique Agilent® 8x44k (44000 sondes) ou 8x60k (60000 sondes) selon l'année de réalisation de la CGH-array.

La même quantité d'ADN (500ng) du patients et d'ADN de référence de même sexe de la marque Promega® ont été marqués respectivement avec de la cyanine 5 et de la cyanine 3 (ENZO Life Science, Lyon, France). L'hybridation et le rinçage sont réalisés conformément aux instructions du fournisseur.

Les images de l'array étaient acquises sur un scanner G2565BA Agilent® et analysées avec le logiciel Cytogenomics Software v2.7.22.0 (Agilent Technologies®, Santa Clara, CA, USA). La visualisation graphique des résultats a été obtenues avec Cytogenomics Software v2.7.22.0 (Agilent Technologies®, Santa Clara, CA, USA), grâce à un algorithme ADM2 (Z-score avec fenêtre de 10 sondes pour 3 sondes déviante minimum).

2. Interprétation des résultats

Concernant l'analyse des autosomes, lors d'une délétion, le fluorochrome témoin (cyanine 3) est plus représenté que le fluorochrome patient (cyanine 5) donnant un ratio Cyanine 5/Cyanine 3 = $\frac{1}{2}$. Les calculs statistiques sont réalisés par le logiciel en logarithme de base 2, donnant des sondes déviées vers $\log_2(1/2) = -1$. Lors d'une duplication, le ratio Cyanine5/ Cyanine3 est égal à $\frac{3}{2}$ et les sondes sont déviées vers $\log_2(3/2) = +0,6$.

L'analyse des gonosomes est réalisée en « sex match », soit avec un témoin du même sexe que le patient. Ainsi, pour une fille, l'analyse du chromosome X est identique à celle des autosomes (Figure 15). Pour les garçons, lors d'une délétion du chromosome X, le ratio Cyanine5/ Cyanine3 passe à 0/1 soit un $\text{Log}_2(0/1) = -\infty$ et lors d'une duplication, le ratio Cyanine5/ Cyanine3 passe à 2/1 soit un $\text{Log}_2(2/1) = +1$ (Figure 16). Les régions PAR sont analysées comme des régions autosomiques chez les 2 sexes.

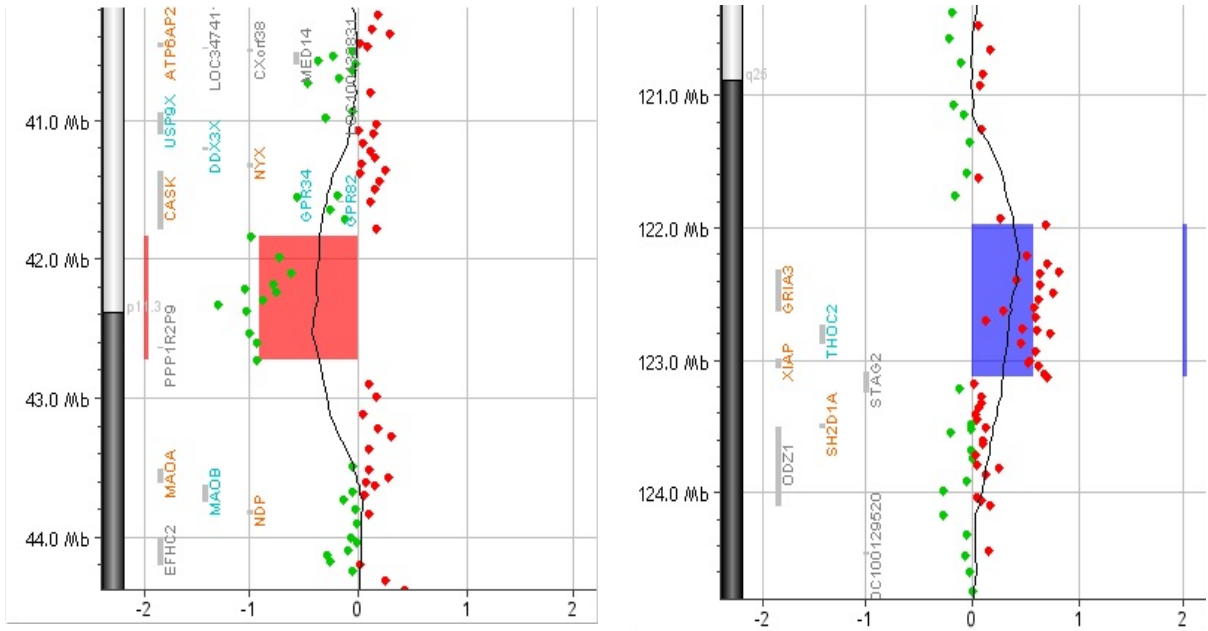


Figure 15 : Représentation d'une délétion en Xp (à gauche) et d'une duplication en Xq (à droite) chez des filles (Capture d'écran du logiciel Cytogénomics, Agilent®). Lors d'une délétion, le nuage de points est décalé vers -1, alors que pour une duplication, le nuage de point est décalé vers + 0,6.

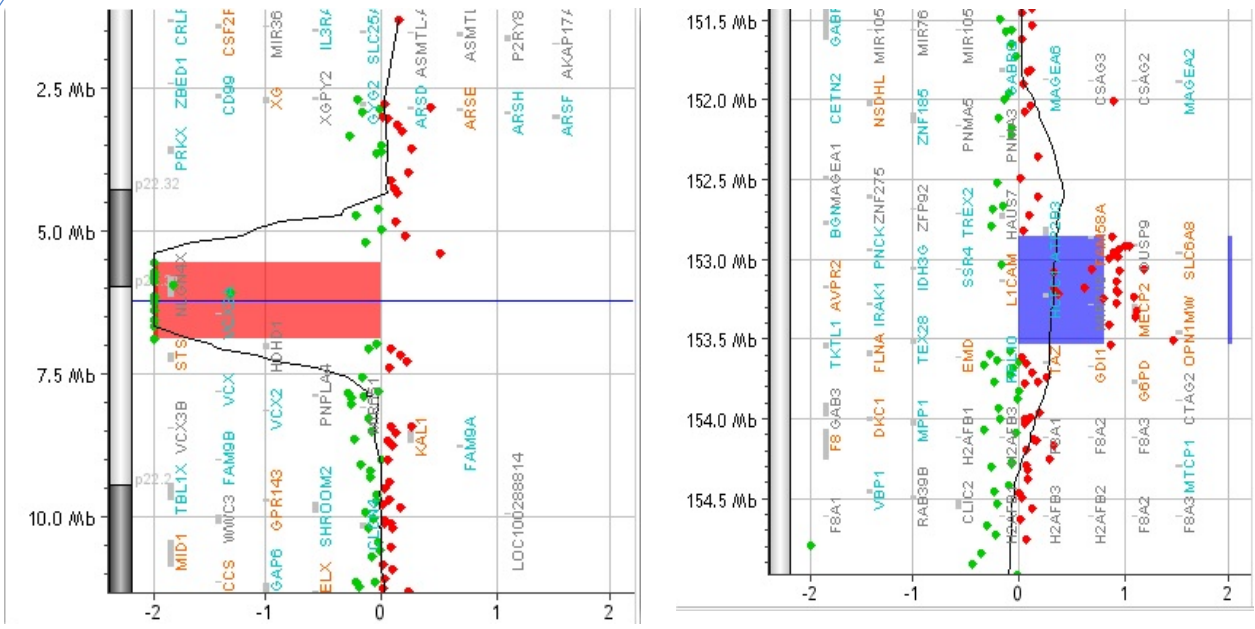


Figure 16 : Représentation d'une délétion en Xp (à gauche) et d'une duplication en Xq28 (à droite) chez des garçons (Capture d'écran du logiciel Cytogénomics, Agilent®). Lors d'une délétion, le nuage de points est décalé vers $-\infty$, alors que pour une duplication, le nuage de point est décalé vers + 1.

3. Validation des résultats et étude familiale par qPCR

La validation des anomalies détectées en CGH-array chez les propositus, ainsi que l'étude familiale permettant de déterminer la transmission de l'anomalie, a été réalisée par PCR quantitative (qPCR). Les amorces ont été « désignées » dans la région du CNV détecté par CGH-array (logiciel Primer 3, primer3.ut.ee/ version dépendante de l'année de réalisation de la qPCR), dont les séquences étaient ensuite alignées sur le génome de référence (hg18 ou hg19 selon l'année de réalisation) (<https://genome.ucsc.edu/>).

Du SYBR Green, intercalant de l'ADN, était utilisé pendant la phase d'élongation (insertion au niveau du petit sillon de l'ADN double-brin). Lorsqu'il est excité par un laser à 497 nm, il émet une fluorescence à 520 nm qui peut être mesuré en temps réel.

La fluorescence mesurée à chaque cycle est proportionnelle à la quantité d'ADN synthétisé et donc à la quantité d'ADN initiale. Un seuil de fluorescence (t) est fixé et on mesure le nombre de cycle au bout duquel ce seuil est atteint (C_t), qui plus il est bas plus la quantité d'ADN initial est élevée. Par la méthode du $\Delta\Delta C_t$, il est ensuite possible de calculer un ratio du nombre de copie du patient (calculé par la différence du C_t entre un gène de référence et le gène cible) sur le nombre de copie du témoin. Chaque analyse est réalisée en triplicat et normalisée par les résultats de la qPCR sur un mélange d'ADNs de témoins sains.

Pour la validation des CNV du chromosome X, les ratios sont donc différents si le sujet était une femme ou un homme. Si les résultats sont normalisés par un pool de patient féminin, le ratio normal pour une femme est égal à 1, soit 2 copies pour la patiente (2 chromosomes X) sur 2 copies du gène de référence (*RPPH1*, situé sur le chromosome 14). Lors d'une délétion, le ratio est de 0,5 (1 copie/2) et lors d'une

duplication, le ratio est de 1,5 (3 copies/2). Pour un homme, le ratio normal est de 0,5 (1 copie du gène situé sur le chromosome X contre 2 copie du gène de référence)), lors d'une délétion il passe à 0 (0copie/2) et lors d'une duplication, il est égal à 1 (2 copies/2).

A l'inverse ,si les résultats sont normalisés par un pool de patients masculins, le ratio normal pour une femme est égal à 2, lors d'une délétion, le ratio est de 1 et lors d'une duplication, le ratio est de 3. Pour un homme, le ratio normal est de 1, lors d'une délétion il passe à 0 et lors d'une duplication, il est égal à 2.

C. Etude de l'inactivation de l'X

1. Technique utilisée

Nous avons étudié l'inactivation de l'X au locus *HUMARA* (*Human Androgen receptor*).

a) Digestion enzymatique

L'ADN du patient était tout d'abord digéré par une enzyme de restriction sensible à la méthylation HpaII. Cette enzyme de restriction ne coupe pas l'ADN lorsqu'il n'est pas méthylé et a un site de restriction de 4pb (5' CCGG – 5' CCGG), permettant une digestion plus importante de l'ADN. La digestion se déroulait lors d'une incubation de 120 minutes à 37°C suivi d'une inactivation de l'enzyme à 95°C pendant 5 minutes. Seul l'allèle situé sur le chromosome actif (donc non méthylé) était digéré et l'allèle situé sur le chromosome inactif (méthylé) restait intact après digestion (Figure 17). Une quantité équivalente d'ADN était soumis au même protocole de digestion mais sans l'enzyme de restriction, les 2 allèles, actif et inactif, restaient alors intacts.

b) Amplification de l'ADN

Les 2 échantillons d'ADN étaient ensuite amplifiés grâce à une enzyme TAQ Platinum (la région étant composée de triplet répété, une enzyme de très forte fidélité est nécessaire), à des amorces anti-sens GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCCTCAT et à des amorces sens TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC marquées différemment selon l'échantillon (Hexachloro-Fluorescein (HEX) pour l'échantillon digéré ; Fluorescein amidite (FAM) pour l'échantillon non digéré). L'amplification est réalisée par PCR selon le cycle suivant, dépendant de l'enzyme et des amorces utilisées : 2min à 94°C - 30 sec à 94°C - 30sec à 67°C - 30sec à 68°C répété 35 fois.

c) Analyse de fragments

Les 2 échantillons étaient ensuite réunis à quantité équivalente sur une plaque, ainsi que du formamide, dénaturant l'échantillon avant le passage au séquenceur, et le marqueur de taille GeneScan™ 400HD ROX™ (ThermoFisher Scientific). L'analyse de fragment se faisait sur le séquenceur ABI3130XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

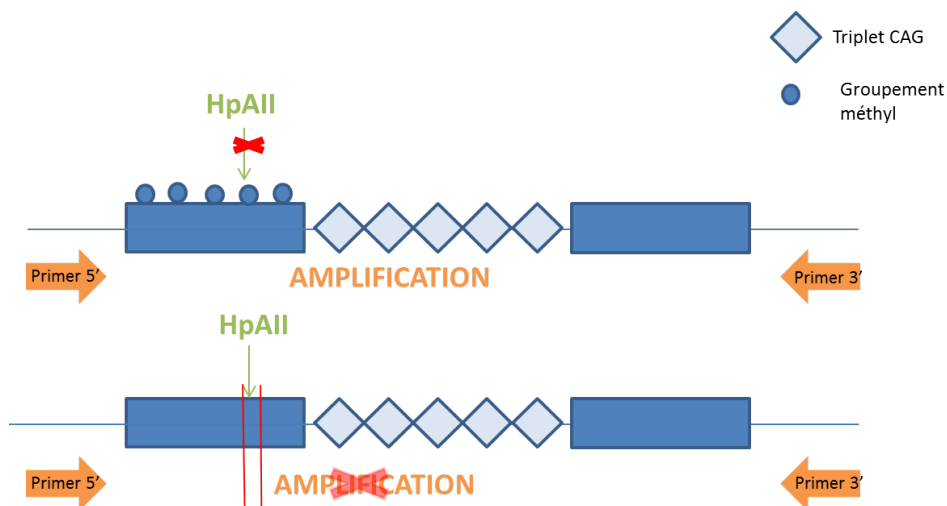


Figure 17 : Représentation de l'exon 1 du gène du récepteur aux androgènes (AR): L'allèle inactif est méthylé empêchant l'action de l'enzyme de restriction HpAII, l'amplification peut avoir lieu. L'allèle actif n'est pas méthylé et est donc coupé par l'enzyme, l'amplification n'a pas lieu.

2. Analyse et interprétation des résultats

Les données brutes issues du séquenceur sont transférées sur le logiciel Gene Mapper (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Puis, les aires sous la courbe de chaque pic sont exportées vers un tableur Excel pour la fin de l'analyse (Figure 18). Le pourcentage d'activité de chaque allèle est calculé à partir d'un ratio d'aire sous la courbe entre le pic issu de l'ADN non digéré et le pic issu de l'ADN digéré, normalisé par la somme des aires sous la courbe des pics issus de l'ADN digéré et la somme des aires sous la courbes des pics issus de l'ADN non digéré selon la formule (60):

$$\% \text{activité de l'allèle 1} = \frac{A2i \times 100}{\frac{A1i \times A2i}{A1t} + A2i}$$

Avec $A2i$: aire sous la courbe de l'allèle 2 digéré ; $A1i$: aire sous la courbe de l'allèle 1 digéré ; $A1t$: aire sous la courbe de l'allèle 1 non digéré (Thouin et al., *Current Protocols in Human Genetics*, 2003).

Cette normalisation est nécessaire pour corriger le biais d'amplification du fragment le plus petit par rapport au plus grand.

Il existait un biais d'inactivation du chromosome X lorsque l'un des 2 allèles était actif à plus de 85% (13).

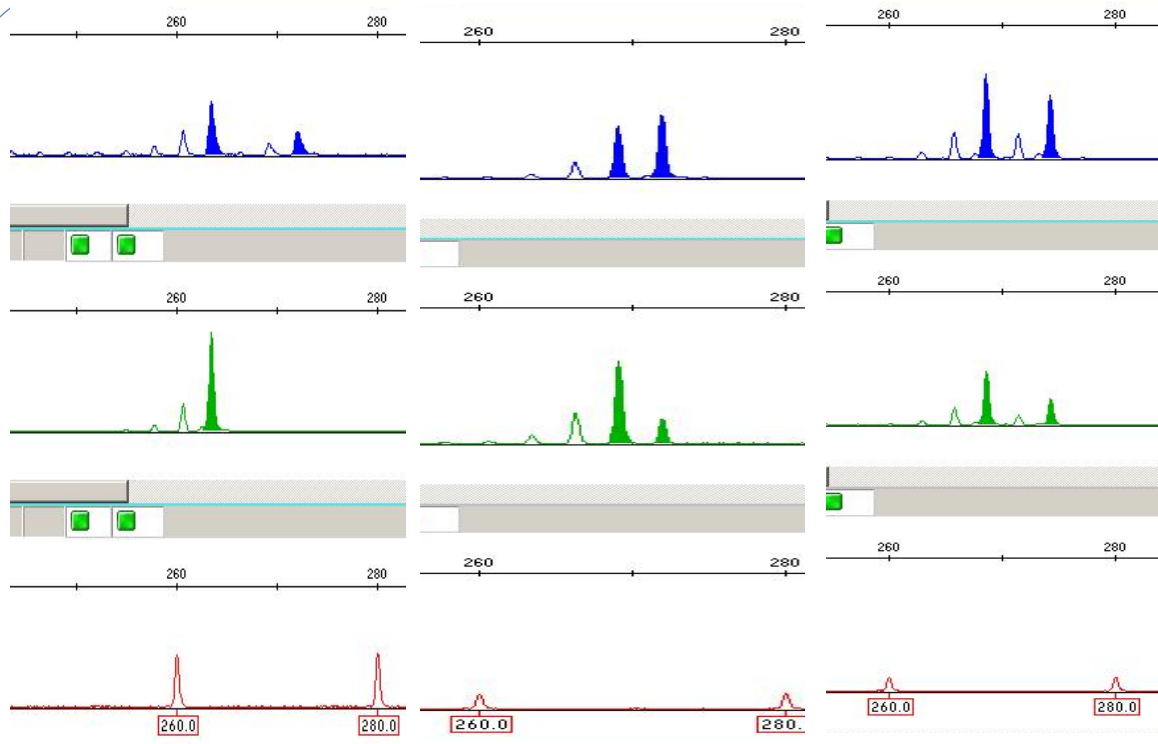


Figure 18 : Représentation des donnée brutes obtenues après transfert vers GeneMapper, Applied Biosystems ® (capture d'écran du logiciel GeneMapper). En bleu, les pics obtenus à partir de l'ADN non digéré, en vert, les pics obtenus à partir de l'ADN digéré, en rouge le standard de taille. Les pics colorés sont les pics. Les pics colorés sont ceux ayant servis à l'analyse. Les autres pics sont des pics « echo ». A droite, patiente ayant un biais total d'inactivation 100 :0, visualisation d'un seul pic au niveau de l'ADN digéré. Au centre et à gauche, patientes ayant une absence de biais (80 :20 et 60 :40 respectivement)

3. *Contrôle qualité*

La technique utilisée au laboratoire a été validée, à l'aveugle, à partir d'échantillons d'autres laboratoires et dont le résultat du biais d'inactivation était connu, avec 1 témoin ayant un biais total d'inactivation, 1 témoin ayant un biais partiel et un témoin n'ayant pas de biais d'inactivation. Les résultats obtenus étaient

cohérents avec le résultat initial rendu par l'autre laboratoire. Ces témoins sont également analysés de nouveau à chaque nouvelle analyse de patients.

De plus, nous réalisons un duplicat de la technique, avec passage du patient sur 2 puits différents du séquenceur pour l'analyse de fragment. Les résultats des 2 techniques sont ensuite moyennés s'ils sont cohérents. Si l'écart est trop important, le résultat n'est pas validé et l'échantillon est réanalysé une nouvelle fois.

Lors de l'analyse, nous avons également vérifié la bonne assignation des pics et le respect de leur taille minimale (100 RFU) et maximale (4000 RFU).

III. Résultats

A. Description de la population

Nous avons analysé l'inactivation du chromosome X au locus HUMARA chez 189 sujets issus de 155 familles (Annexe 2).

L'ensemble des patients et du résultat de l'étude de l'inactivation du chromosome X est représenté sur la Figure 20, page 64.

1. *Propositus féminins*

Cinquante-huit propositus féminins (dont 6 fœtus) ont bénéficié de l'étude de l'inactivation du chromosome X. Huit d'entre-elles étaient porteuses d'une délétion considérée comme pathogène, 16 d'une délétion de signification clinique incertaine, 8 d'une duplication pathogène et 25 d'une duplication de signification clinique incertaine. Parmi ces variations, 13 étaient survenues *de novo*, 16 étaient héritées du père, 19 CNV étaient hérités de la mère et enfin, 10 sujets n'avaient pas pu bénéficier d'une étude familiale complète. Nous avons également pu étudier 19 mères et 1 grand-mère maternelle porteuses du variant retrouvé chez le propositus de leur famille. De plus, pour une variation héritée du père, nous avons pu analyser la grand-mère paternelle, elle-même porteuse de l'anomalie (Tableau 1).

Tableau 1 : Répartition des anomalies survenues chez les propositus féminins en fonction de leur type de leur pathogénicité et de leur transmission.

	Délétion pathogène	Délétion VOUS	Duplication pathogène	Duplication VOUS
Survenue de novo	4	3	5	1
Héritée maternelle	2	4	1	12
Hérités paternelle	0	5	1	10
Transmission non déterminée	2	4	2	2

2. *Propositus masculins*

Pour 97 familles, il s'agissait de *propositus masculins* pour lesquels le CNV était hérité de leur mère. Nous avons étudié 109 apparentées féminines issues de ces familles, en majorité des mères mais également des tantes, des grand-mères ou des sœurs.

Parmi les 97 variants, nous avons détecté 15 délétions (dont 6 pathogènes et 9 *VOUS*) ainsi que 82 duplications (17 pathogènes et 65 *VOUS*).

3. *Répartition des CNV détectés par CGH-array*

Parmi les CNV de taille supérieure à 5 Mb, on recense 4 délétions (taille variant de 6 à 10 Mb environ) et 6 duplications (taille variant de 5 à 11 Mb), dont l'une est héritée. Toutes ces variations ont été considérées comme pathogènes.

Parmi les CNV dont la taille est comprise entre 1 Mb et 5 Mb, il y a 4 délétions et 3 duplications pathogènes, ainsi que 9 délétions et 25 duplications de signification clinique incertaine.

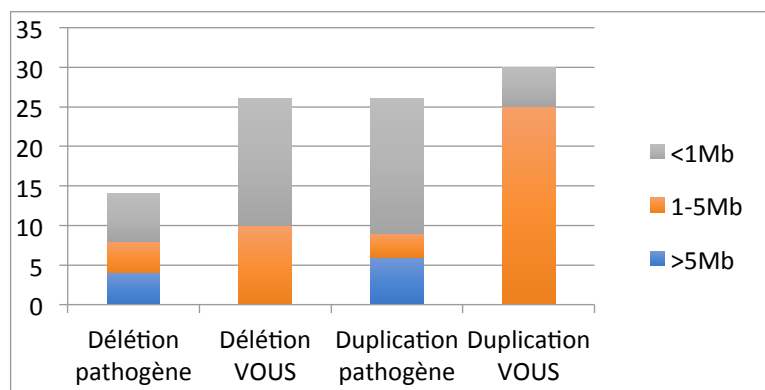


Figure 19 : graphique représentant la répartition des CNV détectés en fonction de leur pathogénicité (en abscisse) et de leur taille (Gris >1 Mb ; Orange 1-5 Mb; Bleu > 5 Mb)

B. Etude de l'inactivation du chromosome X

Pour 5 propositus et 14 apparentées, l'analyse de l'inactivation du chromosome X n'a pas été informative car ces patientes présentaient une homozygotie du nombre de triplets au locus étudié.

1. En fonction de la pathogénicité du CNV

Il existe une différence significative entre la fréquence des patientes ayant un biais d'inactivation dans le groupe des CNV pathogènes par rapport à celui des CNV de signification clinique incertaine ($p < 0,05$).

En effet, chez les patientes porteuses d'un CNV pathogène ($n=44$), 22 présentent un biais d'inactivation, soit 50%, et 22 autres ne présentent pas de biais. Chez les patientes porteuses d'un CNV de signification clinique incertaine ($n=112$), 42 présentent un biais d'inactivation (36%) et 70 ne présentent pas de biais (64%) (Tableau 2).

Tableau 2 : Répartition des résultats de l'inactivation du chromosome X en fonction du type d'anomalie et de leur pathogénicité.

	Biais total	Absence de biais
Délétion pathogène	8	9
Délétion VOUS	9	13
Duplication pathogène	14	2
Duplication VOUS	32	22

Chez les 16 propositus féminins présentant un CNV pathogène, 10 ne présentent aucun biais d'inactivation et une présente un biais d'inactivation en faveur de l'allèle anormal. Pour 5 d'entre elles, l'allèle actif n'est pas déterminable car l'anomalie est survenue *de novo*. Chez les propositus porteuses d'un CNV de signification clinique incertaine (n = 38), 29 ne présentent aucun biais d'inactivation (Tableau 3).

Chez les 28 apparentées porteuses d'un CNV pathogène, 7 présentent un biais d'inactivation en faveur de l'allèle anormal, 9 en faveur de l'allèle normal et 12 ne présentent aucun biais d'inactivation. Chez les 94 apparentés porteuses de CNV de signification clinique incertaine, 56 ne présentent aucun biais d'inactivation, et 38 présentent un biais d'inactivation, dont 15 en faveur de l'allèle anormal (Tableau 4).

Tableau 3 : Répartition des résultats de l'étude de l'inactivation de l'X chez les propositus féminins en fonction de l'anomalie détectée

PROPOSITUS		Biais en faveur de :			Absence de biais
		Allèle anormal	Allèle normal	Non déterminable	
Pathogène	Délétion	1	0	2	5
	Duplication	0	0	3	5
VOUS	Délétion	0	2	1	10
	Duplication	2	2	2	19

Tableau 4 : Répartition des résultats de l'étude de l'inactivation de l'X chez les apparentées en fonction de l'anomalie détectée

APPARENTE		Biais en faveur de :		Absence de biais
		Allèle anormal	Allèle normal	
Pathogène	Délétion	2	3	4
	Duplication	5	6	8
VOUS	Délétion	6	6	8
	Duplication	9	17	48

2. En fonction de la taille du CNV

Aucune différence statistique n'a été mise en évidence dans la fréquence des biais totaux d'inactivation entre les sujets porteurs d'anomalies de taille supérieure à 5 Mb et les sujets porteurs d'anomalie de taille inférieure à 5 Mb ($p=0,17$), ni si on considérait une limite de taille à 1 Mb.

Parmi les 10 sujets porteurs de CNV de taille >5Mb, 6 présentent un biais (60%) et 4 ne présentent aucun biais d'inactivation (40%).

Chez les sujets porteurs de CNV de taille comprise en 1 et 5Mb ($n=46$), 13 présentent un biais d'inactivation (28%) contre 33 ne présentant aucun biais (72%).

Enfin, parmi les sujets présentant un CNV de taille <1Mb ($n=108$), 39 présentent un biais d'inactivation (36%), alors que 69 présentent aucun biais (64%) (Tableau 5).

Tableau 5: Répartition des biais d'inactivation du chromosome X en fonction du type de CNV et de sa taille.

Biais d'inactivation en faveur de :					Absence de biais
		Allèle anormal	Allèle normal	Non déterminable	
Délétion > 5 Mb	Patho	0	0	2	2
	VOUS				
Duplication >5 Mb	Patho	1	0	3	2
	VOUS				
Délétion 1-5 Mb	Patho	2	1	0	3
	VOUS	2	0	1	6
Duplication 1-5 Mb	Patho	0	0	0	2
	VOUS	2	4	1	22
Délétion <1 Mb	Patho	1	2	0	4
	VOUS	4	2	0	12
Duplication <1 Mb	Patho	3	6	0	9
	VOUS	9	17	1	45

3. **Cas particuliers**

a) *Les CNV proches ou touchant XIST*

La CGH-array a détecté chez le propositus P20 une duplication impliquant le gène *XIST* dans son ensemble. Elle présente un biais total d'inactivation (ratio 100:0) ; cependant, cette anomalie étant survenue *de novo*, l'allèle majoritaire n'a pas pu être déterminé.

Par ailleurs, une mère (M24) a transmis à son fils une duplication située à 300-400 kb en aval du gène *XIST*, interprétée comme variant de signification clinique incertaine. Elle présente par ailleurs un biais total d'inactivation en faveur de l'allèle normal.

b) *Les CNV de la région Xp11.2*

Notre population comporte 3 apparentées de garçons issues de 2 familles (M7-M7B et M97) et 1 propositus féminin (P49), toutes 4 porteuses d'une duplication pathogène dans la région Xp11.2 comportant notamment le gène *HUWE1*. Dans les familles 49 et 97, la duplication implique *HUWE1* et mais également les gènes *IQSEC2* et *KDM5C*. La patiente P49 ne présente pas de biais d'inactivation. L'apparentée M97 présente un biais d'inactivation en faveur de l'allèle normal. En revanche, dans la famille M7, la duplication implique *HUWE1* et *PHF8*. La mère (M7) ne présente aucun biais d'inactivation, alors que la grand-mère (M7B) présente un biais d'inactivation en faveur de l'allèle anormal.

c) *Les CNV aux points de cassure récurrents de la région Xp22.31*

Trente-trois sujets (15 propositus et 18 apparentées), issus de 26 familles présentent un CNV dans la région Xp22.31, région de microremaniements

récurrents, d'une taille de 1,5 Mb environ, impliquant notamment les gènes *STS*, *VCX3A*, *HDHD1A* et *PNPLA4*. Sur les 8 sujets ayant une délétion de la région, 6 ne présentent aucun biais d'inactivation. Sur les 25 sujets porteurs d'un gain de copie de cette région, 22 ne présentent aucun biais d'inactivation, et notamment aucun propositus (Tableau 6).

Tableau 6 : Répartition des biais d'inactivation chez les propositus et les apparentés présentant un CNV dans la région Xp22.31

		Biais en faveur de :			Absence de biais
		Allèle anormal	Allèle normal	Non déterminable	
Délétion	Propositus	1	0	1	4
	Apparenté	0	0		2
Duplication	Propositus	0	0	0	9
	Apparenté	1	2		13

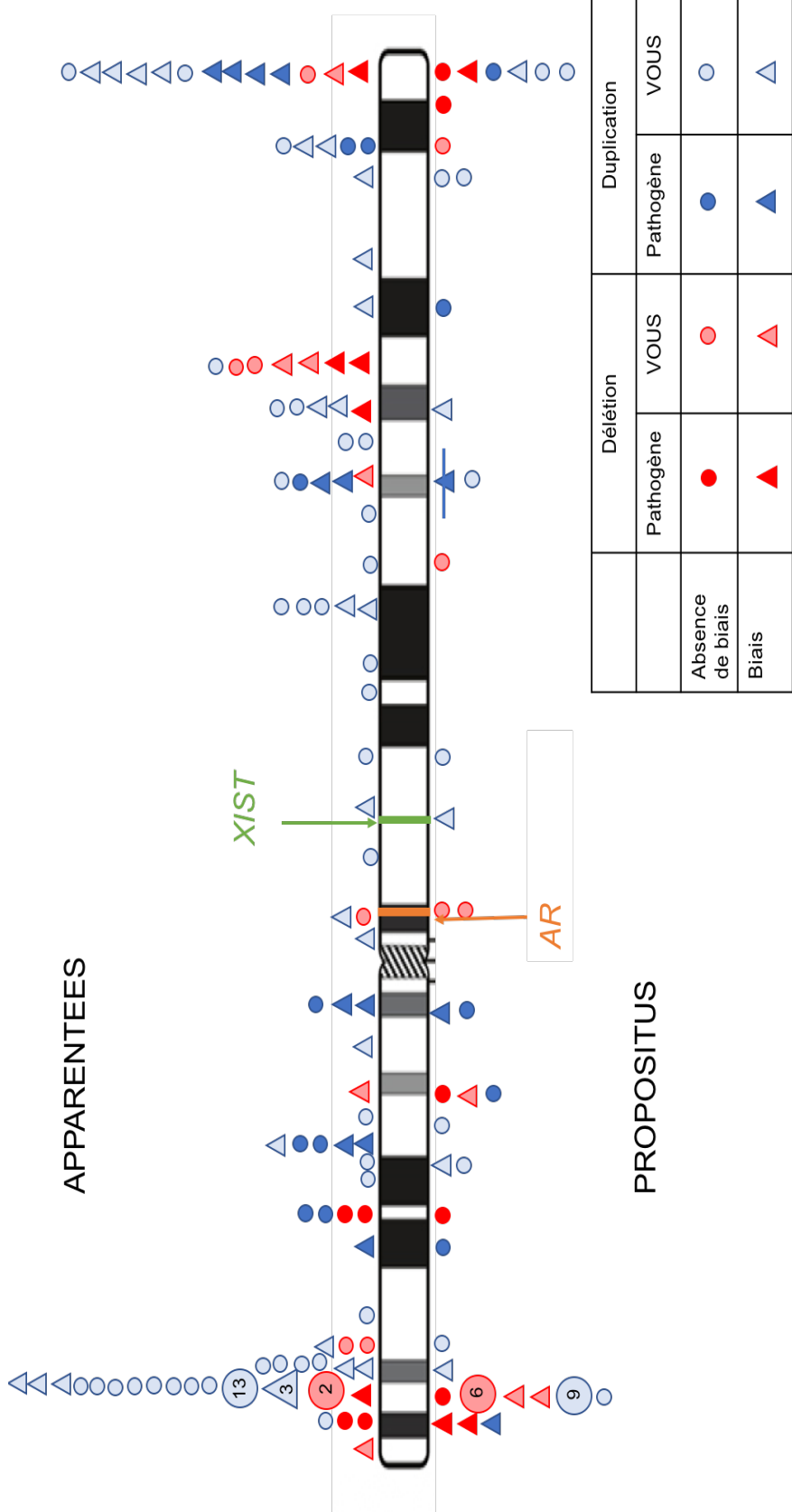


Figure 20 : Schéma représentant l'ensemble des CNV retrouvés chez nos 189 sujets, placés sur un schéma du chromosome X (ISCN 2016). Au niveau du locus Xp22.31, les chiffres correspondent au nombre de patients présentant un CNV récurrent dans cette région et un biais d'inactivation similaire.

IV. Discussion

A. Pathogénicité du CNV et inactivation du chromosome X

Notre étude a montré une fréquence significativement plus élevée de biais d'inactivation chez les femmes porteuses de CNV pathogènes comparée à celles qui sont porteuses de CNV de signification clinique incertaine ($p < 0,05$).

Pour les CNV pathogènes, si on s'intéresse à la sous-population des patientes, pour lesquelles le phénotype est anormal par définition, dans 2/3 des cas, il n'y a pas de biais d'inactivation ce qui est concordant : l'impact du CNV est possible puisque 50% des cellules environ expriment l'allèle anormal. Dans 1/3 des cas, un biais est détecté : dans un cas, il s'agissait d'un biais en faveur de l'allèle anormal, expliquant le phénotype. Malheureusement, dans les 4 autres cas, l'allèle préférentiellement actif n'a pas pu être déterminé car le CNV était survenu *de novo*. Pour la sous-population des apparentées, l'interprétation est plus délicate car elle doit tenir compte du phénotype de l'apparentée. Dans notre étude, 12 sur 44 n'avaient pas de biais et 7 avaient un biais en faveur de l'allèle anormal. Il serait intéressant de corréliser ces données au phénotype de ces apparentées pour déterminer si le groupe des apparentées asymptomatiques concorde avec celui des apparentées avec biais en faveur de l'allèle normal. Ceci conforterait la pertinence d'utiliser le biais d'inactivation comme outil d'interprétation.

Malheureusement, le phénotype des apparentés est rarement détaillé dans les prescriptions et un travail de collecte *a posteriori* permettrait de compléter l'analyse de ces données.

De plus, notre étude est basée sur une recherche de biais d'inactivation uniquement sur l'ADN issu du tissu sanguin (ou du liquide amniotique pour les foetus), qui ne représente pas l'inactivation dans l'ensemble des tissus de l'individu. Une étude à partir de l'ADN issus d'autres tissus (fibroblastes...) pourrait s'avérer

intéressante dans certains cas où le phénotype de l'individu n'est pas cohérent avec le biais d'inactivation évalué sur le sang.

B. Taille du CNV et inactivation du chromosome X

Par ailleurs, notre étude n'a pas réussi à montrer de différence significative entre les CNV de taille supérieure ou inférieure à 5 Mb.

Il existe cependant une tendance à l'augmentation de la fréquence des biais chez les porteuses de CNV de taille supérieure à 5 Mb ($p=0,17$) qui reste non significative du fait d'une faible puissance statistique due à un faible nombre d'individus présentant un CNV de grande taille ($n=10$).

Ce résultat est néanmoins concordant avec l'étude de Jobanputra *et al.*, 2012. La démarche de Jobanputra *et al.* était différente puisqu'ils recherchaient des CNV du chromosome X chez des patientes présentant un biais d'inactivation, à caryotype normal et avec un phénotype normal hormis des fausses-couches récidivantes. Cette étude retrouve une fréquence augmentée de variations de taille supérieure à 5 Mb chez des sujets présentant un biais d'inactivation (59). Cela concorde également avec les constatations en cytogénétique conventionnelle où les anomalies visibles au caryotype entraînent un biais d'inactivation (43).

C. Interprétation des CNV de signification incertaine

L'analyse des résultats dans la population de CNV pathogènes tend à montrer une corrélation entre la pathogénicité du CNV et la présence d'un biais d'inactivation.

Dans la population de CNV VOUS, l'utilisation de cet argument ne peut être appliqué qu'au cas par cas.

1. Les CNV de la région Xp22.31

Notre cohorte comportait notamment des délétions et des duplications récurrentes de la région Xp22.31 impliquant les gènes *STS*, *VCX3A*, *PNPLA4* et *HDHD1A*.

Les délétions du gène *STS* sont impliquées dans le syndrome d'ichtyose lié à l'X, touchant classiquement les garçons. Chez certains patients, l'ichtyose est associée à des troubles neuro-développementaux. Dans l'hypothèse d'un syndrome des gènes contigus, seul le gène *VCX3A* a été évoqué comme étant en lien avec à ces troubles (61)(62). Cependant, dès 2008, les études n'ont pas démontré de surreprésentation de troubles neuro-développementaux entre les patients dont la délétion n'emportait que *STS* et les patients dont les délétions emportaient les 2 gènes (63). Sa pathogénicité dans les troubles neuro-développementaux reste encore sujette à caution, tout au plus en tant que facteur de prédisposition du fait d'une pénétrance très incomplète et d'autant plus chez les sujets féminins.

Dans notre cohorte, nous n'avions pas de mère de patient masculin porteur de cette délétion. Sur les 6 propositus féminins, une seule présente un biais total en faveur de l'allèle anormal. Quand on s'intéresse au phénotype de cette patiente, celui-ci est purement malformatif (trop jeune pour évaluer les troubles neuro-développementaux) sans mention d'ichtyose. De plus, 4 patientes sur 6 ne présentent pas de biais.

Concernant la duplication de cette région, sa pathogénicité est là-encore débattue. En 2011, Furrow et *al.*, suggérait que ce variant était un variant polymorphique, donc sans lien avec la pathologie des sujets (64), mais d'autres études n'excluaient pas un variant de prédisposition aux troubles neuro-développementaux. En 2013, Esplin et *al.*, avait souligné le possible rôle du biais

d'inactivation de l'X dans la pénétrance incomplète de ce CNV, influencée aussi par d'autres facteurs génomiques ou environnementaux non identifiés. La seule mère asymptomatique ayant bénéficié d'une étude de l'inactivation de l'X dans cette étude avait montré un biais total d'inactivation, sans que l'article ne précise en faveur de quel allèle (65). Dans notre étude, une minorité des individus porteurs de cette duplication présente un biais d'inactivation (3/19 apparentées au phénotype non précisé et aucun propositus).

Ceci peut s'expliquer par la nature-même de ces CNV qui, s'ils s'avéraient pathogènes, représenteraient des facteurs de prédisposition. Leurs effets délétères ne seraient pas suffisants en eux-mêmes pour induire un désavantage sélectif donc un biais d'inactivation. L'étude de l'inactivation de l'X ne nous semble pas pertinente dans ce cas particulier des CNV récurrents en Xp22.31.

2. Les CNV non récurrents

L'interprétation de l'étude de l'inactivation de l'X chez les sujets porteurs de CNV non récurrents est plus délicate et nécessite vraiment une interprétation au cas par cas, avec si possible l'analyse de plusieurs membres de la famille voire de plusieurs familles ayant un CNV similaire.

Par exemple, la CGH-array a permis la détection d'une duplication impliquant l'extrémité 5' du gène *DIAPH2* (Xq21.33) dans 3 familles chez 3 patients masculins et 4 de leurs apparentées (M43, M61-M61B et M72). Chez une de ces apparentées il existe un biais en faveur de l'allèle anormal et chez les 3 autres, une absence de biais. Le gène *DIAPH2* est évoqué comme gène causal dans un type d'insuffisance ovarienne précoce (OMIM 300511). Ces résultats sont donc en faveur d'un variant probablement bénin.

De la même façon, 3 duplications impliquant l'extrémité 5' du gène *SYTL5* (Xp11.4) ont été mises en évidence. Ce gène code pour une synaptotagmin-like, ayant un potentiel rôle dans le transport protéique en rapport avec RAB27A. Selon les bases de données (UCSC, RNA-seq Expression data), ce gène est préférentiellement exprimé au niveau cérébral. Dans la famille P25, le propositus féminin présente un biais d'inactivation en faveur de l'allèle anormal et la mère ne présente pas de biais d'inactivation. L'apparentée M25 présente un biais en faveur de l'allèle normal. Néanmoins, le propositus P21 ne présente pas de biais. Ces éléments sont en faveur d'une possible pathogénicité de cette duplication.

Au total, même lorsqu'un CNV est retrouvé dans plusieurs familles, les résultats de l'inactivation de l'X sont à confronter à l'ensemble des données (connaissances scientifiques sur le(s) gène(s), bases de données de population générale ou de patients...) et ne permettent pas une conclusion formelle.

D. Limites de l'analyse de l'inactivation du chromosome X

1. Limites techniques : recombinaisons méiotiques et homozygotie

Hormis le tissu analysé, il existe d'autres limites à la technique utilisée pour étudier l'inactivation de l'X. Il peut exister des recombinaisons méiotiques entraînant une interprétation faussée du taux d'activité de l'un ou l'autre allèle. Par exemple, chez le patient M14, une duplication du gène *MECP2*, CNV pathogène, a été retrouvée sur l'ADN de sa mère asymptomatique. Cependant, il existe un biais total d'inactivation en faveur de l'allèle anormal chez elle, ce qui aurait dû entraîner un phénotype sévère (66). Une des hypothèses est la survenue d'un *crossing-over* entre la région Xq11 où se situe le gène *AR* (locus HUMARA) et la région Xq28 où se situe

le gène *MECP2*. Elle aurait alors transmis la duplication en Xq28 associé à un nombre de triplet au locus *AR* correspondant à son allèle normal. Cette hypothèse est d'autant plus probable que ces 2 locus sont éloignés l'un de l'autre et donc statistiquement plus sujets à recombinaison (Figure 21). Ce risque de fausse interprétation pourrait être diminué par la mise au point de l'étude d'un autre locus, à distance du gène *AR*, par exemple à l'extrémité du bras long du chromosome X.

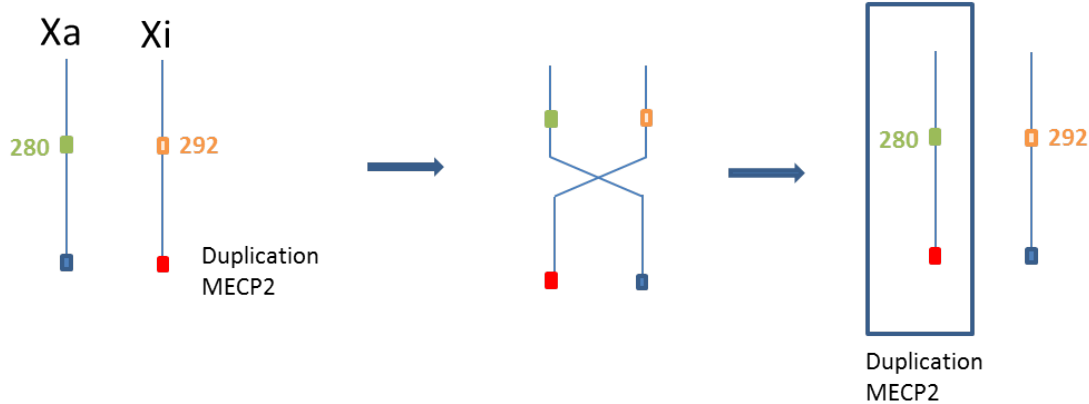


Figure 21 : Représentation schématique d'un crossing-over rendant difficile l'inactivation du chromosome X. Chez la mère, l'*Xa*, normal, est porteur de l'allèle *AR* 280 et l'allèle *Xi* anormal est porteur de l'allèle *AR* 292. Lors de la recombinaison méiotique, l'allèle anormal (duplication *MECP2*) devient lié au l'allèle *AR* 280 et est transmis au fils. Lors de l'étude de l'inactivation de l'*X*, il semble que l'allèle *AR* 280, transmis au fils, soit préférentiellement actif chez la mère. Cependant, chez elle, l'*X* porteur de l'allèle *AR* 280 est normal.

De la même façon, chez 19 de nos sujets, l'analyse n'a pas été contributive car il existait une homozygotie au niveau du locus *AR* (nombre de triplets identique sur chaque allèle) ne permettant pas de les différencier.

En 2015, plusieurs loci pouvant servir à l'étude de l'inactivation de l'*X* ont été mis en lumière et testés, notamment au niveau des loci *CNKSR2* (Xp22.12), *TMEM185A/FAM11A* (Xq28) et *HMGB3/DKFZp779G118* (Xq28). Ces loci, couplés à

l'étude au locus *AR*, pourraient servir à la fois à la détection des recombinaisons méiotiques possibles et à améliorer l'efficacité de la technique en termes d'informativité, en augmentant la probabilité que la patiente soit hétérozygote pour au moins un des deux loci (67).

2. Limites cytogénomiques

a) Gènes échappant à l'inactivation de l'X

Hormis les gènes situés dans les régions PAR, il n'existe pas de liste exhaustive de gènes échappant à l'inactivation du chromosome X. Pourtant, prendre en compte ces gènes dans l'interprétation des CNV et dans l'interprétation des biais du chromosome X est nécessaire. En effet, si le gène candidat échappe à l'inactivation de l'X, ni la recherche d'un biais, ni sa prise en compte dans l'interprétation du CNV ne seraient pertinentes.

Par exemple, la région Xp11.2 est une région de microremaniements fréquents mais aux points de cassure non-récurents. Les duplications de cette région, impliquant le gène *HUWE1* (*HECT, UBA and WWE domain containing 1*) sont considérées comme délétères, les mutations du gène *HUWE1* ayant été décrites dans la déficience intellectuelle non syndromique (68). Cependant, dans cette région, les gènes *KDM5C*, *IQSEC2*, *SMC1A* et *TSPYL2* sont également décrits dans la déficience intellectuelle. Parmi ces gènes, *KDM5C*, *SMC1A* et *IQSEC2* sont décrits comme échappant à l'inactivation de l'X. Le gène *KDM5C* est exprimé à un taux plus élevé chez la femme mais cette sous-expression chez l'homme est compensée par celle de son homologue *KDM5D*, situé sur le chromosome Y (69). Le gène *IQSEC2* est quant à lui exprimé à un taux équivalent chez l'homme et chez la femme, en faveur d'un mécanisme de compensation autre que l'inactivation de l'X

chez la femme, encore non identifié. Ainsi la duplication du gène *IQSEC2* chez l'homme ne possédant pas ce mécanisme de compensation va être pathogène, alors que chez la femme, la duplication va être compensée, avec ou sans biais d'inactivation du chromosome X (70). L'étude de l'inactivation de l'X lors d'une anomalie de ces gènes n'est donc pas pertinente.

b) *XIST et domaines chromatiniens*

Les nouvelles découvertes sur l'organisation 3D du génome en *Topologically Associated Domain* (TAD) pourraient également nous aider dans la compréhension de la régulation de *XIST* et donc de l'inactivation du chromosome X. Ces régions sont des régions physiquement proches au sein du génome, avec une augmentation des interactions entre les gènes contenus dans un même TAD comparé à des gènes situés dans des TAD différents. Ces domaines sont *a priori* conservés et stables au cours de l'évolution (71).

En 2016, une étude de Giorgetti *et al.*, a montré une organisation différentielle des TAD entre le chromosome X actif et le chromosome X inactif chez la souris. Alors que, sur le chromosome X actif, il existe de nombreux TAD, le chromosome X inactif n'est divisé qu'en 2 grand domaines avec perte des TAD, hormis au niveau des clusters de gènes échappant à l'inactivation, ce qui indique que les facteurs de transcriptions sont nécessaires, au moins en partie à leur maintien (72).

Une atteinte au niveau du TAD contenant *XIST* peut ainsi le déréguler et il serait intéressant de déterminer si les CNV situés au niveau des limites des TAD influent sur un éventuel biais d'inactivation du chromosome X.

De même, les CNV touchant le locus XIC ou les éléments régulateurs de *XIST* peuvent induire un biais d'inactivation total chez les apparentées sans que celui-ci ne

soit en lien avec la pathogénicité du CNV chez le propositus, mais uniquement en lien avec le mécanisme d'inactivation de l'X. Utiliser ce biais comme un argument de pathogénicité du CNV chez le propositus serait alors un contre-sens.

Par exemple, dans notre cohorte, la patiente présentant une duplication impliquant *XIST* présente également un biais d'inactivation. Même si le CNV étant survenue de novo et donc l'allèle préférentiellement actif n'est pas déterminable, il est probable que le biais se fait en faveur de l'X non dupliqué. Par ailleurs pour la duplication située juste en aval de *XIST*, il existe chez la mère du propositus un biais d'inactivation en faveur de l'allèle normal. Ce biais peut être uniquement dû à une dérégulation du gène *XIST* et non pas aux gènes impliqués dans la duplication. L'interprétation du CNV, actuellement de signification clinique incertaine, du propositus ne peut donc pas tenir compte du biais d'inactivation chez sa mère.

V. Conclusion-Perspectives

L'étude de l'inactivation du chromosome X est un outil qui peut s'avérer pertinent dans l'interprétation des CNV du chromosome X. Néanmoins, il reste un argument parmi d'autres dans la classification des variants, qui nécessite la confrontation avec les données phénotypiques précises des apparentées, une étude familiale étendue et le traitement au cas par cas des remaniements rares de signification incertaine. Comme souvent dans le diagnostic de pathologies de déterminisme génétique, la confrontation clinico-biologique revêt un rôle central dans l'interprétation des variants rares.

L'étude de l'inactivation de l'X a un seul locus est parfois mise en échec du fait de plusieurs limites inhérentes à la technique, comme les recombinaisons méiotiques ou l'homozygotie au seul locus étudié. Pour pallier à cette limite, le développement d'une étude de l'inactivation du chromosome X à plusieurs loci est à envisager pour augmenter l'informativité de l'analyse.

Enfin, certaines limites, liées aux bases moléculaires du phénomène d'inactivation, comme les gènes échappant à l'inactivation du chromosome X ou les CNV touchant le gène *XIST* ou ses régulateurs, doivent être pris en compte au cas par cas dans l'interprétation sous peine d'une conclusion erronée.

En pratique, dans le cadre du séquençage Haut débit, l'étude de l'inactivation du chromosome X est effectuée au CHRU de Lille de façon systématique lors de la découverte d'une mutation faux-sens dans un gène du panel réalisé dans le bilan étiologique des déficiences intellectuelles. Cet argument s'avère déterminant dans l'interprétation biologique.

Cependant, l'application à des CNV impliquant plusieurs gènes dont la fonction est parfois peu connue rend plus délicate l'utilisation de cet outil. L'analyse systématique de l'inactivation du chromosome X ne nous semble donc pas

recommandée lors de la découverte d'un CNV du chromosome X en ACPA, mais est à discuter en fonction du contexte. Elle semble particulièrement pertinente dans des fratries importantes, où co-existent des patients et des sujets asymptomatiques et où la corrélation avec les phénotypes sera informative. Cet argument aura d'autant plus de poids si le CNV implique un gène candidat fort en lien avec le phénotype.

VI. Bibliographie

1. Vicoso B, Bachtrög D. Progress and prospects toward our understanding of the evolution of dosage compensation. *Chromosome Res Int J Mol Supramol Evol Asp Chromosome Biol.* 2009;17(5):585–602.
2. Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature.* 2003 Jun 19;423(6942):825–37.
3. McKay RD, Bobrow M, Cooke HJ. The identification of a repeated DNA sequence involved in the karyotype polymorphism of the human Y chromosome. *Cytogenet Cell Genet.* 1978;21(1–2):19–32.
4. Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ, Scherer S, McLay K, Muzny D, et al. The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature.* 2005 Mar 17;434(7031):325–37.
5. Hinch AG, Altemose N, Noor N, Donnelly P, Myers SR. Recombination in the human Pseudoautosomal region PAR1. *PLoS Genet.* 2014 Jul;10(7):e1004503.
6. Flaquer A, Fischer C, Wienker TF. A new sex-specific genetic map of the human pseudoautosomal regions (PAR1 and PAR2). *Hum Hered.* 2009;68(3):192–200.
7. Veerappa AM, Padakannaya P, Ramachandra NB. Copy number variation-based polymorphism in a new pseudoautosomal region 3 (PAR3) of a human X-chromosome-transposed region (XTR) in the Y chromosome. *Funct Integr Genomics.* 2013 Aug;13(3):285–93.
8. Hinch AG, Altemose N, Noor N, Donnelly P, Myers SR. Recombination in the human Pseudoautosomal region PAR1. *PLoS Genet.* 2014 Jul;10(7):e1004503.
9. Migeon BR. An overview of X inactivation based on species differences. *Semin Cell Dev Biol.* 2016 Aug;56:111–6.
10. Lyon MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature.* 1961 Apr 22;190:372–3.

11. Disteche CM, Filippova GN, Tsuchiya KD. Escape from X inactivation. *Cytogenet Genome Res.* 2002;99(1–4):36–43.
12. Monk M, Harper MI. Sequential X chromosome inactivation coupled with cellular differentiation in early mouse embryos. *Nature.* 1979 Sep 27;281(5729):311–3.
13. Amos-Landgraf JM, Cottle A, Plenge RM, Friez M, Schwartz CE, Longshore J, et al. X chromosome-inactivation patterns of 1,005 phenotypically unaffected females. *Am J Hum Genet.* 2006 Sep;79(3):493–9.
14. Knudsen GPS, Pedersen J, Klingenberg O, Lygren I, Ørstavik KH. Increased skewing of X chromosome inactivation with age in both blood and buccal cells. *Cytogenet Genome Res.* 2007;116(1–2):24–8.
15. Brown CJ, Lafreniere RG, Powers VE, Sebastio G, Ballabio A, Pettigrew AL, et al. Localization of the X inactivation centre on the human X chromosome in Xq13. *Nature.* 1991 Jan 3;349(6304):82–4.
16. Kay GF. Xist and X chromosome inactivation. *Mol Cell Endocrinol.* 1998 May 25;140(1–2):71–6.
17. Minks J, Baldry SE, Yang C, Cotton AM, Brown CJ. XIST-induced silencing of flanking genes is achieved by additive action of repeat a monomers in human somatic cells. *Epigenetics Chromatin.* 2013 Aug 1;6(1):23.
18. Dixon-McDougall T, Brown C. The making of a Barr body: the mosaic of factors that eXIST on the mammalian inactive X chromosome. *Biochem Cell Biol Biochim Biol Cell.* 2016 Feb;94(1):56–70.
19. Sun S, Fukue Y, Nolen L, Sadreyev R, Lee JT. Characterization of Xpr (Xpct) reveals instability but no effects on X-chromosome pairing or Xist expression. *Transcription.* 2010 Aug;1(1):46–56.
20. Jégu T, Aeby E, Lee JT. The X chromosome in space. *Nat Rev Genet.* 2017

Jun;18(6):377–89.

21. Augui S, Heard E. [Inactivation of X chromosome: cells know how to count two X chromosomes]. *Med Sci MS*. 2008 Jul;24(6–7):584–5.
22. Galupa R, Heard E. X-chromosome inactivation: new insights into cis and trans regulation. *Curr Opin Genet Dev*. 2015 Apr;31:57–66.
23. Vallot C, Rougeulle C. [X chromosome inactivation in human: XACT and XIST, a non coding RNA for each X]. *Med Sci MS*. 2013 Feb;29(2):223–5.
24. Migeon BR, Winter H, Kazi E, Chowdhury AK, Hughes A, Haisley-Royster C, et al. Low-copy-number human transgene is recognized as an X inactivation center in mouse ES cells, but fails to induce cis-inactivation in chimeric mice. *Genomics*. 2001 Jan 15;71(2):156–62.
25. Vallot C, Rougeulle C. Long non-coding RNAs and human X-chromosome regulation: a coat for the active X chromosome. *RNA Biol*. 2013 Aug;10(8):1262–5.
26. Petropoulos S, Edsgård D, Reinius B, Deng Q, Panula SP, Codeluppi S, et al. Single-Cell RNA-Seq Reveals Lineage and X Chromosome Dynamics in Human Preimplantation Embryos. *Cell*. 2016 May 5;165(4):1012–26.
27. Engreitz JM, Pandya-Jones A, McDonel P, Shishkin A, Sirokman K, Surka C, et al. The Xist lncRNA exploits three-dimensional genome architecture to spread across the X chromosome. *Science*. 2013 Aug 16;341(6147):1237973.
28. Gendrel A-V, Heard E. Noncoding RNAs and epigenetic mechanisms during X-chromosome inactivation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30:561–80.
29. Schulz EG, Heard E. Role and control of X chromosome dosage in mammalian development. *Curr Opin Genet Dev*. 2013 Apr;23(2):109–15.
30. Berletch JB, Yang F, Distèche CM. Escape from X inactivation in mice and humans. *Genome Biol*. 2010;11(6):213.

31. Carrel L, Willard HF. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature*. 2005 Mar 17;434(7031):400–4.
32. Yang F, Babak T, Shendure J, Disteche CM. Global survey of escape from X inactivation by RNA-sequencing in mouse. *Genome Res*. 2010 May;20(5):614–22.
33. Berletch JB, Yang F, Xu J, Carrel L, Disteche CM. Genes that escape from X inactivation. *Hum Genet*. 2011 Aug;130(2):237–45.
34. Chow JC, Ciaudo C, Fazzari MJ, Mise N, Servant N, Glass JL, et al. LINE-1 activity in facultative heterochromatin formation during X chromosome inactivation. *Cell*. 2010 Jun 11;141(6):956–69.
35. Schmidt M, Migeon BR. Asynchronous replication of homologous loci on human active and inactive X chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 May;87(10):3685–9.
36. Brown CJ, Carrel L, Willard HF. Expression of genes from the human active and inactive X chromosomes. *Am J Hum Genet*. 1997 Jun;60(6):1333–43.
37. Carrel L, Willard HF. Heterogeneous gene expression from the inactive X chromosome: an X-linked gene that escapes X inactivation in some human cell lines but is inactivated in others. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jun 22;96(13):7364–9.
38. Anderson CL, Brown CJ. Polymorphic X-chromosome inactivation of the human TIMP1 gene. *Am J Hum Genet*. 1999 Sep;65(3):699–708.
39. Wareham KA, Lyon MF, Glenister PH, Williams ED. Age related reactivation of an X-linked gene. *Nature*. 1987 Jul 25;327(6124):725–7.
40. Brown S, Rastan S. Age-related reactivation of an X-linked gene close to the inactivation centre in the mouse. *Genet Res*. 1988 Oct;52(2):151–4.
41. Adler DA, Rugarli EI, Lingenfelter PA, Tsuchiya K, Poslinski D, Liggitt HD, et al. Evidence of evolutionary up-regulation of the single active X chromosome in mammals based on Clc4 expression levels in *Mus spretus* and *Mus musculus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997

Aug 19;94(17):9244–8.

42. Sheardown S, Norris D, Fisher A, Brockdorff N. The mouse *Smcx* gene exhibits developmental and tissue specific variation in degree of escape from X inactivation. *Hum Mol Genet.* 1996 Sep;5(9):1355–60.
43. Leppig KA, Disteche CM. Ring X and Other Structural X Chromosome Abnormalities: X Inactivation and Phenotype. *Semin Reprod Med.* 2001;19(2):147–58.
44. Barr ML, Bertram EG. A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature.* 1949 Apr 30;163(4148):676.
45. Barr ML, Bertram LF, Lindsay HA. The morphology of the nerve cell nucleus, according to sex. *Anat Rec.* 1950 Jul;107(3):283–97.
46. Ohno S, Kaplan WD, Kinosita R. Formation of the sex chromatin by a single X-chromosome in liver cells of *Rattus norvegicus*. *Exp Cell Res.* 1959 Oct;18:415–8.
47. Wilkins L, Grumbach MM, Van Wyk JJ. Chromosomal sex in ovarian agenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1954 Oct;14(10):1270–1.
48. Hong B, Reeves P, Panning B, Swanson MS, Yang TP. Identification of an autoimmune serum containing antibodies against the Barr body. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jul 17;98(15):8703–8.
49. Willard HF, Breg WR. Human X chromosomes: synchrony of DNA replication in diploid and triploid fibroblasts with multiple active or inactive X chromosomes. *Somatic Cell Genet.* 1980 Mar;6(2):187–98.
50. Kałuzewski B. BrdU-Hoechst-Giemsa analysis of DNA replication in synchronized lymphocyte cultures. Study of human X and Y chromosomes. *Chromosoma.* 1982;85(4):553–69.
51. Moraes LM, Cardoso LC, Moura VL, Moreira MA, Menezes AN, Llerena JC, et al.

Detailed analysis of X chromosome inactivation in a 49,XXXXX pentasomy. *Mol Cytogenet.* 2009 Oct 7;2:20.

52. Kutsche R, Brown CJ. Determination of X-chromosome inactivation status using X-linked expressed polymorphisms identified by database searching. *Genomics.* 2000 Apr 1;65(1):9–15.

53. Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet.* 1992 Dec;51(6):1229–39.

54. Malan V, Romana S. [Diagnosis of chromosomal abnormalities by array CGH in constitutional pathology: the end of the first-line karyotype]. *Arch Pediatr Organe Off Soc Francaise Pediatr.* 2012 Apr;19(4):437–42.

55. Stankiewicz P, Beaudet AL. Use of array CGH in the evaluation of dysmorphism, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. *Curr Opin Genet Dev.* 2007 Jun;17(3):182–92.

56. Carreira IM, Ferreira SI, Matoso E, Pires LM, Ferrão J, Jardim A, et al. Copy number variants prioritization after array-CGH analysis – a cohort of 1000 patients. *Mol Cytogenet* [Internet]. 2015 Dec 30;8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4696247/>

57. Loomes R, Hull L, Mandy WPL. What Is the Male-to-Female Ratio in Autism Spectrum Disorder? A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2017 Jun;56(6):466–74.

58. Redin C, Le Gras S, Mhamdi O, Geoffroy V, Stoetzel C, Vincent M-C, et al. Targeted high-throughput sequencing for diagnosis of genetically heterogeneous diseases: efficient mutation detection in Bardet-Biedl and Alström syndromes. *J Med Genet.* 2012 Aug;49(8):502–12.

59. Jobanputra V, Levy B, Kinney A, Brown S, Shirazi M, Yu C, et al. Copy number changes on the X chromosome in women with and without highly skewed X-chromosome inactivation. *Cytogenet Genome Res.* 2012;136(4):264–9.
60. Thouin MM, Giron JM, Hoffman EP. Detection of nonrandom X chromosome inactivation. *Curr Protoc Hum Genet.* 2003 Feb;Chapter 9:Unit9.7.
61. Ben Khelifa H, Soyah N, Ben-Abdallah-Bouhjar I, Gritly R, Sanlaville D, Elghezal H, et al. Xp22.3 interstitial deletion: a recognizable chromosomal abnormality encompassing VCX3A and STS genes in a patient with X-linked ichthyosis and mental retardation. *Gene.* 2013 Sep 25;527(2):578–83.
62. Wu B. Ichthyosis, X-Linked. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2017 [cited 2017 Sep 19]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448149/>
63. Cuevas-Covarrubias SA, González-Huerta LM. Analysis of the VCX3A, VCX2 and VCX3B genes shows that VCX3A gene deletion is not sufficient to result in mental retardation in X-linked ichthyosis. *Br J Dermatol.* 2008 Mar;158(3):483–6.
64. Furrow A, Theisen A, Velsher L, Bawle EV, Sastry S, Mendelsohn NJ, et al. Duplication of the STS region in males is a benign copy-number variant. *Am J Med Genet A.* 2011 Aug;155A(8):1972–5.
65. Esplin ED, Li B, Slavotinek A, Novelli A, Battaglia A, Clark R, et al. Nine patients with Xp22.31 microduplication, cognitive deficits, seizures, and talipes anomalies. *Am J Med Genet A.* 2014 Aug;164A(8):2097–103.
66. San Antonio-Arce V, Fenollar-Cortés M, Oancea Ionescu R, DeSantos-Moreno T, Gallego-Merlo J, Illana Cámara FJ, et al. MECP2 Duplications in Symptomatic Females: Report on 3 Patients Showing the Broad Phenotypic Spectrum. *Child Neurol Open.* 2016 Dec;3:2329048X16630673.

67. Musalkova D, Minks J, Storkanova G, Dvorakova L, Hrebicek M. Identification of novel informative loci for DNA-based X-inactivation analysis. *Blood Cells Mol Dis*. 2015 Feb;54(2):210–6.
68. Froyen G, Corbett M, Vandewalle J, Jarvela I, Lawrence O, Meldrum C, et al. Submicroscopic duplications of the hydroxysteroid dehydrogenase HSD17B10 and the E3 ubiquitin ligase HUWE1 are associated with mental retardation. *Am J Hum Genet*. 2008 Feb;82(2):432–43.
69. Johnston CM, Lovell FL, Leongamornlert DA, Stranger BE, Dermitzakis ET, Ross MT. Large-Scale Population Study of Human Cell Lines Indicates that Dosage Compensation Is Virtually Complete. *PLoS Genet*. 2008;4(1):e9.
70. Moey C, Hinze SJ, Brueton L, Morton J, McMullan DJ, Kamien B, et al. Xp11.2 microduplications including IQSEC2, TSPYL2 and KDM5C genes in patients with neurodevelopmental disorders. *Eur J Hum Genet EJHG*. 2016 Mar;24(3):373–80.
71. Dixon JR, Selvaraj S, Yue F, Kim A, Li Y, Shen Y, et al. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*. 2012 Apr 11;485(7398):376–80.
72. Giorgetti L, Lajoie BR, Carter AC, Attia M, Zhan Y, Xu J, et al. Structural organization of the inactive X chromosome in the mouse. *Nature*. 2016 Jul 18;535(7613):575–9.

VIII. Annexes

IX. Annexe 1 : Liste des gènes de la région PAR1 (extrait de Mangs and Morris, 2007, The Human Pseudoautosomal Region (PAR): Origin, Function and Future)

<i>PLCXD1</i>	phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing 1	Function not known.
<i>GTPBP6</i>	GTP binding protein 6 (putative)	Function not known.
<i>PPP2R3B</i>	Protein phosphatase 2, regulatory subunit B	Exerts regulatory control over the initiation of DNA replication. Over-expression of PR48 causes G1 cell cycle arrest.
<i>SHOX</i>	short stature homeobox	Homeobox-containing gene, thought to be a transcription factor related to short stature syndromes.
<i>CRLF2</i>	cytokine receptor-like factor 2	The receptor for TSLP, a cytokine that enhances the maturation process of dendritic cells and promotes the proliferation of CD4 ⁺ T cells.
<i>CSF2RA</i>	colony-stimulating factor 2 receptor, alpha	The alpha subunit of the receptor for the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). GM-CSF is important for the growth and differentiation of eosinophils and macrophages in the bone marrow, and also regulates cell viability in human embryos.
<i>IL3RA</i>	interleukin 3 receptor, alpha	The alpha subunit of the receptors for interleukin 3.
<i>SLC25A6</i>	solute carrier family 25, member A6	A member of the ADP/ATP translocase family, which has a potential role in Th cell survival and immune cell homeostasis.
<i>ASMTL</i>	acetylserotonin O-methyltransferase-like	Function not known.

<i>P2RY8</i>	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 8	A member of the purine nucleotide G-protein coupled receptor gene family.
<i>CXYorf3</i>		Alternative splicing regulator.
<i>ASMT</i>	acetylserotonin O-methyltransferase	Catalyzes the final reaction in the synthesis of melatonin.
<i>DHRSXY</i>	dehydrogenase/reductase (SDR family) X-linked	Encodes an oxidoreductase of the short-chain dehydrogenase/reductase family
<i>ZBED1</i>	zinc finger, BED-type containing 1	Has been suggested to be involved in the transposition of other transposable elements.
<i>CD99</i>	CD99 molecule	Is a cell surface molecule involved in T-cell adhesion processes. Activation of a distinct domain of CD99 activates a caspase-independent death pathway in T-cells.
<i>XG</i>	XG blood group	The blood group gene XG generates a cell-surface antigen 48 % homologues to CD99.

Annexe 2 : Détails des anomalies retrouvées chez les patients, avec leur interprétation (M pour les apparentés de propositus masculin, P pour les propositus féminins, F pour les apparentés de propositus féminins) (P : Pathogène, VP : Probablement pathogène, VOUS : variant de signification clinique incertaine)

Sujet	Bornes de l'anomalie (hg19)	Type	Pathogénicité	Taille (pb)	Gènes d'intérêt
P13	chrX:5552712_8115153	deletion	P	2 562 441	<i>NLGN4X</i>
F13	chrX:5552712_8115154	deletion	P	2 562 441	<i>NLGN4X</i>
M19	chrX:5798875_6413964	deletion	P	615 089	<i>NLGN4X</i>
P16	chrX:41712375_42721515	deletion	P	1 009 140	<i>CASK</i>
P24	chrX:150153607_1513037 26	deletion	P	1 150 119	<i>HMGB3</i>
F24	chrX:150153607_1513037 27	deletion	P	1 150 119	<i>HMGB3</i>
F24B	chrX:150153607_1513037 28	deletion	P	1 150 119	<i>HMGB3</i>
M32	chrX:29428239_29660907	deletion	P	232 668	<i>IL1RAPL1</i>
M43	chrX:28807526_34963730	deletion	P	6 156 204	<i>IL1RAPL1</i>
M46	chrX:118712769_1187727 23	deletion	P	59 954	<i>UBE2A</i>
M46B	chrX:118712769_1187727 24	deletion	P	59 954	<i>UBE2A</i>
P33	chrX:154120738_1545603 75	deletion	P	439 637	<i>CLIC2</i>
M53	chrX:109763603_1100060 59	deletion	P	242 456	<i>CHRD1</i>
P38	chrX:140557558_1478065 10	deletion	P	7 248 952	<i>FMR1</i>
P40	chrX:3223859_13798048	deletion	P	10 574 189	<i>NLGN4X</i>
M76	chrX:5565752_6897578	deletion	P	1 331 826	<i>NLGN4X</i>
P52	chrX:32086932_32235086	deletion	P	148 154	<i>DMD</i>
P58	chrX:61091_7341273	deletion	P	7 903 645	<i>NLGN4X</i>
M7	chrX:53517494_54056673	duplication	P	539 179	<i>HUWE1</i>
M7B	chrX:53517494_54056674	duplication	P	539 179	<i>HUWE1</i>
M10	chrX:29660848_30162245	duplication	P	501 397	<i>IL1RAPL1</i>
M11	chrX:138938030_1399094 65	duplication	P	971 435	<i>SOX3</i>
M13	chrX:153171761_1536367 03	duplication	P	464 942	<i>MECP2</i>
M14	chrX:153049224_1536091 63	duplication	P	559 939	<i>MECP2</i>

M16	chrX:138938030_1399094 65	duplication	P	971 435	SOX3
M16B	chrX:138938030_1399094 66	duplication	P	971 435	SOX3
P14	chrX:48750710_54056673	duplication	P	5 305 963	HUWE1,U SP27X
M21	chrX:38491539_38547908	duplication	VP	56 369	TSPAN7
P15	chrX:41437748_42529887	duplication	P	1 092 139	CASK
M47	chrX:49694977_51912188	duplication	P	2 317 211	SCHROO M4
M48	chrX:28683348_29063212	duplication	P	379 864	IL1RAPL1
M49	chrX:38491539_38547951	duplication	VP	56 412	TSPAN7
M50	chrX:38491539_38547951	duplication	VP	56 412	TSPAN7
M50B	chrX:38491539_38547952	duplication	VP	56 412	TSPAN7
P34	chrX:61091_7341273	duplication	P	7 903 645	NLGN4X
P39	chrX:100809080_1119207 61	duplication	P	11 111 681	PLP1
M62	chrX:102709377_1032230 99	duplication	P	513 722	PLP1
M69	chrX:102885179_1031359 80	duplication	P	250 801	PLP1
M69B	chrX:102885179_1031359 81	duplication	P	250 801	PLP1
P43	chrX:24997427_33718817	duplication	P	8 721 390	IL1RAPL1
F43	chrX:24997427_33718818	duplication	P	8 721 390	IL1RAPL1
M74	chrX:38491539_38547951	duplication	VP	56 412	TSPAN7
P48	chrX:10497507_20092715	duplication	P	9 595 208	CDKL5
M81	chrX:53283713_53904597	duplication	P	620 884	HUWE1, KDM5C
P49	chrX:53666883_53713697	duplication	P	322 341	HUWE1, KDM5C
P51	chrX: 147580327_155190083	duplication	P	7 609 756	MECP2
P57	chrX:121979085_1231223 39	duplication	P	1 143 254	GRIA3
M96	chrX:121979085_1231223 40	duplication	P	675 822	GRIA3
M96B	chrX:152857869_1535336 91	duplication	P	675 822	GRIA3
M97	chrX:53186624_53727754	duplication	P	541 130	HUWE1, KDM5C
P1	chrX:6457403_8032120	deletion	VOUS	1 574 717	STS VCX3A
M6	chrX:2700316_2772086	deletion	VOUS	71 770	
P3	chrX:99742359_99852663	deletion	VOUS	110 304	

P5	chrX:6457403_8032120	deletion	VOUS	1 574 717	STS VCX3A
F5	chrX:6457403_8032121	deletion	VOUS	1 574 717	STS VCX3A
P6	chrX:6467403_7883723	deletion	VOUS	1 426 320	STS VCX3A
F6	chrX:6467403_7883724	deletion	VOUS	1 426 320	STS VCX3A
P9	chrX:6457403_8032120	deletion	VOUS	1 574 717	STS VCX3A
M22	chrX:6457403_8032121	deletion	VOUS	1 018 552	
M26	chrX:25068860_25163763	deletion	VOUS	94 903	
M26B	chrX:25068860_25163763	deletion	VOUS	94 903	
M28	chrX:154283811_1542989 99	deletion	VOUS	15 188	
M35	chrX:119419800_1194963 56	deletion	VOUS	76 556	
M40	chrX:118390137_1186048 52	deletion	VOUS	214 715	
M40B	chrX:118390137_1186048 52	deletion	VOUS	214 715	
P29	chrX:6552712_8115153	deletion	VOUS	1 562 441	STS VCX3A
P32	chrX:6715268_7704191 hg18	deletion	VOUS	988 923	
P35	chrX:65815490_65953299	deletion	VOUS	137 809	
F35	chrX:65815490_65953299	deletion	VOUS	137 809	
P36	chrX:101804551_1020979 44	deletion	VOUS	293 393	
P37	chrX:41841241_42721515	deletion	VOUS	880 274	
F37	chrX:41841241_42721515	deletion	VOUS	880 274	
M65	chrX:118390137_1185403 85	deletion	VOUS	150 248	
P41	chrX:6552712_8115153	deletion	VOUS	1 562 441	STS VCX3A
P42	chrX:6552712_8097511	deletion	VOUS	1 544 799	STS VCX3A
P44	chrX:7806007_8115153	deletion	VOUS	309 146	
P45	chrX:6552712_8115153	deletion	VOUS	1 562 441	STS VCX3A
P46	chrX:138281469_1391531 89	deletion	VOUS	871 720	
M77	chrX:151814015_1518994 74	deletion	VOUS	85 459	
M83	chrX:103083634_1067914 71	deletion	VOUS	3 707 837	
P53	chrX:65815490_65830324	deletion	VOUS	14 834	

M1	chrX:137303906_1377144 81	duplication	VOUS	410 575	
M2	chrX:139585260_1397432 54	duplication	VOUS	157 994	
M3	chrX:7830111_7830216	duplication	VOUS	605 001	
M3B	chrX:7830111_7830216	duplication	VOUS	605 001	
M4	chrX:122801087_1233579 85	duplication	VOUS	556 898	
M5	chrX:6717746_8372170	duplication	VOUS	1 654 424	STS VCX3A
P2	chrX:6551155_8032120	duplication	VOUS	1 480 965	STS VCX3A
M8	chrX:105167104_1056742 57	duplication	VOUS	507 153	
M9	chrX:7555292_8032120	duplication	VOUS	476 828	
M12	chrX:41077600_41217167	duplication	VOUS	139 567	
P4	chrX:41077600_41217167	duplication	VOUS	1 480 965	
P7	chrX:17764125_18194157	duplication	VOUS	430 032	
P8	chrX:6457403_8032120	duplication	VOUS	1 574 717	STS VCX3A
F8	chrX:6457403_8032120	duplication	VOUS	1 574 717	STS VCX3A
M15	chrX:153927864_1544646 63	duplication	VOUS	536 799	
P10	chrX:6457403_8032120	duplication	VOUS	1 574 717	STS VCX3A
M17	chrX:22132608_22292441	duplication	VOUS	159 833	
P11	chrX:109311146_1098094 99	duplication	VOUS	498 353	
F11	chrX:109311146_1098094 99	duplication	VOUS	498 353	
F11B	chrX:109311146_1098094 99	duplication	VOUS	498 353	
P12	chrX:135427859_1356153 32	duplication	VOUS	187 473	
F12	chrX:135427859_1356153 32	duplication	VOUS	187 473	
M18	chrX:128783483_1293566 06	duplication	vous	573 123	
M20	chrX:6552712_8115153	duplication	VOUS	1 562 441	STS VCX3A
M23	chrX:6552712_8115153	duplication	VOUS	501 474	
M24	chrX:73505754_74131641	duplication	VOUS	625 887	RLIM
M25	chrX:114717120_1149416 76	duplication	VOUS	224 556	SYTL5
P17	chrX: 37207338_38037621	duplication	VOUS	830 283	

F17	chrX: 37207338_38037621	duplication	VOUS	830 283	
P18	chrX:7594633_8075153	duplication	VOUS	480 520	
M27	chrX:19611746_19948098	duplication	VOUS	336 352	
P19	chrX:15264088_15657752	duplication	VOUS	393 664	
F19	chrX:15264088_15657752	duplication	VOUS	393 664	
P20	chrX:72902578_74232626	duplication	VOUS	1 330 048	<i>XIST</i>
P21	chrX: 37850095_37953580	duplication	VOUS	103 485	<i>SYTL5</i>
M29	chrX:94042855_95133674	duplication	VOUS	1 090 819	
P22	chrX:6552712_8115153	duplication	VOUS	1 562 441	
F22	chrX:6552712_8115153	duplication	VOUS	1 562 441	<i>STS</i> <i>VCX3A</i>
P23	chrX:6552712_8115153	duplication	VOUS	1 562 441	<i>STS</i> <i>VCX3A</i>
M30	chrX:12286452_12666624	duplication	VOUS	380 172	
M31	chrX:48320474_48774953	duplication	VOUS	454 479	
M33	chrX:6552712_8115153	duplication	VOUS	1 562 441	<i>STS</i> <i>VCX3A</i>
M34	chrX:95498487_96502837	duplication	VOUS	1 004 350	<i>DIAPH2</i>
M36	chrX:5798875_5961948	duplication	VOUS	163 073	
P25	chrX:37850095_37953580	duplication	VOUS	103 485	<i>SYTL5</i>
F25	chrX:37850095_37953580	duplication	VOUS	103 485	<i>SYTL5</i>
P26	chrX:7584633_8164803	duplication	VOUS	1 416 320	<i>STS</i> <i>VCX3A</i>
F26	chrX:7584633_8164803	duplication	VOUS	1 416 320	<i>STS</i> <i>VCX3A</i>
P27	chrX:74494014_74649810	duplication	VOUS	155 796	
F27	chrX:74494014_74649810	duplication	VOUS	155 796	
M37	chrX:106258959_1065176 91	duplication	VOUS	259 002	
M38	chrX:148123190_1485858 34	duplication	VOUS	462 644	
M39	chrX:8601505_8665983	duplication	VOUS	64 478	
M41	chrX:65815490_65895015	duplication	VOUS	79 525	
M42	chrX:12977213_13640095	duplication	VOUS	662 882	
M44	chrX: 138886274_139261901	duplication	VOUS	375 627	
M45	chrX: 154120738_154560375	duplication	VOUS	439 637	
P28	chrX:154065204_1543217 72	duplication	VOUS	256 568	

F28	chrX:154065204_1543217 72	duplication	VOUS	256 568	
P30	chrX:103094005_1032230 99	duplication	VOUS	129 094	
P31	chrX:149116213_1494654 59	duplication	VOUS	349 246	
F31	chrX:149116213_1494654 59	duplication	VOUS	349 246	
M51	chrX:8448259_8665983	duplication	VOUS	217 724	
M52	chrX 37850095_37953580	duplication	VOUS	103 485	
M54	chrX:101970749_1022483 99	duplication	VOUS	277 650	
M55	chrX:6552712_8115153	duplication	VOUS	1 562 441	
M56	chrX:74494014_74649810	duplication	VOUS	155 796	
M57	chrX:6552712_8097511	duplication	VOUS	1 544 799	<i>STS VCX3A</i>
M58	chrX:6552712_8115153	duplication	VOUS	1 562 441	<i>STS VCX3A</i>
M59	chrX:85819982_85917784	duplication	VOUS	97 802	
M60	chrX:87794699_88453_61 2	duplication	VOUS	658 913	
M61	chrX:95387981_95965657	duplication	VOUS	577 676	<i>DIAPH2</i>
M61B	chrX:95387981_95965657	duplication	VOUS	577 676	<i>DIAPH2</i>
M63	chrX:6522712_8115153	duplication	VOUS	1 592 441	<i>STS VCX3A</i>
M63B	chrX:6522712_8115153	duplication	VOUS	1 592 441	<i>STS VCX3A</i>
M64	chrX:7584633_8115153	duplication	VOUS	530 520	
M66	chrX:7820636_8115153	duplication	VOUS	294 517	
M67	chrX:7820636_8295650	duplication	VOUS	475 014	
M68	chrX:11720098_12160740	duplication	VOUS	440 642	
M70	chrX:7744132_8164803	duplication	VOUS	420 671	
M71	chrX:16610971_16717235	duplication	VOUS	106 264	
M72	chrX:96396743_97090387	duplication	VOUS	693 644	<i>DIAPH2</i>
M73	chrX:71792872_71925753	duplication	VOUS	132 881	
M75	chrX:114142995_1146226 43	duplication	VOUS	479 648	
M75B	chrX:114142995_1146226 43	duplication	VOUS	479 648	
M78	chrX:6552712_8115153	duplication	VOUS	1 562 441	<i>STS VCX3A</i>
P47	chrX:6552712_8115153	duplication	VOUS	1 562 441	<i>STS VCX3A</i>

M79	chrX:116870319_1171983 92	duplication	VOUS	328 073	
M80	chrX:6552712_8115153	duplication	VOUS	1 562 441	STS VCX3A
P50	chrX:154120738_1545603 75	duplication	VOUS	439 637	
M82	chrX:23604216_25068919	duplication	VOUS	1 464 703	
M84	chrX:6552712_8115153	duplication	VOUS	1 562 441	STS VCX3A
M85	chrX:108434513_1086735 82	duplication	VOUS	239 069	
M86	chrX: 8556249_8959724	duplication	VOUS	403 475	
M87	chrX:106957968_1074368 95	duplication	VOUS	478 927	
M88	chrX:99742359_99957085	duplication	VOUS	214 726	
M89	chrX:61931689_63141682	duplication	VOUS	1 209 993	
M90	chrX:7867300_8115153	duplication	VOUS	247 853	
M91	chrX:34668860_35296972	duplication	VOUS	628 112	
P54	chrX:12070932_12210523	duplication	VOUS	139 591	
F54	chrX:12070932_12210523	duplication	VOUS	139 591	
M92	chrX:153140483_1532385 77	duplication	VOUS	98 094	
M93	chrX:100316595_1007411 50	duplication	VOUS	424 555	
P55	chrX:6552712_8115153	duplication	VOUS	1 562 441	STS VCX3A
F55	chrX:6552712_8115153	duplication	VOUS	1 562 441	STS VCX3A
M94	chrX:151899415_1522156 37	duplication	VOUS	316 222	
P56	chrX:134976995_1356781 34	duplication	VOUS	701 139	
M95	chrX:6552712_8115153	duplication	VOUS	1 562 441	STS VCX3A

AUTEUR : Nom : PAYET

Prénom : Frédérique

Date de Soutenance : 10 octobre 2017

Titre de la Thèse : Apport de l'étude de l'inactivation du chromosome X dans l'interprétation des microremaniements détectés par ACPA dans le bilan étiologique des anomalies du développement

Thèse - Médecine - Lille 2017

Cadre de classement : *Génétique Médicale*

DES + spécialité : *Génétique Médicale*

Mots-clés : **Chromosome X - Inactivation - Copy Number Variation – CGH-array- XIST**

Résumé :

Introduction : Chez l'Homme, la paire de chromosomes sexuels diffère entre la femme XX et l'homme XY. Pour palier à ce déséquilibre génique, la femme inactive aléatoirement, lors d'un phénomène moléculaire complexe l'un ou l'autre de ses chromosomes dans chacune de ses cellules (ratio 50 :50). Cependant, chez certaines femmes, il existe un biais d'inactivation en faveur de l'un deux, notamment en raison d'anomalies chromosomiques de grande taille, visible au caryotype, touchant l'un des 2 chromosomes X ou une anomalie génique pathogène. Depuis l'avènement de l'ACPA (Analyse chromosomique sur Puce à ADN), de nombreux remaniements (CNV) du chromosome X, non visibles sur le caryotype conventionnel, ont été mis en évidence mais sont d'interprétation difficile du fait de la nécessité de prendre en compte le sexe du patient et un éventuel biais d'inactivation. Cependant, hormis une étude montrant une fréquence plus élevée de CNV de taille >5 Mb chez les femmes ayant un biais d'inactivation de l'X, aucune étude n'a été réalisée sur le lien entre la présence de CNV et un biais d'inactivation. L'objectif de cette étude était d'évaluer la pertinence de l'étude de l'inactivation du chromosome X dans l'interprétation des CNVs du chromosome X mis en évidence dans le bilan étiologique des anomalies du développement.

Méthodes : Nous avons réalisé une étude de l'inactivation du chromosome X au locus HUMARA chez 189 sujets porteurs d'un CNV du chromosome X détecté en CGH-array au sein de la Plateforme Puce à ADN du CHRU de Lille (58 propositus et 128 apparentées).

Résultats : Il existe une fréquence statistiquement plus élevée de biais d'inactivation chez les sujets porteurs de CNV interprétés comme pathogène avant l'étude de l'inactivation par rapport au sujets porteurs de CNV de signification clinique incertaine ($p < 0.05$). La taille du CNV semble également être un facteur influençant la présence d'un biais d'inactivation.

Conclusion : L'étude de l'inactivation de l'X est un outil qui peut s'avérer pertinent dans l'interprétation des CNV du chromosome X. Néanmoins, il reste un argument parmi d'autres dans la classification des variants, nécessitant la confrontation avec des données phénotypiques précises, une étude familiale étendue et le traitement au cas par cas des remaniements rare de signification clinique incertaine. A ce jour, l'interprétation des CNVs du chromosome X reste un challenge en ACPA.

Composition du Jury :

Président : Madame le Professeur Sylvie MANOUVRIER-HANU

Assesseurs : Madame le Professeur Bérénice DORAY
Madame le Professeur Catherine ROCHE-LESTIENNE

Directeur de Thèse : Madame le Docteur Sonia BOUQUILLON