



HAL
open science

Génétique du développement des membres : contribution à son déterminisme moléculaire à partir de modèles d'étude en pathologie humaine

Florence Petit

► **To cite this version:**

Florence Petit. Génétique du développement des membres : contribution à son déterminisme moléculaire à partir de modèles d'étude en pathologie humaine. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2014. Français. NNT : 2014LIL2S053 . tel-01159394

HAL Id: tel-01159394

<https://theses.hal.science/tel-01159394>

Submitted on 3 Jun 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE LILLE 2 DROIT ET SANTE
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE - SANTE**

**Doctorat d'Université
Discipline : Génétique**

Thèse d'Université soutenue publiquement le 4 Décembre 2014 par

Florence PETIT

**Génétique du développement des membres :
Contribution à son déterminisme moléculaire à partir de modèles
d'étude en pathologie humaine**

Membres du Jury :

Madame le Professeur Sylvie ODENT
Madame le Professeur Corinne ANTIGNAC
Madame le Docteur Laurence LEGEAI-MALLET
Madame le Professeur Sylvie MANOUVRIER-HANU
Madame le Docteur Muriel HOLDER-ESPINASSE
Madame le Docteur Fabienne ESCANDE

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

RESUME

Le développement du membre passe par des étapes complexes de polarisation, dans les axes dorso-ventral et antéro-postérieur, qui ont lieu en parallèle de la croissance proximo-distale du bourgeon. Le déterminisme génétique de ces étapes est encore imparfaitement connu. Il implique des facteurs de transcription dont l'expression est temporo-spatiale spécifique, compliquant leur identification. L'étude de cohortes homogènes de patients porteurs d'anomalies développementales des membres est l'un des moyens d'identifier de nouveaux mécanismes impliqués dans leur modélisation. A cet effet, nous avons étudié une cohorte de patients présentant des mains et pieds fendus correspondant à un défaut de la signalisation proximo-distale ; une grande famille de polydactylie préaxiale syndromique et une série de patients atteints de dysostose acro-faciale préaxiale comme modèles d'étude de la polarisation antéro-postérieure ; et enfin des patients atteints de Syndrome Nail-Patella correspondant à un défaut de polarisation dorso-ventrale. L'identification du déterminisme moléculaire en cause dans les trois premières pathologies étudiées nous a permis de souligner le rôle crucial de la régulation de l'expression génique dans la modélisation du bourgeon de membre, et plus généralement dans le développement embryonnaire.

Mots-clés : Malformations des membres, Syndrome Nail-Patella, LMX1B, polydactylie préaxiale, SHH, SHFLD3, BHLHA9, Syndrome de Nager, SF3B4

Genetics of limb development: from human limb malformations to the identification of molecular mechanisms

SUMMARY

Limb development requires complex patterning along dorso-ventral, antero-posterior and proximo-distal axes. The molecular mechanisms underlying these development stages are not fully delineated yet. Identification of the transcription factors involved is challenging because of their spatio-temporally restricted expression during limb bud development. Analysis of carefully selected series of patients affected with limb malformations is a clue to identify new mechanisms involved in this patterning. For this purpose, we studied a cohort of patients affected with split hand/foot malformations corresponding to a defect in the signalisation center of proximo-distal growth; a large family affected with syndromic preaxial polydactyly and a series of preaxial acro-facial dysostosis cases as models of antero-posterior polarization; and eventually several families presenting with Nail-Patella Syndrome corresponding to a disorder of dorso-ventral polarization. Identification of the molecular bases of the first three conditions studied has led us emphasizing the crucial role of gene expression regulation during limb bud patterning, and more generally during embryological development.

Key words: Limb malformations, Nail-Patella Syndrome, LMX1B, preaxial polydactyly, SHH, SHFLD3, BHLHA9, Nager Syndrome, SF3B4

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés au Laboratoire de Biochimie, Biologie Moléculaire – Hormonologie, Métabolisme - Nutrition, Oncologie du Centre de Biologie-Pathologie du Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille, dirigé par le Pr. Nicole PORCHET, et au sein de l'unité INSERM U837. Ils ont été effectués dans le cadre de la labellisation Bonus-Qualité-Recherche obtenue par le Pr. Sylvie MANOUVRIER-HANU sur la thématique « Génétique médicale et fonctionnelle des anomalies du développement, notamment des membres ».

Ces travaux ont en partie été financés par le Fonds hospitalier d'aide à l'émergence et à la structuration des activités et équipes de recherche du CHRU de Lille.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail.

Professeur Sylvie ODENT

Vous me faites l'honneur de présider le jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mes remerciements sincères.

Professeur Corinne ANTIGNAC

Je vous suis extrêmement reconnaissante du temps que vous avez consacré à participer au suivi de ma thèse depuis son commencement en 2011, puis d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mon plus profond respect.

Docteur Laurence LEGEAI-MALLET

Je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance pour avoir consacré du temps à juger ce travail.

Professeur Sylvie MANOUVRIER-HANU

Je vous remercie de m'avoir confié ce travail qui vous tenait à cœur et d'avoir mis en œuvre tous les moyens nécessaires pour qu'il puisse être mené à bien. Je suis honorée d'avoir eu l'occasion d'écrire la première thèse de notre jeune équipe, qui sera je l'espère suivie d'une longue série de travaux. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance et de mon profond dévouement.

Docteur Muriel HOLDER-ESPINASSE

Merci Muriel d'avoir accepté d'encadrer cette thèse dont le parcours a été émaillé de rebondissements. Tu as souhaité poursuivre ce travail jusqu'à son aboutissement malgré ton éloignement professionnel. Trouve ici l'expression de mes remerciements pour ton soutien indéfectible.

Docteur Fabienne ESCANDE

Un grand merci Fabienne pour ta présence au quotidien dans l'encadrement scientifique au cours de ces trois années passées au laboratoire. J'ai pu apprécier tes grandes qualités humaines et professionnelles et je suis heureuse que la création de RADEME nous permette de poursuivre ensemble les travaux initiés au cours de cette thèse.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont contribué à ces travaux :

L'ensemble des patients qui ont accepté de participer aux projets de recherche. Merci en particulier à la famille bordelaise pour son investissement dans le travail sur le syndrome Nail-Patella.

Anne-Sophie JOURDAIN, Un immense merci pour ton dynamisme et ta motivation sans lesquels ce travail n'aurait pas été possible. Je suis très heureuse de pouvoir continuer à travailler avec toi à l'avenir et t'adresse mes meilleurs vœux de réussite dans les projets que tu vas mener pour ta thèse au sein de RADEME.

Professeur Nicole PORCHET, Je vous suis sincèrement reconnaissante pour votre investissement tout au long de ma thèse, en particulier pour les discussions toujours constructives autour des projets. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde admiration pour vos qualités visionnaires et les perspectives que vous apportez en toutes circonstances.

Toute l'équipe du laboratoire de Biochimie et Oncologie Moléculaire du Centre de Biologie-Pathologie du CHRU de Lille. Merci pour votre accueil et l'aide apportée sur les plans technique et bioinformatique. Merci en particulier à l'équipe de Culture Cellulaire avec qui j'ai eu le plaisir de travailler pour les nombreuses transfections cellulaires réalisées.

Martine DUTERQUE, Je vous remercie sincèrement pour avoir accepté de participer à mon comité de suivi de thèse et pour vos conseils scientifiques qui m'ont été d'une grande aide. Je vous suis très reconnaissante du temps que vous avez consacré au projet, en particulier pour la mise au point des tests fonctionnels.

Pascal PIGNY, Je vous remercie sincèrement pour vos conseils scientifiques qui ont été une aide précieuse pour les choix de stratégie au cours de certains projets.

Lucie COPPIN, Un grand merci pour ta disponibilité et ton aide dans les tests fonctionnels. J'ai pu apprécier tes conseils techniques dans les longues périodes où les manips ne donnent pas les résultats escomptés !

Boris KEREN, Je te remercie vivement pour ta disponibilité et ton investissement dans l'analyse bioinformatique des données de SNP-array.

Mes collègues du Service de Génétique Clinique, merci pour l'aide au recrutement des patients et pour m'avoir permis de consacrer du temps à ces travaux de recherche. Pour la relecture du manuscrit, le soutien moral et l'aide scientifique, merci en particulier à Jamal GHOU MID et Frédéric FRENOIS.

Sommaire

| | |
|---|------------|
| INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX | 9 |
| LISTE DES ABREVIATIONS | 10 |
| AVANT-PROPOS | 12 |
| CHAPITRE I : CROISSANCE ET DIFFERENCIATION PROXIMO-DISTALE DU MEMBRE | 15 |
| I. Centre de signalisation : la crête apicale ectodermique (<i>Apical Ectodermal Ridge, AER</i>)..... | 17 |
| I.1 Induction de l'AER | 18 |
| I.2 Maturation de l'AER..... | 18 |
| I.3 Régression de l'AER..... | 19 |
| II. Réseaux de gènes impliqués..... | 19 |
| II.1 La voie de signalisation des FGFs | 19 |
| II.2 La voie de signalisation des BMPs | 23 |
| II.3 Le réseau de <i>TP63</i> | 25 |
| III. Modèle d'étude : les malformations de type mains et pieds fendus..... | 28 |
| III.1 SHFM : aspects cliniques | 28 |
| III.1.1 SHFM non syndromiques | 29 |
| III.1.2 SHFM syndromiques..... | 30 |
| III.2 Génétique des SHFM..... | 31 |
| III.2.1 Locus SHFM1/EEC1 en 7q21 | 31 |
| III.2.2 Locus SHFM3 en 10q24 | 31 |
| III.2.3 Locus SHFM4/EEC3, gène <i>TP63</i> | 32 |
| III.2.4 Locus SHFM5 en 2q31 | 32 |
| III.2.5 Locus SHFM6, gène <i>WNT10B</i> | 33 |
| III.2.6 Autres loci candidats | 33 |
| IV. <i>SHFLD3</i> : Nos données cliniques et moléculaires..... | 34 |
| ARTICLE 1 | 38 |
| DISCUSSION | 51 |
| CHAPITRE II : POLARISATION ANTERO-POSTERIEURE DU MEMBRE | 56 |
| I. Centre de signalisation : la zone d'activité polarisante (<i>ZPA</i>)..... | 56 |
| II. La voie de signalisation <i>SHH</i> | 57 |
| III. Régulation de <i>SHH</i> au cours du développement du membre..... | 59 |
| III.1 La ZRS (<i>ZPA regulatory sequence</i>)..... | 59 |
| III.2 Facteurs de transcription impliqués dans la régulation du domaine d'expression de <i>SHH</i> | 61 |
| IV. Premier modèle d'étude : les polydactylies préaxiales..... | 64 |
| IV.1 Polydactylies préaxiales et anomalies de la ZRS | 66 |
| IV.1.1 Mutations gain de fonction de la ZRS..... | 66 |
| IV.1.2 Gain en nombre de copies de la ZRS | 66 |
| IV.1.3 Limites des corrélations génotype-phénotype..... | 67 |
| IV.2 Polydactylies préaxiales et anomalies de <i>GLI3</i> | 67 |
| IV.3 Identification d'un nouvel élément cis-régulateur de <i>SHH</i> responsable de polydactylie préaxiale autosomique dominante avec hypertrichose | 68 |
| ARTICLE 2 | 71 |
| DISCUSSION | 103 |
| V. Deuxième modèle d'étude : Le Syndrome de Nager | 105 |
| V.1 Signes cliniques du Syndrome de Nager..... | 105 |
| V.2 Génétique du Syndrome de Nager | 106 |
| V.3 Nos données cliniques et moléculaires dans 14 familles de Syndrome de Nager | 108 |
| ARTICLE 3 | 110 |
| DISCUSSION | 123 |
| CHAPITRE III : POLARISATION DORSO-VENTRALE DU MEMBRE | 126 |
| I. Centre de signalisation : l'ectoderme dorsal..... | 126 |
| II. La voie de signalisation <i>Wnt7a</i> | 126 |
| II.1 Voie canonique de la β -Caténine | 127 |
| II.2 Voie non canonique | 127 |
| III. Modèle d'étude : le Syndrome Nail-Patella..... | 129 |
| III.1 Caractéristiques cliniques | 129 |
| III.2 Le gène <i>LMX1B</i> | 130 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| III.3 | La protéine LMX1B | 131 |
| III.3.1 | Rôle de LMX1B dans le développement | 132 |
| III.3.1.1 | Développement squelettique | 133 |
| III.3.1.2 | Développement du rein | 135 |
| III.3.1.3 | Développement de l'oeil | 135 |
| III.3.1.4 | Développement du système nerveux central | 135 |
| III.3.2 | Les mutations LMX1B | 136 |
| III.4 | Nos données cliniques et moléculaires dans 55 familles de NPS..... | 137 |
| III.4.1 | Article 4 | 139 |
| III.4.2 | Analyses complémentaires dans 5 familles de NPS sans anomalie de LMX1B | 160 |
| III.4.2.1 | Etude de l'hypothèse d'une hétérogénéité génétique par séquençage de l'exome..... | 161 |
| III.4.2.2 | Etude de l'hypothèse d'une dérégulation de LMX1B | 167 |
| | DISCUSSION | 169 |
| | CONCLUSION ET PERSPECTIVES..... | 173 |
| | ANNEXE - ARTICLE DE REVUE | 176 |
| | REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 197 |

Index des figures et tableaux

| | |
|--|-----|
| FIGURE 1 : REPRESENTATION DES CENTRES DE SIGNALISATION ET AXES DE DIFFERENCIATION AU COURS DU DEVELOPPEMENT DU BOURGEON DE MEMBRE..... | 13 |
| FIGURE 2 : REPRESENTATION DES ELEMENTS SQUELETTIQUES DU MEMBRE..... | 15 |
| FIGURE 3 : MALFORMATIONS DU MEMBRE SUPERIEUR INDUITES PAR LA DELETION DES GENES <i>HOX</i> | 16 |
| FIGURE 4 : MECANISMES MOLECULAIRES A L'ORIGINE DE LA DETERMINATION DE L'IDENTITE DES MEMBRES..... | 17 |
| FIGURE 5 : CRETE APICALE ECTODERMIQUE..... | 18 |
| FIGURE 6 : ETABLISSEMENT DE LA BOUCLE <i>Fgf10/Fgf8</i> NECESSAIRE A LA CROISSANCE PROXIMO-DISTALE DU BOURGEON DE MEMBRE..... | 22 |
| FIGURE 7 : DIFFERENCIATION PROXIMO-DISTALE DU BOURGEON DE MEMBRE SELON LE MODELE DU DOUBLE GRADIENT OU DIFFERENCIATION INTERCALAIRE..... | 22 |
| FIGURE 8 : VOIE DE SIGNALISATION DES BONE MORPHOGENIC PROTEINS..... | 23 |
| FIGURE 9 : REGULATION QUANTITATIVE DE L'EXPRESSION DES GENES AU COURS DU DEVELOPPEMENT DU MEMBRE PAR LA VOIE DES BMPs..... | 25 |
| FIGURE 10 : REGULATION DE LA SIGNALISATION DE L'AER PAR P63..... | 27 |
| FIGURE 11 : SPECTRE CLINIQUE DES MAINS ET PIEDS FENDUS..... | 29 |
| FIGURE 12 : MALFORMATIONS DES MEMBRES SUPERIEURS ASSOCIEES AUX DUPLICATIONS 17P13.3..... | 35 |
| FIGURE 13 : ETENDUE DES DUPLICATIONS 17P13.3 IDENTIFIEES..... | 35 |
| FIGURE 14 : EXPRESSION DE <i>BHLHA9</i> AU COURS DU DEVELOPPEMENT CHEZ L'EMBRYON DE SOURIS..... | 36 |
| FIGURE 15 : <i>BHLHA9</i> EST REQUIS POUR LE DEVELOPPEMENT DU MEMBRE..... | 36 |
| FIGURE 16 : SEQUENCE GENOMIQUE DE <i>BHLHA9</i> (NM_001164405) ET LOCALISATION DES DOMAINES FONCTIONNELS..... | 37 |
| FIGURE 17 : REGION MINIMALE CRITIQUE ASSOCIEE AU SHFLD3..... | 52 |
| FIGURE 18 : ARBRE DECISIONNEL POUR L'ETUDE MOLECULAIRE DES PATIENTS ATTEINTS DE MALFORMATION DES MAINS ET PIEDS FENDUS..... | 54 |
| FIGURE 19 : <i>SHH</i> EST LE MORPHOGENE RESPONSABLE DE LA POLARISATION ANTERO-POSTERIEURE DU MEMBRE..... | 57 |
| FIGURE 20 : VOIE DE SIGNALISATION <i>SHH</i> | 58 |
| FIGURE 21 : STRUCTURE GENOMIQUE DU LOCUS 7Q36 ET CONSERVATION INTER-ESPECES DE LA ZRS..... | 60 |
| FIGURE 22 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA REGULATION DE <i>SHH</i> AU COURS DU DEVELOPPEMENT DU MEMBRE..... | 63 |
| FIGURE 23 : REPRESENTATION DES DIFFERENTS TYPES DE POLYDACTYLIE PREAXIALE..... | 65 |
| FIGURE 24 : VARIABILITE D'EXPRESSION DE LA POLYDACTYLIE DES MEMBRES SUPERIEURS DANS LES ANOMALIES DE LA ZRS..... | 67 |
| FIGURE 25 : ETAPES DE L'ASSEMBLAGE DU SPLICEOSOME ET ETAPES CATALYTIQUES DE L'EPISSAGE..... | 107 |
| FIGURE 26 : PROFONDEUR MOYENNE DE LECTURE DES 6 EXONS DE <i>SF3B4</i> POUR LES 3 EXONES REALISES..... | 108 |
| FIGURE 27 : MISE EN DEFAUT DU SEQUENÇAGE DE L'EXOME CHEZ 3 PATIENTS PORTEURS DE MUTATIONS DU GENE <i>SF3B4</i> | 109 |
| FIGURE 28 : VOIE DE SIGNALISATION CANONIQUE WNT/B-CATENINE..... | 127 |
| FIGURE 29 : VOIE DE SIGNALISATION DE LA POLARISATION DORSO-VENTRALE DU MEMBRE..... | 128 |
| FIGURE 30 : SCHEMA DU GENE <i>LMX1B</i> | 131 |
| FIGURE 31 : SEQUENCE DE LA PROTEINE <i>LMX1B</i> ET LOCALISATION DE SES DOMAINES FONCTIONNELS..... | 132 |
| FIGURE 32 : EXPRESSION DE <i>Lmx1b</i> DANS LE BOURGEON DE MEMBRE SUPERIEUR..... | 133 |
| FIGURE 33 : PERTE DE LA POLARISATION DORSO-VENTRALE DES MEMBRES CHEZ LA SOURIS KO <i>LMX1B</i> | 134 |
| FIGURE 34 : ARBRES GENEALOGIQUES DES FAMILLES DE SYNDROME NAIL-PATELLA SANS ANOMALIE <i>LMX1B</i> IDENTIFIEE..... | 160 |
| FIGURE 35 : CONTROLE QUALITE DU SEQUENÇAGE DE L'EXOME..... | 163 |
| FIGURE 36 : QUANTIFICATION DU TRANSCRIT <i>LMX1B</i> | 168 |
| TABLEAU 1 : LOCI CONNUS DANS LES FORMES NON SYNDROMIQUES DE SHFM/SHFLD..... | 30 |
| TABLEAU 2 : LOCI CONNUS DANS LES FORMES SYNDROMIQUES DE SHFM..... | 30 |
| TABLEAU 3 : SEQUENCE DES AMORCES UTILISEES POUR L'ETUDE DE <i>BHLHA9</i> | 37 |
| TABLEAU 4 : CLASSIFICATION DES POLYDACTYLIES PREAXIALES..... | 65 |
| TABLEAU 5 : DYSOSTOSES ACROFACIALES PREAXIALES..... | 105 |
| TABLEAU 6 : SIGNES CLINIQUES RENCONTRES DANS LA DYSOSTOSE ACROFACIALE DE NAGER..... | 106 |
| TABLEAU 7 : DIAGNOSTICS DIFFERENTIELS DU SYNDROME NAIL-PATELLA..... | 161 |
| TABLEAU 8 : RECAPITULATIF DU NOMBRE DE VARIANTES IDENTIFIEES PAR SEQUENÇAGE DE L'EXOME ET DES FILTRES UTILISES..... | 164 |
| TABLEAU 9 : RECAPITULATIF DES MUTATIONS IDENTIFIEES PAR SEQUENÇAGE DE L'EXOME CHEZ LES PATIENTS NAIL-PATELLA..... | 165 |

Liste des abréviations

3C: capture de conformation chromosomique
5'HOX: Gènes situés en 5' du cluster HOX
AD: Autosomique Dominant
ADN: Acide désoxyribonucléique
ADNc: ADN complémentaire
ADULT: Acro-Dermato-Ungual-Lacrimal-Tooth
AER: Apical Ectodermal Ridge, Crête apicale ectodermique
Alx4: Aristaless-like homeobox 4
APC: Adenomatous Polyposis Coli
AR: Autosomique Récessif
ARN: Acide Ribonucléique
Axin: Axis Inhibitor
BHLH: basic helix-loop-helix
BMP: Bone Morphogenic Protein
BMPR: Bone Morphogenic Protein Receptor
BTRC: Beta-Transducin Repeat-Containing protein
Chd: Chordin
Dac: Dactylaplasia
db: database
Dkk1: Dickkopf-1
DLX: Distal-Less homeobox
Dsh: Dishevelled
EEC: Ectrodactyly-Ectodermal dysplasia-Cleft lip/palate
En1: Engrailed-1
ESP: Exome Sequencing Project
ETS: E26 transformation specific
ETV: ETS variant gene
EVX2: Even-skipped homeobox 2
FBXW4: F-box and WD40 domain protein 4 ou Dactylin
FGF: Fibroblast Growth Factor
FGFR: Fibroblast Growth Factors Receptor
FOG: Friend of GATA
FORGE Canada: Finding Of Rare Disease Genes in Canada
GABP α : GA-Binding Protein transcription factor, alpha subunit
Gli: Glioma-associated oncogen homolog
Grem1: Gremlin1
GSK3: Glycogen Synthase Kinase 3
HAND2: Heart And Neural crest Derivates-expressed 2
HGMD®: Human Gene Mutation Database
HOX: homeobox transcription factor
InDels: Insertions/Délétions
KO: knock-out
LBX1: Lady-Bird late, Drosophila, homolog of, 1
Lmbr1: limb region 1
LMX1B: LIM (Lin-1, Isl-1 and Mec-3)-homeodomain transcription factor 1 beta
LRP: low density lipoprotein receptor-related protein
MAPK: mitogen-activated protein kinase
Mb: Mégabase

MFCS1: Mammal-Fish Conserved Sequence 1
MINA: MYC induced nuclear antigen
Nog: Noggin
NPS: Syndrome Nail-Patella
OCT1: Organic Cation Transporter 1
pb: paires de base
PCR: Polymerase Chain Reaction
PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase
PKC: protein kinase C
POLL: DNA polymerase lambda
PPD: Preaxial Polydactyly
Ptc1: Patched
RT: Reverse Transcription
RX: Récessif lié à l'X
SFRP4: secreted frizzled-related protein 4
SHFLD: SHFM with Long Bone Deficiency
SHFM: Split Hand/Foot Malformation, Mains et pieds fendus
SHH: Sonic HedgeHog
SMAD: Mothers against decapentaplegic, Drosophila, homolog of
Smo: Smoothed
SNP: Single Nucleotide Polymorphism ,
snRNP: small nuclear RibonucleoProtein
SNX32: sorting nexin 32
Ssq: Sasquatch
STAT1: signal transducer and activator of transcription 1
TCF: T Cell Factor
TGFβ: Transforming Growth Factor β
TMEM171: transmembrane protein 171
TRIM69: tripartite motif containing 69
TTF1: transcription termination factor, RNA polymerase 1
UTR: UnTranslated Region
WMS: Werner mesomelic syndrome
ZPA: Zone of Polarizing Activity, Zone d'activité polarisante
ZRS: ZPA Regulatory Sequence

Avant-propos

Au cours de l'embryogenèse, le membre devient tout d'abord identifiable à l'état de bourgeonnement localisé sur le flanc de l'embryon. Le bourgeon de membre est constitué de cellules mésenchymateuses initialement homogènes, recouvertes d'une couche de cellules ectodermiques. Au cours du temps, le bourgeon de membre s'allonge et les cellules mésenchymateuses se condensent puis se différencient en cartilage et enfin en structures osseuses. La modélisation du bourgeon de membre, qui transforme les progéniteurs mésenchymateux en éléments différenciés s'établit en parallèle selon 3 axes : l'axe proximo-distal (de l'épaule aux doigts pour le membre supérieur), l'axe antéro-postérieur (du premier au cinquième rayon), et l'axe dorso-ventral (du dos vers la paume de la main pour le membre supérieur) (Figure 1).

Le développement est contrôlé par 3 centres de signalisation chez les vertébrés : la crête apicale ectodermique (apical ectodermal ridge, AER) à l'extrémité distale du bourgeon, l'ectoderme dorsal et la zone d'activité polarisante (zone of polarizing activity, ZPA) dans le mésenchyme postérieur (Figure 1). Par la mise en place de réseaux de signalisation complexes, ces trois centres contrôlent de façon coordonnée la croissance proximo-distale, l'établissement de l'asymétrie du membre selon les axes dorso-ventral et antéro-postérieur et la modélisation du membre. Bien que le déterminisme génétique de ces étapes soit encore imparfaitement connu, il est clairement établi que le développement normal du membre nécessite une interconnexion et un dialogue permanent entre ces 3 centres de signalisation. De très nombreux facteurs sont mis en jeu afin de permettre des phénomènes conjoints et coordonnés de prolifération, migration, différenciation et apoptose cellulaire. L'expression de ces facteurs est régulée finement de façon spécifique et temporo-spatiale, nécessitant parfois l'intervention des séquences régulatrices situées à distance des gènes.

La connaissance des bases moléculaires à l'origine de la croissance et de la modélisation des membres a progressé grâce à l'étude de modèles animaux et de modèles d'inactivation génique. L'étude de patients porteurs de syndromes rares impliquant des anomalies des membres constitue également une approche intéressante pour appréhender ces mécanismes de régulation ou pour découvrir de nouveaux gènes. En s'appuyant sur des cohortes homogènes de patients sélectionnées grâce à l'expérience acquise par les équipes de génétique clinique et moléculaire du CHRU de Lille dans le cadre de la thématique des

anomalies du développement des membres, nous nous sommes intéressés à quatre pathologies touchant les 3 axes de polarisation : les malformations de type mains et pieds fendus, correspondant à une anomalie de la croissance proximo-distale du bourgeon ; les polydactylies préaxiales et le Syndrome de Nager dans lesquels on observe une anomalie de la polarisation antéro-postérieure ; et enfin le Syndrome Nail-Patella correspondant à une anomalie de la polarisation dorso-ventrale du bourgeon de membre.

Pour chacune de ces pathologies, l'objectif de notre travail était de mettre en évidence l'anomalie moléculaire responsable et de comprendre le mécanisme physiopathologique impliqué. Pour cela, nous avons utilisé des méthodologies variées : séquençage par la technique de Sanger, séquençage haut-débit, CGH-array, SNP-array, PCR et RT-PCR quantitatives, tests fonctionnels en transfection cellulaire.

Ce travail de thèse a fait l'objet de deux articles publiés et de deux articles soumis actuellement en cours de révision. Chaque article sera introduit et discuté dans le chapitre correspondant à l'axe de développement du membre concerné. Des données complémentaires et une description des méthodologies employées feront l'objet de précisions si nécessaire. Parallèlement à ces travaux, une revue sur la génétique du développement des membres a été publiée et sera présentée en annexe à la fin de la thèse (Manouvrier et al., 2012).

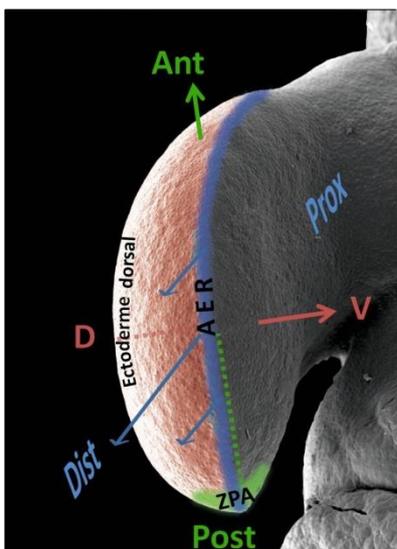


Figure 1 : Représentation des centres de signalisation et axes de différenciation au cours du développement du bourgeon de membre.

L'AER est le centre de signalisation de la croissance proximo-distale (Prox/Dist) ; la ZPA est le centre de signalisation de la polarisation antéro-postérieure (Ant/Post) ; l'ectoderme dorsal est le centre de signalisation de la polarisation dorso-ventrale (D/V). Modifié d'après Fernandez-Teran and Ros, 2008.

CHAPITRE I

Croissance et différenciation proximo-distale du membre

Chapitre I : Croissance et différenciation proximo-distale du membre

Les membres résultent d'un bourgeonnement de la plaque mésodermique latérale qui s'étend le long du flanc de l'embryon. Chez les vertébrés, deux paires de membres sont formées en des positions spécifiques au niveau de l'axe rostro-caudal. Chez l'homme, l'initiation des membres a lieu au cours du premier mois de développement, entre J26 et J28 pour les membres supérieurs et entre J28 et J30 pour les membres inférieurs.

La croissance et la différenciation proximo-distale du bourgeon de membre ont lieu en parallèle de sa polarisation dans les axes antéro-postérieur et dorso-ventral, nécessitant la coordination complexe de plusieurs voies de signalisation. La croissance proximo-distale est principalement sous le contrôle des facteurs de croissance fibroblastiques (FGFs, Fibroblast Growth Factors) exprimés par la crête apicale ectodermique qui constitue le centre de signalisation de cet axe de développement. La différenciation proximo-distale du bourgeon de membre consiste, chez les vertébrés, en l'apparition de trois régions distinctes selon cet axe. Le stylo-pode correspond à la partie proximale ou rhizomélique du membre, à l'origine du fémur ou de l'humérus. Le zeugopode correspond à la partie intermédiaire ou mésomélique du membre, à l'origine des radius/ulna ou tibia/fibula. Enfin, l'autopode qui correspond à l'extrémité distale du membre, à l'origine des carpe/métacarpe ou tarse/métatarse et phalanges (Figure 2).

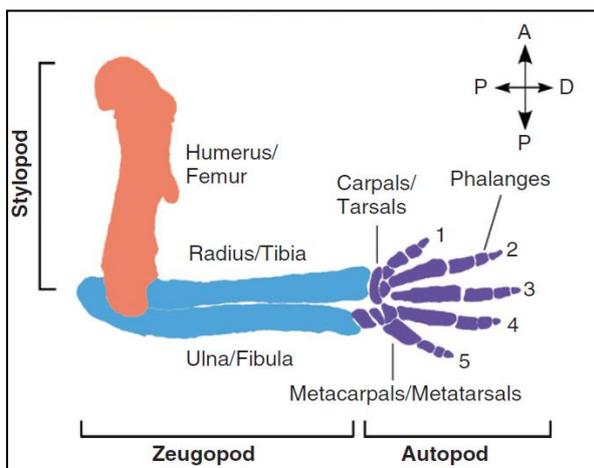


Figure 2 : Représentation des éléments squelettiques du membre.

A/P : antéro-postérieur ; P/D : proximo-distal. D'après Butterfield et al., 2010.

Le phénotype du membre (supérieur ou inférieur) est établi avant son apparition et dépend de la hauteur somitique à laquelle est initié le bourgeon (Ohuchi et al., 1998). C'est un profil spécifique d'expression des gènes architectes *HOX* (homeobox transcription factors), qui détermine l'identité des membres (Minguillon et al., 2005). Chez l'homme, les gènes *HOX* sont organisés en 4 clusters A, B, C et D, localisés respectivement en 7p15, 17q21, 12q13 et 2q31, seuls les clusters A et D étant impliqués dans le développement des membres (Medina-Martinez et al., 2000; Suemori and Noguchi, 2000). Il existe une redondance fonctionnelle de ces deux clusters, impliqués dans la régulation temporo-spatiale de l'expression des gènes. Celle-ci est mise en évidence par des expérimentations chez la souris : la délétion des clusters A ou D entraîne une altération de la palette digitale (Medina-Martinez et al., 2000; Suemori and Noguchi, 2000; Zakany et al., 2001) tandis que leur délétion simultanée entraîne un arrêt précoce de croissance du bourgeon (Kmita et al., 2005). Une autre caractéristique est la colinéarité temporo-spatiale de leur expression par activation séquentielle : les gènes situés en 3' du cluster sont exprimés précocement et en antéro-proximal, tandis que les gènes situés en 5' sont exprimés tardivement et en postéro-distal (Tarchini et al., 2006). Ainsi, la délétion combinée des gènes des groupes 9 ou 10 entraîne des anomalies proximales (Fromental-Ramain et al., 1996a; Wellik and Capecchi, 2003) ; celle du groupe 11, un raccourcissement du stylo-pode ; et celle du groupe 13, une atteinte de l'autopode (Davis et al., 1995; Fromental-Ramain et al., 1996b) (Figure 3).

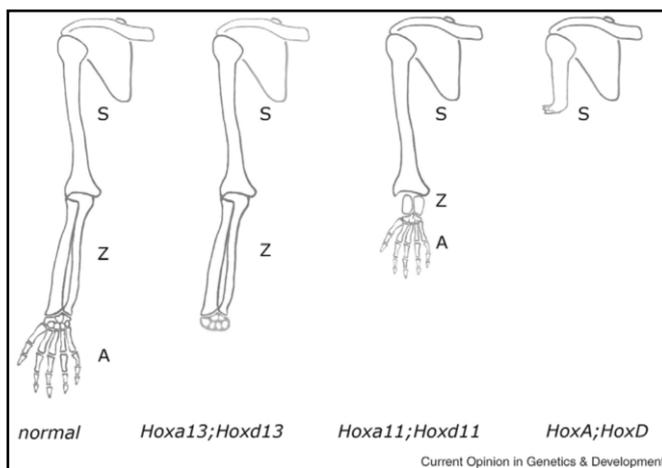


Figure 3 : Malformations du membre supérieur induites par la délétion des gènes *Hox*.

En l'absence des clusters A et D, on observe une troncature sévère du membre. La délétion combinée des gènes du groupe 13 entraîne des malformations plus distales que celle des gènes du groupe 11, illustrant la colinéarité temporo-spatiale de leur expression. D'après Zakany and Duboule, 2007.

L'activation de la voie des FGFs nécessaire au développement du bourgeon de membre l'axe proximo-distal est induite en amont par l'expression de facteurs de transcription T-Box, dont la nature dépend du profil d'expression des gènes *HOX*. Ainsi, on observe l'expression de PITX1 (paired-like homeodomain transcription factor 1) et TBX4 au membre

inférieur, celle de TBX5 au membre supérieur (Agarwal et al., 2003; Logan, 2003; Rallis et al., 2003; Szeto et al., 1999) (Figure 4).

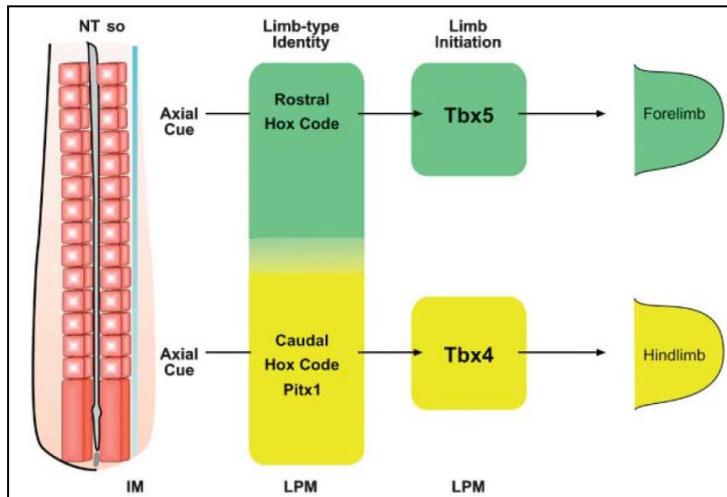


Figure 4 : Mécanismes moléculaires à l'origine de la détermination de l'identité des membres.

La plaque mésodermique latérale de l'embryon exprime des facteurs de transcription dont le profil spécifique permet d'induire les marqueurs de l'identité du membre et sa différenciation en membre supérieur ou inférieur. Un profil « rostral » d'expression des gènes *Hox* permet l'induction de *Tbx5* et d'un membre supérieur, tandis qu'un profil « caudal » d'expression des gènes *Hox* et *Pitx1* induisent *Tbx4* et la formation d'un membre inférieur. D'après Minguillon et al., 2005.

I. Centre de signalisation : la crête apicale ectodermique (Apical Ectodermal Ridge, AER)

La crête apicale ectodermique constitue le centre de signalisation de la croissance et de la différenciation proximo-distale du bourgeon de membre. Elle correspond à un épaissement de l'ectoderme à l'extrémité distale du bourgeon, au niveau de sa frontière dorso-ventrale (Figure 5). Il s'agit d'une structure morphologiquement dynamique et transitoire, correspondant à un épithélium pluristratifié chez les mammifères.

L'AER permet le maintien, dans le mésenchyme sous-jacent, de cellules indifférenciées en prolifération nécessaires à la croissance du bourgeon. Sous le contrôle de facteurs diffusibles produits par l'AER dont les acteurs principaux sont les FGFs, ces cellules présentent une activité mitotique intense permettant la croissance du bourgeon. Ce rôle crucial a pu être démontré par l'observation de membres tronqués chez les modèles animaux où l'AER a été supprimée (Rowe et al., 1982; Saunders, 1948; Summerbell, 1974; Todt and Fallon, 1987). Ces malformations sont d'autant plus sévères et proximales que l'AER est supprimée précocement au cours du développement. L'AER coordonne également la différenciation proximo-distale du bourgeon, qui a lieu en parallèle de sa croissance, par

l'expression de nombreuses molécules telles que les FGFs, mais aussi les Bone Morphogenic Proteins (BMPs) qui seront notamment impliqués dans la chondrogenèse et l'ossification endochondrale.

On distingue trois phases du développement de l'AER : l'induction, la maturation puis la régression.

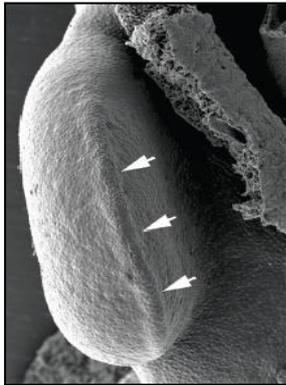


Figure 5 : Crête apicale ectodermique.

Bourgeon de membre supérieur au stade 23 de développement chez le poulet : visualisation de la crête apicale ectodermique correspondant à l'épaississement de l'ectoderme au niveau de la frontière dorso-ventrale du bourgeon (flèches). D'après Fernandez-Teran and Ros, 2008.

I.1 Induction de l'AER

L'AER est induite via des interactions complexes entre l'ectoderme et le mésenchyme sous-jacent. Les voies de signalisation impliquées dans ces interactions sont aujourd'hui partiellement connues. FGF8 constitue le premier marqueur des cellules précurseurs de l'AER (dès E9 chez la souris), avant même l'apparition morphologique de la crête. Son territoire d'expression est alors parfois nommé pré-AER (Bell et al., 1998; Loomis et al., 1998). L'expression de *FGF8* dans les cellules ectodermiques à l'origine de l'AER est induite par celle de *FGF10* dans le mésenchyme sous-jacent. Ainsi, *FGF10* joue un rôle crucial dans l'induction de l'AER. Les souris knock-out (KO) *Fgf10* présentent des membres tronqués en lien avec l'absence de formation de l'AER (Sekine et al., 1999).

I.2 Maturation de l'AER

Dans un deuxième temps, les cellules exprimant *FGF8* se compactent et forment un épaississement ectodermique qui constitue l'AER mature. Celle-ci réalise une frontière entre les faces ventrale et dorsale du bourgeon (Figure 5).

Quatre membres de la famille des FGFs sont exprimés spécifiquement dans l'AER : *FGF4*, *FGF8*, *FGF9* et *FGF17* (Martin, 1998; Sun et al., 2000). *FGF8* est exprimé dans l'ensemble de l'AER dès son initiation jusqu'à sa régression (Crossley and Martin, 1995). L'expression de *FGF4*, *FGF9* et *FGF17* débute après la formation de l'AER à sa partie postérieure, et s'arrête avant la régression de celle-ci (Sun et al., 2000).

De nombreux autres facteurs sont exprimés dans l'AER, en particulier les BMP2, 4, et 7, également impliqués dans son induction et sa fonction.

I.3 Régression de l'AER

A un stade plus tardif on observe un aplatissement de l'AER, qui devient morphologiquement non distinguable de l'ectoderme adjacent. Ce processus, appelé « régression de l'AER », a lieu de façon précoce au niveau des espaces interdigitaux, puis au niveau de chaque doigt (Guo et al., 2003; Wanek et al., 1989), sous le contrôle de la voie de signalisation des BMPs (Guha et al., 2002; Pizette and Niswander, 1999).

II. Réseaux de gènes impliqués

La voie des FGFs est l'acteur principal de l'AER comme centre de signalisation de la croissance et de la différenciation proximo-distale. Celle-ci est en partie régulée par la voie des BMPs qui intervient à toutes les étapes de cet axe de développement : initiation / maintien / arrêt de la croissance et différenciation du bourgeon. De plus, l'expression des FGFs est régulée par un réseau complexe de gènes où *TP63* joue un rôle central.

II.1 La voie de signalisation des FGFs

Cinq membres de cette famille sont impliqués dans le développement du membre : *FGF10* exprimé dans le mésenchyme, *FGF4*, 8, 9 et 17 exprimés dans l'AER. Leur rôle crucial dans la croissance du bourgeon de membre a pu être démontré dans les années 1990, après l'observation que l'apposition de billes imprégnées de FGFs pouvait se substituer à l'AER pour rétablir un développement du membre chez l'embryon de poulet (Fallon et al., 1994; Niswander et al., 1993). Chez la souris, le double KO pour *Fgf4* et *Fgf8* résulte en l'absence de formation de membre (Sun et al., 2002). Leur inactivation plus tardive entraîne une hypoplasie des structures distales du membre.

La famille des FGFs comprend 22 gènes codant des protéines sécrétées à homologie structurelle (Ornitz and Itoh, 2001; Powers et al., 2000; Su et al., 2008). Ils exercent leur

activité par la liaison à quatre récepteurs distincts, les FGFRs, présentant des propriétés de liaison différentes. Les FGFRs comprennent un domaine de liaison extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase. La liaison du ligand entraîne la phosphorylation des résidus tyrosine du récepteur et le recrutement de protéines de la cascade de signalisation au niveau de la queue cytoplasmique, entraînant leur phosphorylation (Powers et al., 2000). Cela aboutit à l'activation de voies de signalisation intracellulaire comme les voies MAPK (mitogen-activated protein kinase), PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase), STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1) et PKC (protein kinase C) (Eswarakumar et al., 2005; Turner and Grose, 2010).

L'initiation du bourgeon et sa croissance sont dépendantes de l'expression prolongée des FGFs via l'établissement d'une boucle de rétrocontrôle positif FGF10/FGF8 entre les cellules mésenchymateuses et l'ectoderme de surface (Min et al., 1998; Ohuchi et al., 1998; Xu et al., 1998). FGF10 et FGF8 se fixent respectivement sur les isoformes b (ectoderme) et c (mésenchyme) du récepteur FGFR2. L'inactivation de l'une ou l'autre des isoformes de *Fgfr2* chez la souris empêche l'initiation du bourgeon de membre (Xu et al., 1998).

L'établissement de la boucle FGF8/FGF10 est régulé par la voie de signalisation WNT/ β -Caténine (Figure 6). Les différents facteurs impliqués ont pu être identifiés par des expérimentations de greffe de cellules dans des sites ectopiques chez l'embryon de poulet. En particulier, les gènes *Wnt2b* et *Wnt8c*, exprimés dans la plaque latérale mésodermique au niveau où vont apparaître les membres supérieur et inférieur, sont nécessaires à l'induction de *Fgf10* (Kawakami et al., 2001). *Fgf10* induit ensuite *Wnt3a* dans l'ectoderme, permettant l'activation de l'expression de *Fgf8* par la voie de la β -Caténine, qui maintient à son tour l'expression de *Fgf10* (Kawakami et al., 2001; Kengaku et al., 1998; Tickle and Munsterberg, 2001).

La boucle FGF8/FGF10 permet le maintien, dans le mésenchyme sous-jacent à l'AER, de cellules indifférenciées en prolifération nécessaires à la croissance puis à la différenciation du membre. La frontière de ce contingent constitue le « front de différenciation » (Tabin and Wolpert, 2007), qui progresse en distal au cours de la croissance du membre. Les cellules sont orientées vers leur différenciation proximale ou distale en fonction de leur profil d'expression génique au moment du passage du front de différenciation. Ainsi, la zone intermédiaire du zeugopode résulterait de l'interaction des signaux émis par les régions distales et proximales (Figure 7). Les signaux du mésoderme latéral, comme l'acide rétinoïque, activent l'expression

de facteurs de transcription à homéobox orientant vers la chondrogenèse et une différenciation proximale des cellules (Mercader et al., 1999; Mercader et al., 2000). Ce modèle du « double gradient » ou « différenciation intercalaire » est retenu actuellement pour décrire les mécanismes impliqués dans la différenciation proximo-distale (Tabin and Wolpert, 2007). Il a été suggéré devant l'observation des phénotypes induits par les knock-out combinés de différents membres des FGFs exprimés dans l'AER. En effet, ces modèles animaux présentent un spectre variable d'altération des éléments intermédiaires (zeugopode), mais avec une préservation constante des éléments proximaux (stylopode) et distaux (autopode), allant contre l'hypothèse d'une progression proximo-distale de la différenciation des structures, comme cela avait été suggéré initialement (Summerbell et al., 1973).

Par ailleurs, la voie des FGFs joue un rôle dans la chondrogenèse et la régulation de l'ossification endochondrale (Dailey et al., 2003; Minina et al., 2002). Les mutations activatrices des gènes codant leurs récepteurs *FGFR1*, 2 ou 3 sont responsables de multiples ostéodysplasies chez l'homme, dont les nanismes chondrodysplasiques et les craniosténoses syndromiques (Ornitz and Marie, 2002). De la même façon, des modèles murins reproduisent le phénotype humain de l'achondroplasie en exprimant une forme mutée de *Fgfr3* (Chen et al., 1999; Iwata et al., 2000; Iwata et al., 2001; Naski and Ornitz, 1998). A l'inverse, les modèles murins porteurs d'une délétion dirigée de *Fgfr3* présentent des chondrocytes hypertrophiques dont la prolifération est augmentée et une diminution de la densité osseuse (Colvin et al., 1996; Deng et al., 1996; Valverde-Franco et al., 2004).

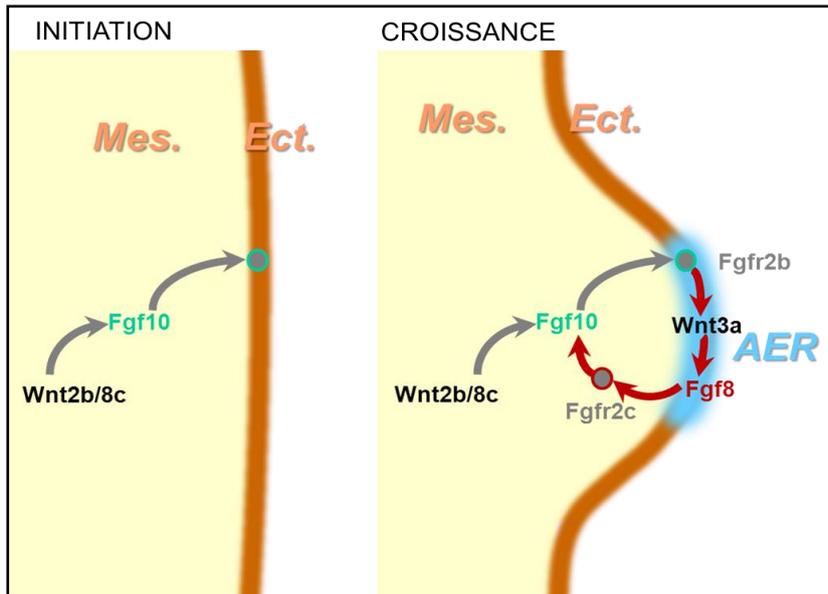


Figure 6 : Etablissement de la boucle Fgf10/Fgf8 nécessaire à la croissance proximo-distale du bourgeon de membre.

L'initiation de la boucle Fgf10/Fgf8 est sous le contrôle de la voie Wnt, nécessaire à l'induction de *Fgf10* dans le mésenchyme (Mes.), puis à celle de *Fgf8* dans l'ectoderme (Ect.) au niveau de la crête apicale ectodermique (AER). D'après Xu et al., 1998 et Kawakami et al., 2001.

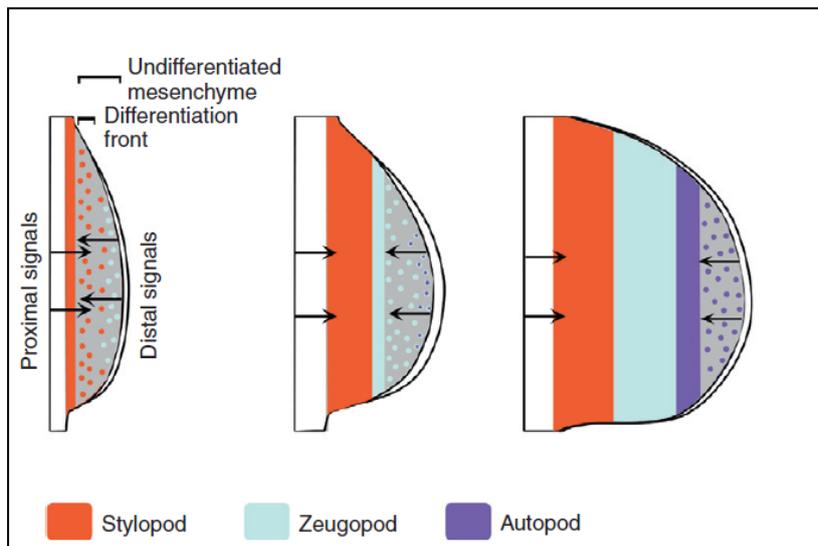


Figure 7 : Différenciation proximo-distale du bourgeon de membre selon le modèle du double gradient ou différenciation intercalaire.

La différenciation des cellules est contrôlée par des gradients opposés de molécules « signal » provenant d'une part du mésenchyme proximal et d'autre part de l'AER. Le front de différenciation correspond à la limite entre les cellules différenciées et les cellules indifférenciées en prolifération sous le contrôle de la voie des FGFs. D'après Butterfield et al., 2010.

II.2 La voie de signalisation des BMPs

Les BMPs sont définies par la capacité à induire une formation osseuse dans des sites ectopiques chez la souris. Au cours du développement du membre, leur principal rôle est l'induction du cartilage et la croissance endochondrale de l'os (Balemans and Van Hul, 2002). Ils sont également au centre de la régulation quantitative de l'expression des gènes impliqués dans les voies de signalisation nécessaires à la croissance et à la différenciation du membre.

Ces protéines sont des cytokines appartenant à la superfamille des TGF β (Transforming Growth Factor β) et se fixent sur des récepteurs transmembranaires hétéro-multimériques serine-thréonine kinase BMPR (Attisano and Wrana, 1996). Elles sont sécrétées sous forme d'un précurseur qui est clivé par les protéases extracellulaires pour former la protéine mature. Celle-ci se dimérise sous sa forme activée (Constam and Robertson, 1999) permettant la fixation aux récepteurs BMPR. Cette liaison entraîne la phosphorylation du récepteur de type I par le récepteur de type II puis la transduction du signal *via* la phosphorylation de protéines SMAD1/5/8 (Mothers against decapentaplegic, *Drosophila*, homolog of), qui sont transloquées dans le noyau et se lient directement à l'ADN pour activer la transcription des gènes cibles (Heldin et al., 1997; Massague et al., 2005; Miyazono et al., 2010; Miyazono et al., 2005) (Figure 8).

Trois membres des BMPs sont exprimés au cours du développement du membre : *BMP2*, *4* et *7* (Robert, 2007). La régulation de cette voie de signalisation fait appel à de nombreuses protéines antagonistes comme Gremlin1 (*Grem1*) et Noggin (*Nog*) (Hsu et al., 1998; Re'em-Kalma et al., 1995), qui agissent par liaison directe aux BMPs dans l'espace extracellulaire, empêchant leur fixation sur les récepteurs.

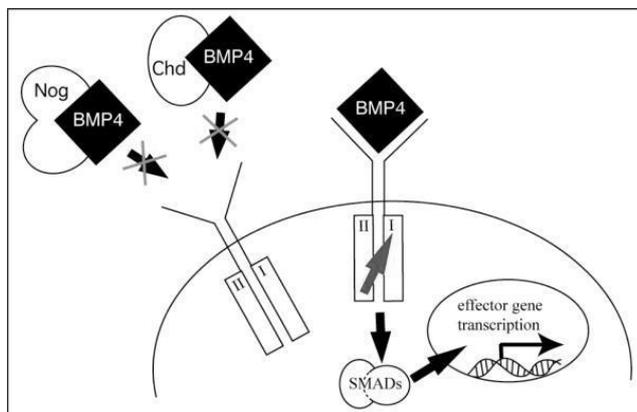


Figure 8 : Voie de signalisation des Bone Morphogenic Proteins.

La liaison des ligands BMP à leurs récepteurs hétéro-multimériques de la surface cellulaire entraîne la phosphorylation du récepteur de type I par le récepteur de type II (flèche grise) puis la transduction du signal par les protéines SMADs, conduisant à l'activation transcriptionnelle des gènes cibles. Les antagonistes de cette voie, Noggin (*Nog*) et Chordin (*Chd*) agissent par liaison directe avec le ligand dans l'espace extracellulaire. D'après Klingensmith et al., 2010.

Au stade précoce d'initiation du bourgeon de membre, les BMPs sont nécessaires à la formation de l'AER (Benazet et al., 2009; Ohuchi et al., 1998). En effet, des expérimentations

chez l'embryon de poulet de dérégulation de la voie des BMPs (Pizette et al., 2001) et l'inactivation du récepteur *Bmpr1a* ou du gène *Bmp4* chez la souris (Ahn et al., 2001; Benazet et al., 2009) montrent qu'en l'absence de cette voie, l'AER ne se forme pas et qu'il n'y a pas d'induction de l'expression de *Fgf8*. Ces expérimentations ont pour conséquence un arrêt précoce de la croissance du membre (Benazet et al., 2009) (Figure 9).

Au cours de la croissance du bourgeon, les BMPs sont au centre d'une boucle de rétrocontrôle épithélio-mésenchymateuse dont le rôle est de propager l'expression des FGFs de l'AER. Cette boucle est établie en plusieurs étapes par la régulation transcriptionnelle positive de *Gremlin1* dans le mésenchyme du bourgeon de membre (Michos et al., 2004). En effet, le signal des BMPs module l'activité de l'AER en régulant négativement l'expression des FGFs. Cet effet est antagonisé par *Gremlin1* dans la région distale du bourgeon de membre (Khokha et al., 2003; Merino et al., 1999; te Welscher et al., 2002; Zuniga et al., 1999; Zuniga et al., 2004). L'inactivation de *Bmp4* à ce stade plus tardif du développement entraîne une polydactylie en raison du maintien trop prolongé de l'AER (Benazet et al., 2009) (Figure 9).

La terminaison de cette boucle est nécessaire à la régression de l'AER et à l'arrêt de la croissance du bourgeon de membre. L'arrêt de la croissance est induit par la répression de *Gremlin1* exercée via les FGFs (Figure 9). L'inhibition de l'expression des FGFs lors de la régression de l'AER entraîne une réduction de la prolifération mésenchymateuse nécessaire à la formation des phalanges distales sous l'effet des BMPs. De la même façon, les BMPs régulent l'apoptose interdigitale (Pajni-Underwood et al., 2007; Zeller, 2010).

Des expérimentations chez l'embryon de poulet et de souris montrent que l'inhibition de la voie des BMPs par un antagoniste empêche la régression de l'AER et de l'expression des FGFs. Ainsi, la prolifération mésenchymateuse ne s'interrompt pas, à l'origine d'un excès de tissu mou à l'extrémité distale du membre (Guha et al., 2002; Pizette and Niswander, 1999). Inversement, le KO de *Noggin*, qui code un antagoniste des BMPs, est responsable d'une hyperplasie du cartilage et de l'absence d'articulations chez la souris (Brunet et al., 1998). Similairement en pathologie humaine, les mutations de *NOG* entraînent un symphalangisme (fusion des phalanges) et des synostoses multiples du carpe et du tarse (Gong et al., 1999). Ces anomalies sont liées à une augmentation de l'activité de la voie des BMPs entraînant un recrutement excessif des cellules vers la formation de cartilage (Brunet et al., 1998).

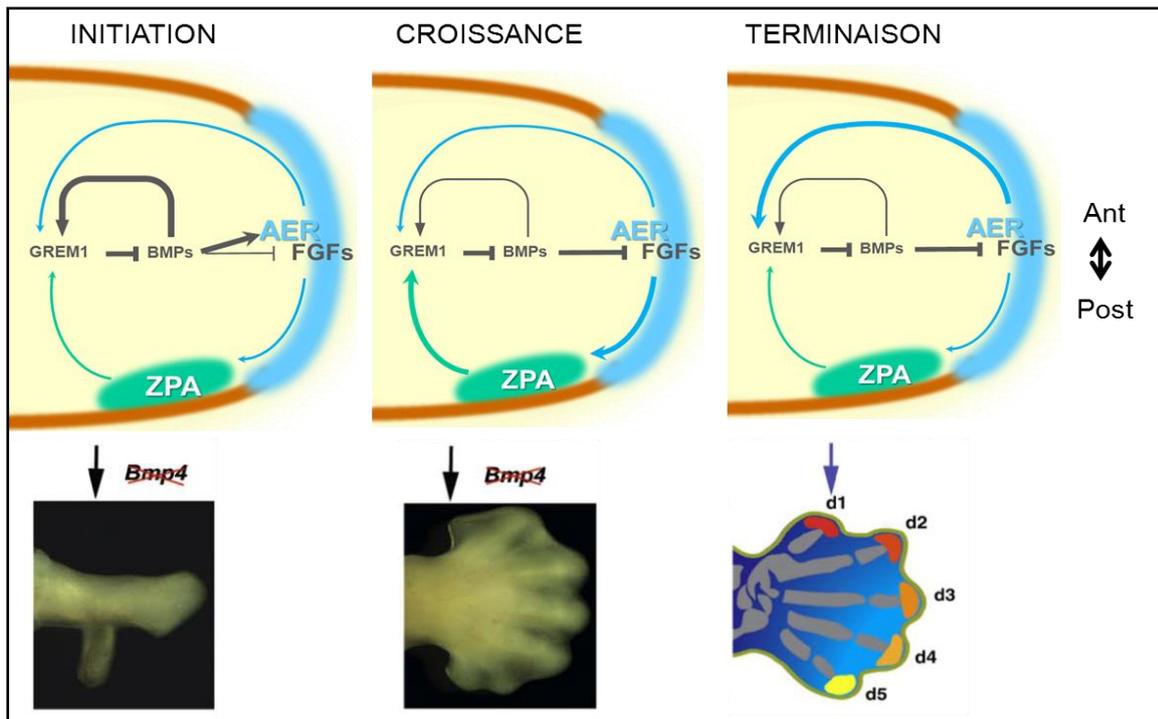


Figure 9 : Régulation quantitative de l'expression des gènes au cours du développement du membre par la voie des BMPs.

Au stade d'initiation du bourgeon de membre, une activité forte des BMPs est nécessaire pour la formation de l'AER et la régulation positive de l'expression de Gremlin1 dans le mésenchyme. L'inactivation des BMPs à ce stade altère la formation de l'AER et résulte en un membre tronqué. Au stade de croissance du bourgeon de membre, les voies de signalisation sont coordonnées par la ZPA. L'action de Greml1 inhibe partiellement la voie des BMPs et renforce la boucle de rétrocontrôle ZPA/Grem1/AER. L'inactivation de la voie des BMPs à ce stade résulte en un maintien prolongé de l'AER et l'apparition d'une polydactylie. A ce stade d'arrêt de la croissance du bourgeon de membre, l'expression de Greml1 est inhibée par l'AER induisant une activation de la voie des BMPs et la formation des phalanges distales (d1, d2, d3, d4, d5 : doigts 1 à 5). Modifié d'après Zeller, 2010. Ant : Antérieur ; Post : Postérieur.

II.3 Le réseau de *TP63*

De nombreux autres gènes sont impliqués dans la fonction de l'AER. La plupart d'entre eux ont pu être identifiés suite à leur mise en cause en pathologie humaine ou animale, en particulier dans les malformations de type mains et pieds fendus.

Parmi ceux-ci, le gène *TP63* est au centre d'un réseau complexe régulant la morphologie et la fonction de l'AER. Il code le facteur de transcription P63, un homologue du suppresseur de tumeur P53. P63 est un régulateur majeur du développement des structures dérivées de l'ectoderme, contrôlant la prolifération, la différenciation et la stratification cellulaires (Yang et al., 1999). Au cours du développement du membre *TP63* est exprimé dans l'AER. Son KO chez la souris entraîne une réduction importante de l'expression de *Fgf8* et une altération de la formation de l'AER. Ces animaux ne développent pas de structures ectodermiques. Au niveau des membres, on peut observer des phénotypes variables allant de

l'ectrodactylie à des anomalies réductionnelles partielles voire à une amélie (Ianakiev et al., 2000). Ces observations suggèrent que P63 régule l'expression de *FGF8*. Cette régulation se ferait indirectement via les membres des familles DLX et SP.

Plusieurs membres de la famille DLX (*Distal-Less homeobox*), notamment *DLX5* et *6*, sont co-exprimés avec *TP63* dans l'AER et sont également impliqués dans les malformations de type mains et pieds fendus. Ce sont des gènes à homéobox intervenant dans la voie de signalisation Wnt. Les souris KO pour *Dlx5* ou *6* présentent des malformations cranio-faciales et de l'oreille interne tandis que les doubles KO présentent en addition un phénotype SHFM (Robledo et al., 2002). En l'absence de p63, l'expression de *Dlx5* et *6* est diminuée. P63 régule ces gènes par liaison directe sur leurs promoteurs et sur une séquence *cis*-régulatrice à distance de *Dlx6* (Lo Iacono et al., 2008). De façon intéressante, de nombreux sites de fixation potentiels aux facteurs DLX sont prédits au locus de *FGF8*, suggérant que la régulation de *FGF8* par P63 aurait lieu par l'intermédiaire de ces facteurs (Guerrini et al., 2011).

Sp6 et *Sp8*, deux membres de la famille Sp, sont également exprimés dans l'AER et l'ectoderme du bourgeon de membre et interviennent en aval de la voie de signalisation WNT/ β -Caténine pour l'induction de *FGF8* (Haro et al., 2014). En particulier, *Sp8* se lie au promoteur de *Fgf8* pour activer directement son expression. L'étude de modèles murins montre que la réduction progressive de leur expression entraîne un spectre de malformations des membres allant de la syndactylie à l'amélie en passant par des malformations de type oligodactylie ou mains et pieds fendus. Ces malformations sont en lien avec l'absence d'induction de *Fgf8* entraînant un défaut d'établissement ou du maintien de l'AER. Des sites de fixation potentiels pour les facteurs Dlx sont prédits au locus *Sp8* suggérant que ce gène puisse être une cible des Dlx pour la modulation de l'expression de *Fgf8* (Guerrini et al., 2011).

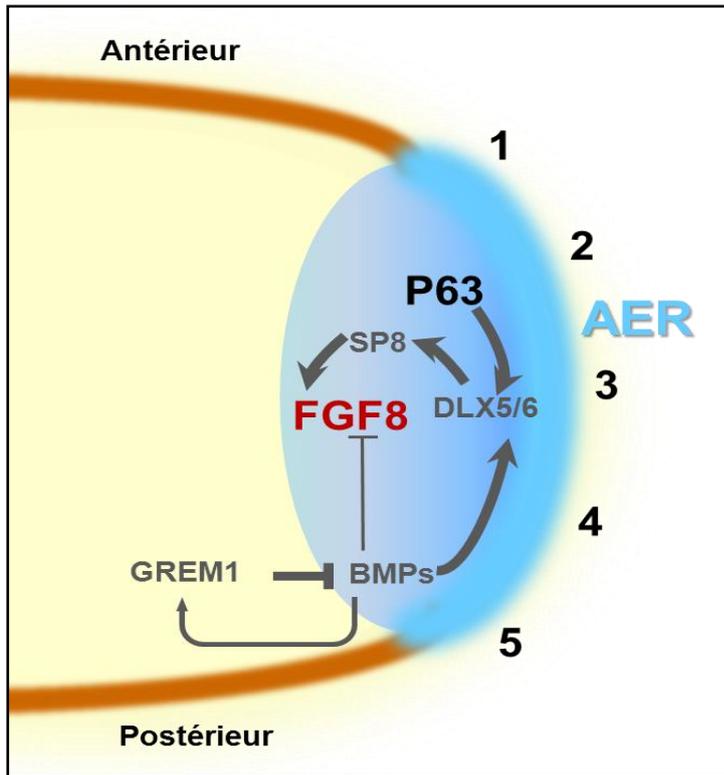


Figure 10 : Régulation de la signalisation de l'AER par P63.

P63 régule l'expression de FGF8 par l'intermédiaire des facteurs DLX5 et 6 et SP8. La position des futurs doigts 1 à 5 est indiquée. Modifié d'après Haro et al., 2014.

III. Modèle d'étude : les malformations de type mains et pieds fendus

Le terme mains et pieds fendus (SHFM split hand/foot malformation) se réfère à un large spectre de malformations des membres concernant les rayons centraux de l'autopode, avec différents degrés de sévérité (OMIM183600). Bien que le terme « ectrodactylie » soit souvent employé à la place de « SHFM », il s'agit d'une entité non spécifique correspondant à une absence de doigts. Les malformations de type SHFM sont observées à une incidence d'environ 1 sur 18000 naissances et représentent 8 à 17% des malformations réductionnelles des membres (Czeizel et al., 1993).

Sur le plan physiopathologique, les SHFM sont en lien avec un défaut de maintien de la zone centrale de l'AER (Duijf et al., 2003). Il s'agit de malformations présentant une grande hétérogénéité génétique, dont la majorité est en lien avec l'altération d'éléments régulateurs impliqués dans la voie de signalisation. La compréhension fine des mécanismes physiopathologiques en cause est encore mal connue.

III.1 SHFM : aspects cliniques

La malformation SHFM classique correspond à une absence des rayons centraux (2, 3 et/ou 4) des doigts avec une fente au niveau des mains ou des pieds, souvent associée à des syndactylies, réalisant un aspect en « pince de homard » caractéristique (Figure 11). Néanmoins, les anomalies peuvent être très variables : d'une simple hypoplasie d'un rayon central à la monodactylie qui correspond à la présence d'un seul rayon par absence des rayons centraux et préaxiaux. Cette malformation peut être syndromique ou non syndromique et a pour caractéristique une grande variabilité d'expression intrafamiliale et intra-individuelle.

La malformation SHFM est considérée comme typique lorsqu'elle atteint plusieurs extrémités, et *a fortiori* lorsqu'elle est familiale, rendant ainsi l'étiologie génétique hautement probable. Inversement, la malformation est considérée comme atypique lorsqu'elle ne touche qu'une des quatre extrémités et pourrait ainsi être en lien avec une cause clastique, notamment des facteurs environnementaux impliquant l'apoptose au niveau de l'AER (Sulik and Dehart, 1988).

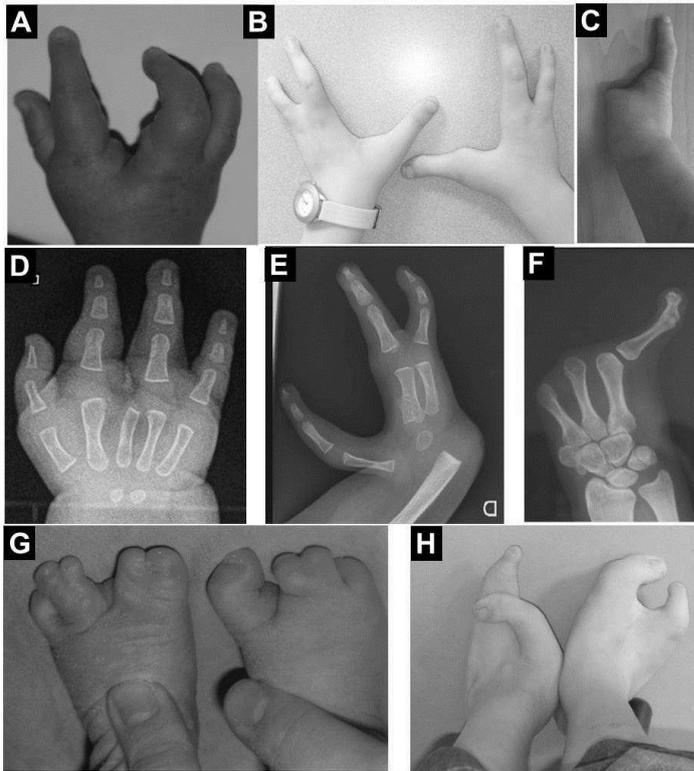


Figure 11 : Spectre clinique des mains et pieds fendus.

A,D : Main fendue avec absence de 3^{ème} rayon. B,E : Mains fendues avec absence de 2^{ème} et 3^{ème} rayon. C, F : Monodactylie. G : Pieds fendus avec malformations des rayons centraux. H : Aspect typique de pieds en « pince de homard ».

Les malformations de type SHFM peuvent également être observées dans d'autres espèces comme le poulet, les batraciens, la souris (Sidow et al., 1999), indiquant la conservation inter-espèces des voies de signalisation impliquées (Gurrieri et al., 2002).

III.1.1 *SHFM non syndromiques*

Les SHFM non syndromiques correspondent aux SHFM isolées, éventuellement associées à d'autres malformations des membres comme une atteinte des os longs (Zlotogora, 1994). Dans ce dernier cas, l'affection est plus précisément dénommée SHFLD (SHFM with Long Bone Deficiency, OMIM119100).

Les cas familiaux sont habituellement transmis selon un mode autosomique dominant avec pénétrance incomplète et expressivité très variable (Temtamy and McKusick, 1978; Zlotogora, 1994). Plus rarement, des modes de transmission lié à l'X ou autosomique récessif ont été décrits (Ahmad et al., 1987; Faiyaz ul Haque et al., 1993; Gul and Oktenli, 2002; Zlotogora and Nubani, 1989). Six loci sont actuellement décrits dans les SHFM et 3 loci pour les SHFLD (Tableau 1). Ces loci ont été identifiés par l'étude de réarrangements chromosomiques dans des cas sporadiques et familiaux de SHFM et par analyse de liaison dans des grandes familles.

| SHFM type | OMIM # | Locus | Chromosomal localization | Causative gene/molecular mechanism | Inheritance |
|---|--------|--------|--------------------------|--|-------------|
| Type 1—isolated SHFM | 183600 | SHFM1 | 7q21.2–q21.3 | Suspected dysregulation of <i>DLX5</i> and <i>DLX6</i> | AD |
| | 220600 | SHFM1D | 7q21.2–q21.3 | Suspected dysregulation of <i>DLX5</i> and <i>DLX6</i> | AD |
| | 313350 | SHFM2 | Xq26 | Unknown | XL |
| | 246560 | SHFM3 | 10q24 | Microduplications involving <i>BTRC</i> , <i>POLL</i> , and <i>FBXW4</i> | AD |
| | 605289 | SHFM4 | 3q27 | <i>TP63</i> mutations | AD |
| | 606708 | SHFM5 | 2q31 | Suspected dysregulation of <i>HOXD</i> cluster | AD |
| Type 2—SHFM with long bone deficiency (SHFLD) | 225300 | SHFM6 | 12q31 | <i>WNT10B</i> mutations | AR |
| | 119100 | SHFLD1 | 1q42.2–q43 | Unknown—? digenic | AD |
| | 610685 | SHFLD2 | 6q14.1 | Unknown—? digenic | AD |
| | 612576 | SHFLD3 | 17p13.3 | Microduplications involving <i>BHLHA9</i> | AD |

Tableau 1 : Loci connus dans les formes non syndromiques de SHFM/SHFLD.
D’après Gurrieri and Everman, 2013.

III.1.2 SHFM syndromiques

Les SHFM syndromiques s’associent à des malformations autres que celles des membres. Parmi ces syndromes, le gène *TP63* est le plus fréquemment impliqué (Tableau 2). Il est en cause dans plusieurs affections dont les phénotypes peuvent être chevauchants, comprenant des signes de dysplasie ectodermique : le syndrome EEC (Ectrodactyly-Ectodermal dysplasia-Cleft lip/palate, OMIM129900), le syndrome Limb-mammary (OMIM603453) et le syndrome ADULT (Acro-Dermato-Ungual-Lacrimal-Tooth, OMIM103285) (Roelfsema and Cobben, 1996). La plupart des gènes impliqués dans les formes syndromiques de SHFM le sont également dans les formes non syndromiques.

| Syndrome | OMIM # | Locus | Chromosomal localization | Causative gene/molecular mechanism | Inheritance |
|---|--------|--------|--------------------------|--|-------------|
| Ectrodactyly-ectodermal dysplasia-cleft lip/palate (EEC) | 129900 | EEC1 | 7q21.2–q21.3 | Suspected dysregulation of <i>DLX5</i> and <i>DLX6</i> | AD |
| Limb-mammary syndrome (LMS) | 604292 | EEC3 | 3q27 | <i>TP63</i> mutations | AD |
| Acro-Dermato-Ungual-Lacrimal-Tooth (ADULT) | 603543 | | 3q27 | <i>TP63</i> mutations | AD |
| Ectrodactyly-ectodermal dysplasia-macular dystrophy (EEM) | 103285 | | 3q27 | <i>TP63</i> mutations | AD |
| Acro-cardio-facial syndrome (ACFS) | 225280 | | 16q22.1 | <i>CDH3</i> mutations | AR |
| Karsh-Neugebauer syndrome | 600460 | | 6q21–q22 | Unknown | AR? |
| SHFM with sensorineural hearing loss | 183800 | | Unknown | Unknown | AD |
| Distal limb deficiencies-micrognathia syndrome (DLDMS) | 220600 | SHFM1D | 7q21.2–q21.3 | Suspected dysregulation of <i>DLX5</i> and <i>DLX6</i> | AD |
| | 246560 | SHFM3 | 10q24 | Microduplications involving <i>BTRC</i> , <i>POLL</i> , and <i>FBXW4</i> | AD |

Tableau 2 : Loci connus dans les formes syndromiques de SHFM.
D’après Gurrieri and Everman, 2013.

III.2 Génétique des SHFM

III.2.1 Locus *SHFM1/EEC1* en 7q21

Le locus SHFM1 correspond aux réarrangements de la région 7q21. Ce locus est en cause dans des formes non syndromiques ou syndromiques de SHFM. Pour ces dernières, les signes qui peuvent être associés sont ceux du syndrome EEC (fente labio-palatine, dysplasie ectodermique), mais également une dysostose mandibulofaciale avec un déficit auditif par malformation de l'oreille interne (35% des patients), une microcéphalie, une déficience intellectuelle. Ainsi, une forme autosomique dominante de SHFM associée à un déficit auditif (SHFM1D) est localisée à ce locus (Birnbaum et al., 2012; Tackels-Horne et al., 2001).

Deux gènes sont candidats pour expliquer la malformation SHFM1 : *DLX5* et *DLX6* (Crackower et al., 1996; Scherer et al., 1994). Bien que ces gènes soient exprimés au cours du développement du membre, aucun n'est directement concerné par les points de cassure des réarrangements chromosomiques. Ainsi, l'altération de la régulation de ces gènes par effet de position pourrait expliquer le phénotype lié aux réarrangements chromosomiques (Crackower et al., 1996). De façon intéressante, une duplication *de novo* contenant *DLX5* et 6 a été décrite chez un patient avec SHFM syndromique, suggérant que l'altération de leur dosage génique serait suffisante pour induire le phénotype (Velinov et al., 2012). Plus récemment, des mutations de *DLX5* autosomiques récessives ou autosomiques dominantes à pénétrance incomplète ont été identifiées dans plusieurs familles, apportant des arguments forts pour son implication dans la pathogenèse du SHFM1 (Shamseldin et al., 2012; Sowinska-Seidler et al., 2014; Wang et al., 2014).

III.2.2 Locus *SHFM3* en 10q24

Le locus SHFM3 a été identifié par analyse de liaison dans plusieurs familles de SHFM non syndromique (Gurrieri et al., 1996; Nunes et al., 1995; Ozen et al., 1999; Raas-Rothschild et al., 1996). C'est le locus le plus fréquemment en cause dans la malformation SHFM, concernant environ 20% des familles dans la série de Klopocki et coll. (Klopocki et al., 2012), et 22,6% des familles de SHFM non syndromique dans notre cohorte (données non publiées). Dans notre série, la présentation clinique la plus fréquente est celle d'une SHFM typique touchant les 4 extrémités ou la présence d'une monodactylie. Plus rarement, nous avons pu observer une atteinte des os longs seuls (données non publiées).

Ce locus est synthénique avec le locus murin en cause dans le phénotype Dactylaplasia (Dac) qui correspond à une absence des rayons centraux avec une fente de l'autopode, voire à

une monodactylie (Chai, 1981; Crackower et al., 1998; Johnson et al., 1995; Sidow et al., 1999). La malformation est en lien avec une augmentation de l'apoptose au niveau de l'AER, concernant uniquement sa zone centrale chez les souris hétérozygotes et s'étendant à sa partie antérieure chez les souris homozygotes.

Le mécanisme par lequel la duplication 10q24 dérégule la croissance du bourgeon est encore inconnu. Plusieurs gènes sont potentiellement concernés par la duplication : *FBXW4* (F-box and WD40 domain protein 4 ou *Dactylin*), *BTRC* (*Beta-Transducin Repeat-Containing protein*), *POLL* (*DNA polymerase lambda*), *FGF8*, et *LBX1* (*Lady-Bird late, Drosophila, homolog of, 1*). Aucune mutation ponctuelle de ces gènes n'a été mise en évidence par l'étude d'autres familles de SHFM jusqu'à présent. Une autre hypothèse envisagée est la dérégulation par effet de position des gènes proches des points de cassure de la duplication (de Mollerat et al., 2003). Un candidat majeur est le gène *FGF8* qui joue un rôle crucial dans la fonction de l'AER, et est situé à proximité du point de cassure télomérique. Plusieurs éléments régulateurs potentiels de ce gène sont concernés par les duplications 10q24 (Marinic et al., 2013).

III.2.3 *Locus SHFM4/EEC3, gène TP63*

Le quatrième locus à avoir été identifié dans les SHFM est localisé en 3q27 et correspond au gène *TP63* (Ianakiev et al., 2000), dont nous avons abordé plus haut le rôle central dans la formation et la fonction de l'AER. Les mutations de ce gène sont responsables d'environ 10 à 16% des formes non syndromiques de SHFM et de la majorité des formes syndromiques (Celli et al., 1999; Ianakiev et al., 2000; van Bokhoven et al., 2001). Le gène *TP63* est également en cause dans d'autres affections sans atteinte des membres (Kantaputra et al., 2003; McGrath et al., 2001).

III.2.4 *Locus SHFM5 en 2q31*

Le locus SHFM5 a été initialement identifié suite à la description de délétions 2q31 visibles cytogénétiquement chez des patients atteints de SHFM syndromique (Benson et al., 1986; Boles et al., 1995; Davidsson et al., 2008; Del Campo et al., 1999; Goodman et al., 2002; Mitter et al., 2010; Nixon et al., 1997; Pescucci et al., 2007; Ramer et al., 1990; Svensson et al., 2007; Theisen et al., 2011; Tsai et al., 2009). Secondairement, des délétions de plus petite taille ont été décrites sans anomalie associée aux malformations des membres. Le locus a ainsi été réduit à un intervalle d'environ 5 Mb centromérique au gène *EVX2* (*Even-skipped homeobox 2*) (Goodman et al., 2002). Bien que le cluster *HOXD* soit télomérique à

cet intervalle, son rôle dans le développement du membre en a fait le principal candidat (Goodman et al., 2002; Goodman and Scambler, 2001; Spitz et al., 2003). Des études chez la souris ont montré que l'expression des gènes *Evx2* et *Hoxd* est régulée au cours du développement du membre par un archipel complexe d'éléments *cis*-régulateurs centromériques à *Evx2* (Montavon et al., 2011; Spitz et al., 2003). La dérégulation de l'expression du cluster *HOXD* pourrait être responsable des malformations observées chez les patients porteurs d'une délétion 2q31.

III.2.5 *Locus SHFM6, gène WNT10B*

Ce locus en 12q13 a initialement été décrit dans une famille turque où ségrége une forme non syndromique de SHFM à grande variabilité d'expression, considérée comme autosomique récessive compte tenu d'un fort degré de consanguinité (Ugur and Tolun, 2008). Dans cette famille, une mutation faux-sens homozygote a été mise en évidence dans le gène *WNT10B*. Ce gène est exprimé dans l'ectoderme au cours du développement du membre et en particulier au niveau de l'AER (Witte et al., 2009). Son implication dans les formes autosomiques récessives de SHFM a pu être confirmée par la description d'autres familles (Aziz et al., 2014; Blattner et al., 2010; Khan et al., 2012).

III.2.6 *Autres loci candidats*

Quatre autres loci candidats ont été décrits par analyse de liaison dans de grandes familles uniques où ségrége une malformation SHFM ou SHFLD.

Une région de 5,1 Mb comprenant 70 gènes en Xq26 a été décrite dans une famille où la malformation SHFM se transmet selon un mode lié au chromosome X (Ahmad et al., 1987; Faiyaz-Ul-Haque et al., 2005; Faiyaz ul Haque et al., 1993).

Par ailleurs, l'étude d'une large famille consanguine a permis d'identifier deux loci candidats dans les SHFLD suggérant une hérédité digénique : une région de 8,4 Mb en 1q42.13q43 et une région de 4,1 Mb en 6q14.1 dénommés respectivement SHFLD1 et 2 (Naveed et al., 2007).

Enfin, le locus 17p13.3 (SHFLD3) a été identifié par analyse de liaison dans une famille Brésilienne où ségrége une forme autosomique dominante de SHFLD (Lezirovitz et al., 2008; Richieri-Costa et al., 1987).

Pour ces quatre loci, les gènes ou éléments régulateurs en cause dans la pathogénèse de la malformation restaient à identifier au moment de l'initiation de ce travail.

IV. SHFLD3 : Nos données cliniques et moléculaires

En raison d'une part, de la prévalence élevée des variations en nombre de copie du génome dans les malformations de type SHFM/SHFLD, et d'autre part de la grande hétérogénéité génétique de ces affections, la réalisation d'analyses pangénomiques en CGH-array constitue une approche adaptée pour mettre en évidence de nouveaux loci en cause. La caractérisation de ces variations génomiques permet l'identification de gènes jouant un rôle dans la croissance proximo-distale du bourgeon, et en particulier dans la régulation de la voie de signalisation de l'AER.

Ainsi, en 2012, chez deux patients non apparentés avec phénotype SHFM/SHFLD sporadique, nous avons identifié par CGH-array 60K (Agilent, Courtaboeuf, France) des duplications 17p13.3 (Petit et al., 2013a), correspondant au locus SHFLD3 autosomique dominant décrit auparavant dans une famille Brésilienne (Lezirovitz et al., 2008; Richieri-Costa et al., 1987) et pour lequel le gène en cause n'était pas connu.

Nos deux patients présentaient des mains fendues bilatérales, s'associant à une agénésie radiale unilatérale chez l'un d'entre eux (Figure 12). Les duplications 17p13.3 identifiées concernaient entièrement le gène *BHLHA9*, et partiellement les gènes flanquants *ABR* et *TUSC5* (Figure 13). Pour les deux patients, la duplication 17p13.3 était héritée d'un parent asymptomatique, non porteur de malformation des membres. Néanmoins, la pénétrance incomplète étant décrite classiquement dans les familles de SHFM, ceci ne justifiait pas de remettre en question le lien probable entre cette variation en nombre de copie et le phénotype.

Cette conclusion a pu être confortée par la publication à la même période de trois familles similaires, présentant des duplications 17p13.3 de taille variable en association avec un phénotype SHFM/SHFLD de pénétrance incomplète (Armour et al., 2011; Klopocki et al., 2012; Petit et al., 2013a). Ces nouvelles descriptions ont permis d'exclure *TUSC5* de la région minimale critique, ne contenant donc plus que le gène *BHLHA9* et une partie du gène *ABR*. Il n'y avait alors aucune donnée connue concernant la fonction ou le territoire d'expression du gène *BHLHA9*. Il était en revanche connu que le gène *ABR* code pour une protéine à activité GTPase (Chuang et al., 1995; Cunnick et al., 2009), les études fonctionnelles chez la souris suggérant un rôle dans la morphogenèse du vestibule (Kartinen et al., 2002).

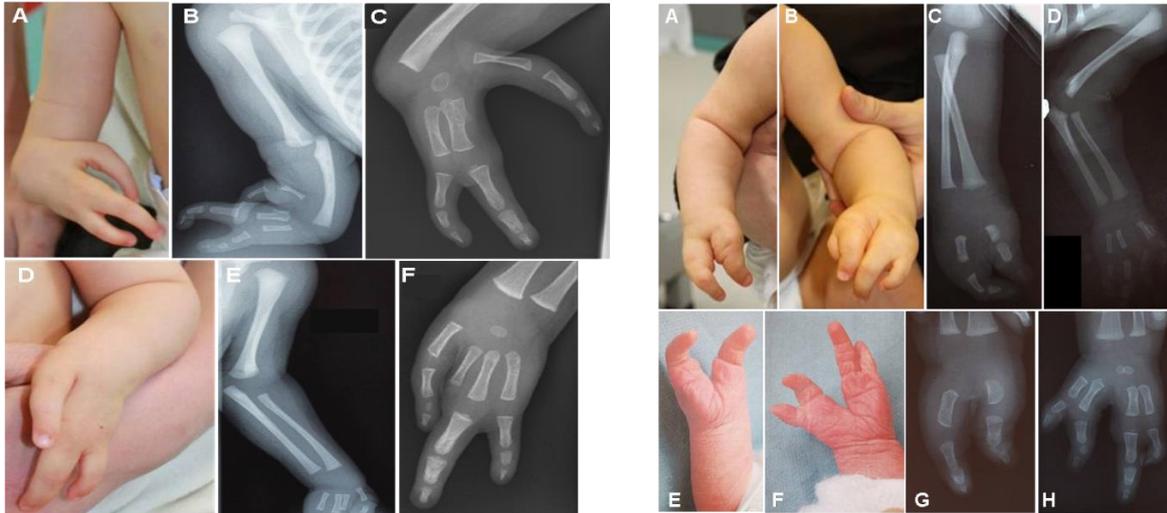


Figure 12 : Malformations des membres supérieurs associées aux duplications 17p13.3.

Panel de gauche : Patient présentant des mains fendues bilatérales avec absence des rayons centraux associées à une agénésie radiale droite. A,B,C : Membre supérieur droit. D,E,F : Membre supérieur gauche.

Panel de droite : Patient présentant des mains fendues bilatérales isolées. A,E,C,G : Membre supérieur droit présentant seulement deux rayons. B,F,D,H : Membre supérieur gauche avec absence de 3^{ème} rayon et hypoplasie des 1^{er} et 5^{ème} rayons. D'après Petit et al., 2013.

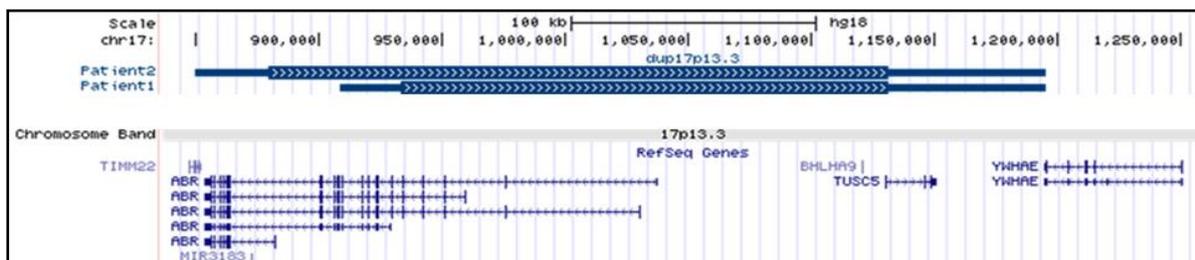


Figure 13 : Etendue des duplications 17p13.3 identifiées.

La région minimale dupliquée est représentée par une large barre, les extrémités correspondant à la région maximale dupliquée. Les gènes concernés sont indiqués en bas du schéma. D'après Petit et al., 2013a.

La publication de Klopocki et coll. a permis d'avancer dans la compréhension du lien entre les duplications 17p13.3 et la malformation SHFM. En effet, ils ont rapporté 17 familles, permettant de réduire la région minimale critique à un seul gène, *BHLHA9* (Klopocki et al., 2012).

Le gène *BHLHA9* comporte un seul exon et code un facteur de transcription de 231 acides aminés à basic helix-loop-helix dénommé Fingerin. Son expression chez les embryons de zebrafish et de souris est confinée au mésenchyme sous-jacent à l'AER (Figure 14). Son invalidation par morpholinos chez le zebrafish est responsable d'un défaut de croissance des nageoires pectorales (Klopocki et al., 2012) (Figure 15). Chez la souris, son KO entraîne des anomalies des membres à type de syndactylie membraneuse 2-3 des membres supérieurs (Figure 15), confirmant ainsi le lien physiopathologique suspecté entre les malformations SHFM liées à une augmentation de l'apoptose, et les syndactylies liées à une diminution de l'apoptose (Schatz et al., 2014).

Bien que son rôle dans la signalisation de l’AER ne soit pas encore connu, le dosage génique de *BHLHA9* semble être important dans le développement du membre, puisque les duplications de ce gène constituent l’anomalie moléculaire la plus fréquemment identifiée dans les SHFM avec atteinte de os longs (Klopocki et al., 2012).

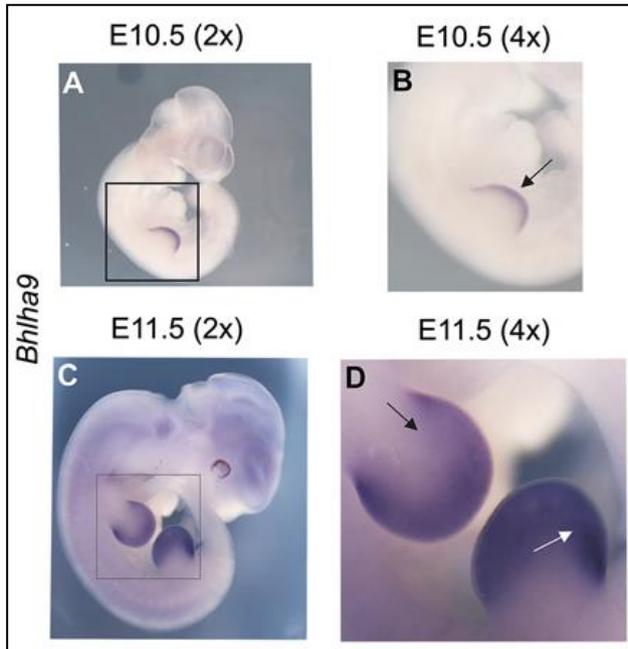


Figure 14 : Expression de *BHLHA9* au cours du développement chez l’embryon de souris.

L’expression de *BHLHA9* est restreinte au bourgeon de membre, et plus précisément au mésenchyme sous-jacent à l’AER. D’après Klopocki et al., 2012.

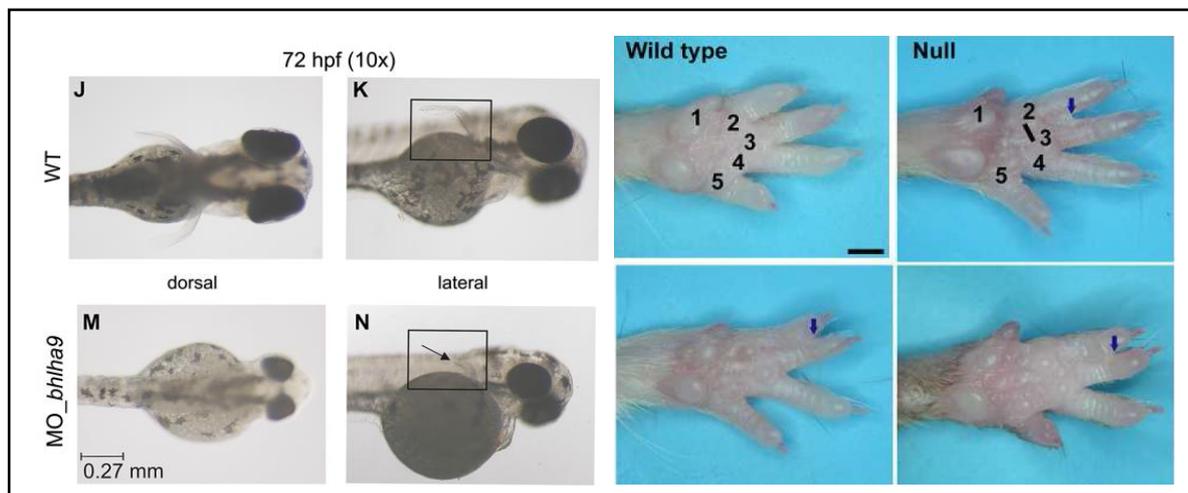


Figure 15 : *BHLHA9* est requis pour le développement du membre.

Panel de gauche : L’invalidation de *Bhlha9* par morpholinos (MO) chez le zebrafish entraîne un défaut de croissance des nageoires pectorales, ici à 72 heures de développement (flèche). D’après Klopocki et al., 2012.

Panel de droite : Les souris KO pour *Bhlha9* présentent une syndactylie membraneuse 2-3 des membres supérieurs (indiquée par une flèche). D’après Schatz et al., 2014.

Afin de confirmer l’implication de ce gène et de poursuivre la caractérisation clinique et moléculaire des SHFM, nous avons repris l’ensemble de notre cohorte nationale et

internationale de 75 cas index porteurs d'une malformation de type SHFM non syndromique, avec ou sans atteinte des os longs, et nous avons mis au point l'étude de *BHLHA9* en PCR quantitative (Figure 16, Tableau 3). Les données cliniques et moléculaires ont fait l'objet de l'article 1 ci-après (Petit et al., 2013b).

Parallèlement, nous avons mis au point le séquençage Sanger du gène *BHLHA9* (un seul exon) (Figure 16, Tableau 3) et étudié l'ensemble de la cohorte SHFM/SHFLD, avec pour objectifs : d'une part, d'identifier le mécanisme en cause dans la malformation chez les patients non porteurs d'une duplication ; d'autre part, de rechercher un second événement nécessaire à la l'expression de la malformation chez les patients symptomatiques porteurs d'une duplication.

cggtggccataaagcccagctggaaggggcctgtctcgggagtgtccagccccaggagccggggaccgtccgcgtcgcgagccg
ggccaaggcagtgggcagagggcagagggcagagggccggggctggggcagagggcgagtggccgggaaggccATGCTGC
 GGGGCGGCCAGGACTAGGCCTCACGGCGCGGAAGGGGCCGAGGACTCTGCGGAGGACTTGGGGGGCCCCTGCC
 CCGAGCCCCGGGGCGATTTCGGGGGTGCTGGGGGCGAACGGCGCTTCTTGCAGCCGGGGCGAGGCGGAGGAGCCGG
 CGGGCAGGAGGCGCGCGCCGGTGCGGTCCAAGGCGCGGCATGGCCGCCAACGTGCGGGAGCGCAAGCGCA
 TCCTAGACTACAACGAGGCCTTCAACGCGCTGCGCCGGGCGCTGCGGCACGACCTGGGCGGCAAGAGGCTCTCCA
 AGATCGCCACGCTGCGCAGGGCCATCCACCGCATCGCCGCGCTCTCCCTGGTCCGCGCGCCAGCCCCGCGCCCC
 GCGGGCCCTGCGGACACCTGGAGTGCCACGGCCCCGCGCGCGGGGACACCGGGGACACAGGCGCCAGCCCCC
 CGCCGCTGCGAGGGCCAGCCTCGCGCGCCAGACGCGCCCGCCCTCGGTGCCGTCCGCGCCCCGCTGCGCCT
 CGTGCCCCCGCACGCGCCCCCTGGCACGGCCAGTGCGGTGGCCGAGGGGCCGGGCTAGCACAGGCTCCGGGG
 GAAGCTGGCGCCGCTGTCCGGGGGCTTCTTCTGCGGGCCGCTCCCTGGCCGCGGGGCTACCTGCGATCCGCC
 CCGGGATGGGCCATCCGCGCTCCTGaccggcctcgaggcaccggctgggctgcagggagg

Figure 16 : Séquence génomique de *BHLHA9* (NM_001164405) et localisation des domaines fonctionnels.
 Surlignage gris clair : domaine bHLH de liaison à l'ADN. Surlignage gris foncé : domaine riche en Proline (Pro-Rich). Majuscules : Séquence codante (exon 1). Souligné : localisation des amorces de séquence et de PCR quantitative.

| Amorces | Sens/Antisens | Séquence (5'>3') |
|-----------------------------|---------------|-------------------------|
| Séquençage domaine bHLH | S1 | CGTGGTGCCATAAAGCCCA |
| Séquençage domaine bHLH | AS1 | CGTGGCACTCCAGGTGTC |
| Séquençage domaine Pro-Rich | S2 | GGACACCTGGAGTGCCACG |
| Séquençage domaine Pro-Rich | AS2 | CCTCCCTGCAGCCCAGCCG |
| PCR quantitative 1 | S1 | AACGTGCGGGAGCGCAA |
| PCR quantitative 1 | AS1 | GCGATCTTGGAGAGCCTCTTGCC |
| PCR quantitative 2 | S2 | GGCCAAGGCAGTGGGCAGAGG |
| PCR quantitative 2 | AS2 | AGACGCCTTTGCAGTCCCGGGTT |

Tableau 3 : Séquence des amorces utilisées pour l'étude de *BHLHA9*.

Article 1

Publié dans *Clinical Genetics*, 2014;85(5):464-9.

**Split hand/foot malformation with long bone deficiency and *BHLHA9* duplication:
report of 13 new families**

Florence Petit^{1,2}, Anne-Sophie Jourdain³, Joris Andrieux⁴, Geneviève Baujat⁵, Clarisse Baumann⁶, Claire Beneteau⁷, Albert David⁷, Laurence Faivre⁸, Dominique Gaillard⁹, Brigitte Gilbert-Dussardier¹⁰, Pierre-Simon Jouk¹¹, Cédric Le Caignec⁷, Philippe Loget¹², Laurent Pasquier¹³, Nicole Porchet^{2,3}, Muriel Holder-Espinasse^{1,2,14}, Sylvie Manouvrier-Hanu^{1,2}, Fabienne Escande³

¹ Service de Génétique Clinique, Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU Lille, France

² Université Lille Nord de France

³ Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Centre de Biologie Pathologie, CHRU Lille, France

⁴ Laboratoire de Génétique Médicale, Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU Lille, France

⁵ Département de Génétique, Fondation Imagine, CHU Necker-Enfants malades, AP-HP, Paris, France

⁶ Département de Génétique, Hôpital Robert Debré, CHU Paris, France

⁷ CHU Nantes, Service de Génétique Médicale, Nantes, France

⁸ Centre de Génétique et Centre de Référence Maladies Rares Anomalies du Développement et Syndromes Malformatifs de l'interrégion Est, CHU de Dijon et Université de Bourgogne, Dijon, France

⁹ Service de Génétique et Biologie de la Reproduction, Hôpital Maison Blanche, CHRU Reims, SFR CAP-Santé, UFR Médecine Reims, France

¹⁰ Service de Génétique Médicale, CHU Poitiers, France

¹¹ Service de Génétique et Procréation, Pôle Couple-Enfant, CHU Grenoble, France

¹² Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, CHU Rennes, France

¹³ Service de Génétique Clinique, Hôpital Sud, CHU Rennes, France

¹⁴ Clinical Genetics Department, Guy's Hospital, London, UK

Running title: SHFLD and *BHLHA9* duplication

Corresponding author :

Florence PETIT

Service de génétique clinique

Hôpital Jeanne de Flandre

CHRU

59037 Lille cedex

FRANCE

tel +33 3 20 44 49 11

fax +33 3 20 44 49 01

Conflict of Interest Statement: The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments: We gratefully acknowledge Dr Ellen Thomas for critical reading of the manuscript. This work was partially supported by the French national clinical research program (Programme Hospitalier de Recherche Clinique).

Abstract

Split hand/foot malformation (SHFM) with long bone deficiency (SHFLD, MIM#119100) is a rare condition characterized by SHFM associated with long-bone malformation usually involving the tibia. Previous published data reported several unrelated patients with 17p13.3 duplication and SHFLD. Recently, the minimal critical region had been reduced, suggesting that *BHLHA9* copy-number gains are associated with this limb defect. Here we report on 13 new families presenting with ectrodactyly and harbouring a *BHLHA9* duplication.

Key words: *BHLHA9*, Ectrodactyly, SHFLD, SHFM, 17p13.3 duplication

Introduction

Split hand/foot malformation (SHFM) is a genetically heterogeneous congenital limb malformation characterized by a defect of the central rays of hands and/or feet, due to a failure of median apical ectodermal ridge activity (1). Among syndromic SHFM, split hand/foot malformation with long bone deficiency (SHFLD, MIM#119100) is a rare condition characterized by the association of SHFM and a long-bone malformation, usually a tibial defect. A major locus was first identified on 17p13.3 (MIM#612576, SHFLD3) by linkage analysis of a large family presenting with autosomal dominant SHFLD (2, 3). 17p13.3 duplications were then reported in unrelated families with SHFLD (4, 5), the minimal 17p13.3 critical region encompassing a single gene: *BHLHA9*. This gene encodes a putative basic loop helix transcription factor expressed in the limb bud mesenchyme underlying the apical ectodermal ridge in mice and zebrafish embryos. Knock-down of *Bhlha9* in zebrafish results in shortening of the pectoral fins, confirming its role in limb development (5). At present, little is known about this gene's function.

Here we report clinical data from 13 new families with ectrodactyly resulting from a 17p13.3 duplication containing *BHLHA9*.

Materials and Methods

Patients

Patients affected with ectrodactyly and/or long-bone deficiency were recruited through clinical genetics departments. We included 72 index cases in this study. Clinical data were obtained through patients' referring physicians and patient consent was obtained prior to the analyses. In this series, 10q24 duplication testing (array-CGH and/or

quantitative PCR) and *TP63* testing (Sanger sequencing of exons and flanking introns) were negative (respectively MIM 246560 and MIM 603273).

Quantitative PCR

DNA was extracted from blood or tissue according to standard methods. Two qPCR assays were designed in the *BHLHA9* gene (NM_001164405.1, sequence of primers available on request). The reaction was performed with the SYBR Green technology according to the manufacturer's protocol (Applied Biosystems®). Quantification of the target sequences was normalised to an assay from *RNAse P* gene, and the relative copy number was determined on the basis of the comparative $\Delta\Delta\text{Ct}$ method using a normal control DNA as the calibrator.

Results

We identified a *BHLHA9* duplication in 13 unrelated probands by quantitative PCR, among the 72 cases of ectrodactyly and/or long-bone deficiency studied (18%). Of these, 3 were sporadic cases and 10 had a family history of limb malformation. These 13 families comprised 42 affected cases: 22 males, 18 females, and 2 fetuses of undetermined sex. Clinical manifestations are reported in Table 1, pictures and radiographs are depicted in Figure 1. Pedigrees are shown in Figure 2. Long bone deficiency was a frequent finding, present in 43% (18/42) of affected individuals. Most long bone defects affected the tibia (10/42, 24%), either unilaterally (5/42, 12%) or bilaterally (5/42, 12%). Rarely, limb reduction affected the radius (2/42, 4.8%) or the femur (1/42, 2.4%). There were no extra-limb malformations and no reported neurodevelopmental anomalies. Clinical manifestations showed high intra-familial and intra-individual variability (Table 1, Figure 1), and striking asymmetry of limb

malformations was a frequent finding (23/42, 55%). All affected cases tested were carriers of a *BHLHA9* duplication. Pedigrees often showed non-penetrant individuals (Figure 2). Indeed, 19 obligate carriers of the *BHLHA9* duplication were asymptomatic (9 females and 10 males). For the three sporadic cases, testing of both parents showed that the duplication was inherited from an asymptomatic parent (from the mother in family 2, from the father in families 5 and 13).

Discussion

We identified a *BHLHA9* duplication in 13 unrelated families. Affected patients presented with isolated limb malformations, in particular there was no sign of ectodermal dysplasia and development was normal. Hand defects were present in 75% of the affected patients, unilateral (42.5%) or bilateral (32.5%). Anomalies usually consisted of ectrodactyly. Syndactyly or monodactyly were infrequent findings. Foot defects were present in 38% of patients. The anomalies were variable (hypo/aplasia of the first metacarpal, club-foot, syndactyly, hexadactyly, sandal gap) and associated with lower-limb long-bone deficiency in half of the cases. Long bone deficiency was present in 43% of the affected patients, being quite indicative of *BHLHA9* copy-number gain. This defect affected the tibia in most cases. One patient in our cohort had a radial hypoplasia (F1-IV2), and a second one had an arm reduction defect that was unfortunately insufficiently documented because of early termination of pregnancy (F12-IV8). We previously reported a radial defect in a patient carrying a larger 17p13.3 duplication encompassing *BHLHA9* and two flanking genes (6). Thus, we confirm that this defect can be associated with *BHLHA9* duplication, although it is an infrequent finding. Femur hypoplasia was also present in one of our cases. This finding had not been reported before in patients with *BHLHA9* duplication. However, femoral

hypoplasia seems to be present in one patient reported by Armour *et al.*, according to the radiographs published, although this is not mentioned in the clinical description of the case (4).

We observed incomplete penetrance of the *BHLHA9* duplication, consistent with recent literature: according to Klopocki *et al.*, only 30 to 50% of duplication carriers are affected with SHFLD (4, 5). Additional molecular events and/or stochastic factors are likely to explain this observation. Moreover Klopocki *et al.* described a sex bias, with more males being affected than females in their cohort (5). We did not observe this distortion in our smaller cohort, sex ratios of affected and non-penetrant individuals being around 1. In addition, in our series affected males appeared to have more severe limb malformations than females: a long-bone deficiency was present in 25% of females versus 41% of males; only one extremity was affected in 67% of females versus 41% of males. Klopocki *et al.* have reported the inverse observation (5), therefore description of larger cohorts is mandatory to draw firm conclusions about sex bias.

Ten of our 13 families have been previously studied by array-CGH (Agilent® 44K for families 3, 4, 5, 9, 10; 60K for family 11; 180K for families 12 and 13; 244K for families 6 and 8). For Family 11, only one probe (chr17:1,184,475-1,184,534(hg19)) localized in the *TUSC5* gene, proximal to *BHLHA9*, appeared duplicated, thus the initial analysis was considered normal. Families 12 and 13 carried larger duplications involving *BHLHA9* and flanking genes (family 12: chr17:1,073,830-1,292,325(hg19); family 13: chr17:1,130,573-1,270,478(hg19)). In the remaining seven families, array-CGH revealed no chromosomal imbalance. Indeed the usual commercial arrays have no probes in *BHLHA9* gene, which is localized in a GC-rich region, stressing the need to perform quantitative PCR in order to identify *BHLHA9* duplication. Comparing with

families 12, 13 and previously reported patients harbouring larger 17p13.3 duplications, we observe that there is no correlation between the phenotype and the duplication size, which is consistent with the findings of Klopocki *et al* (5).

In conclusion, long-bone deficiency associated with SHFM is highly specific to *BHLHA9* duplication. Nevertheless, as more than half patients do not present with long-bone deficiency, testing for *BHLHA9* copy-number gain should be performed in cases of isolated ectrodactyly. Reviewing our cases of non-syndromic SHFM/SHFLD, it appears that *BHLHA9* copy-number gain should be tested first in case of long-bone deficiency or atypical ectrodactyly, i.e. not involving all four extremities. These findings are infrequently associated with 10q24 duplication in our experience (data not shown). Inversely, typical ectrodactyly (i.e., affecting all four extremities) or monodactyly are more indicative of 10q24 duplication (SHFM3, MIM 246560). In these cases, *BHLHA9* testing should be performed after ruling out a 10q24 duplication.

To our knowledge, *BHLHA9* mutations have not been reported so far. We performed *BHLHA9* sequencing (one coding exon) in the non-duplicated index cases, and found no mutations (data not shown). We have not detected any *BHLHA9* deletions, suggesting that the SHFLD phenotype could be associated with an over-expression mechanism. However, *BHLHA9* gain-of-function mutations do not seem to be a common finding in SHFLD, though we have not excluded promoter mutations, nor studied potential regulatory elements. Little is known about the function of this gene at present, and the mechanism by which the likely over-expression of the *BHLHA9* transcription factor could lead to the limb malformations is unclear.

References

1. Duijf PH, van Bokhoven H, Brunner HG. Pathogenesis of split-hand/split-foot malformation. *Hum Mol Genet* 2003; 12 Spec No 1: R51-60.
2. Lezirovitz K, Maestrelli SR, Cotrim NH et al. A novel locus for split-hand/foot malformation associated with tibial hemimelia (SHFLD syndrome) maps to chromosome region 17p13.1-17p13.3. *Hum Genet* 2008; 123 (6): 625-631.
3. Richieri-Costa A, Brunoni D, Laredo Filho J et al. Tibial aplasia-ectrodactyly as variant expression of the Gollop-Wolfgang complex: report of a Brazilian family. *Am J Med Genet* 1987; 28 (4): 971-980.
4. Armour CM, Bulman DE, Jarinova O et al. 17p13.3 microduplications are associated with split-hand/foot malformation and long-bone deficiency (SHFLD). *Eur J Hum Genet* 2011; 19 (11): 1144-1151.
5. Klopocki E, Lohan S, Doelken SC et al. Duplications of BHLHA9 are associated with ectrodactyly and tibia hemimelia inherited in non-Mendelian fashion. *J Med Genet* 2012; 49 (2): 119-125.
6. Petit F, Andrieux J, Demeer B et al. Split-hand/foot malformation with long-bone deficiency and BHLHA9 duplication: two cases and expansion of the phenotype to radial agenesis. *Eur J Med Genet* 2013; 56 (2): 88-92.

Legends

Figure 1: Clinical and radiological limb findings in affected patients from families with *BHLHA9* duplication. The typical feature in the upper limbs is split-hand, with high inter-individual and intra-familial variability. The typical features in the lower limb are hypoplasia of the first ray and tibia. Numbering of patients and families refers to the pedigrees in Figure 2. F: family. F11-V2, F12-III1, F10-II4: pictures taken after surgical correction. F6-III7: left panel: prenatal computed-tomography scan of the right lower-limb; right panel: postnatal radiographs of the right leg. Both images show tibial hypoplasia and absence of first ray.

Figure 2: Pedigrees of families with *BHLHA9* duplication. F: Family; +: positive testing for *BHLHA9* duplication; -: negative testing for *BHLHA9* duplication.

Table 1: Limb features of affected patients from families with *BHLHA9* duplication. Numbering of patients and families refers to the pedigrees in Figure 2. M: male; F: female; N: normal.

Figure1

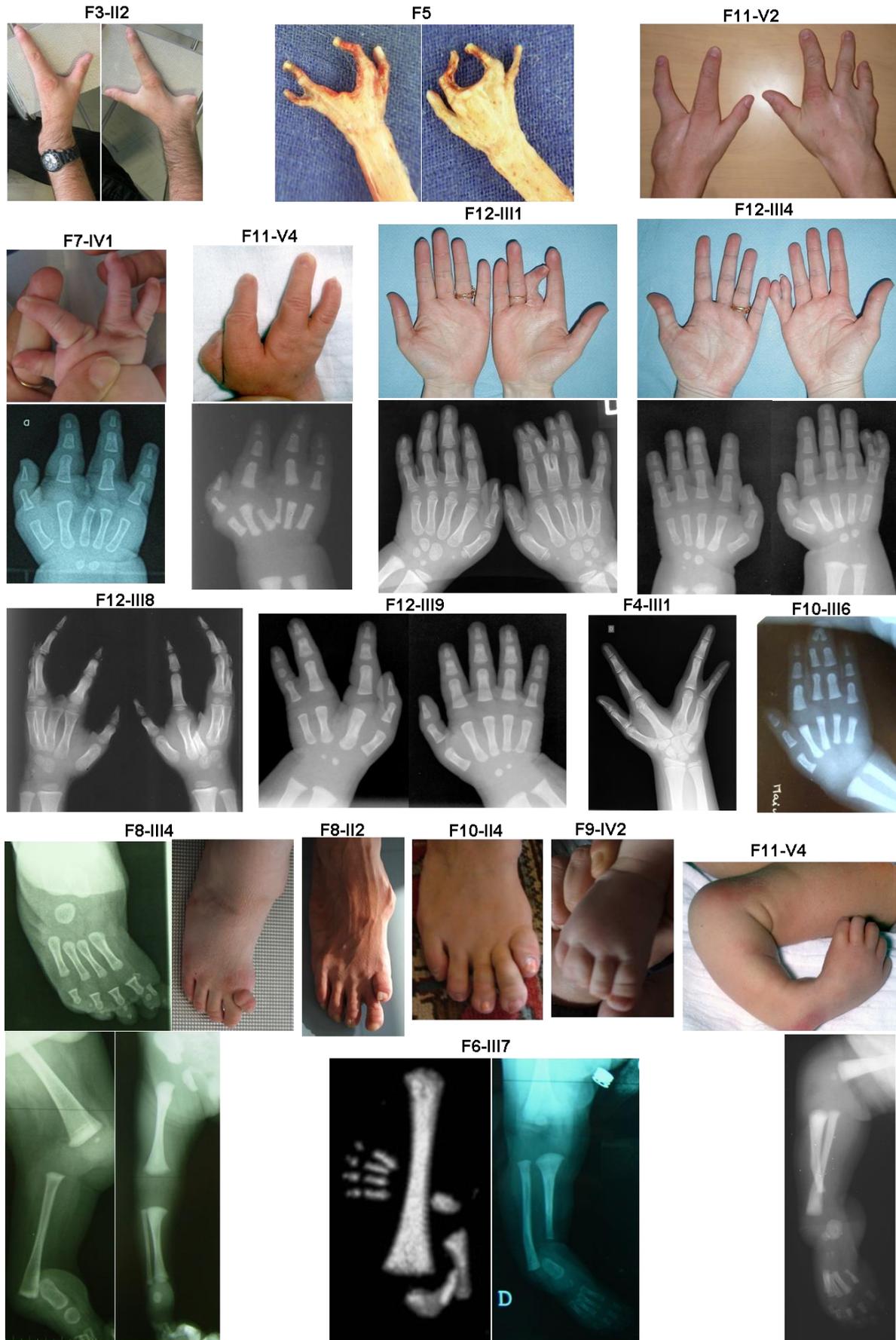
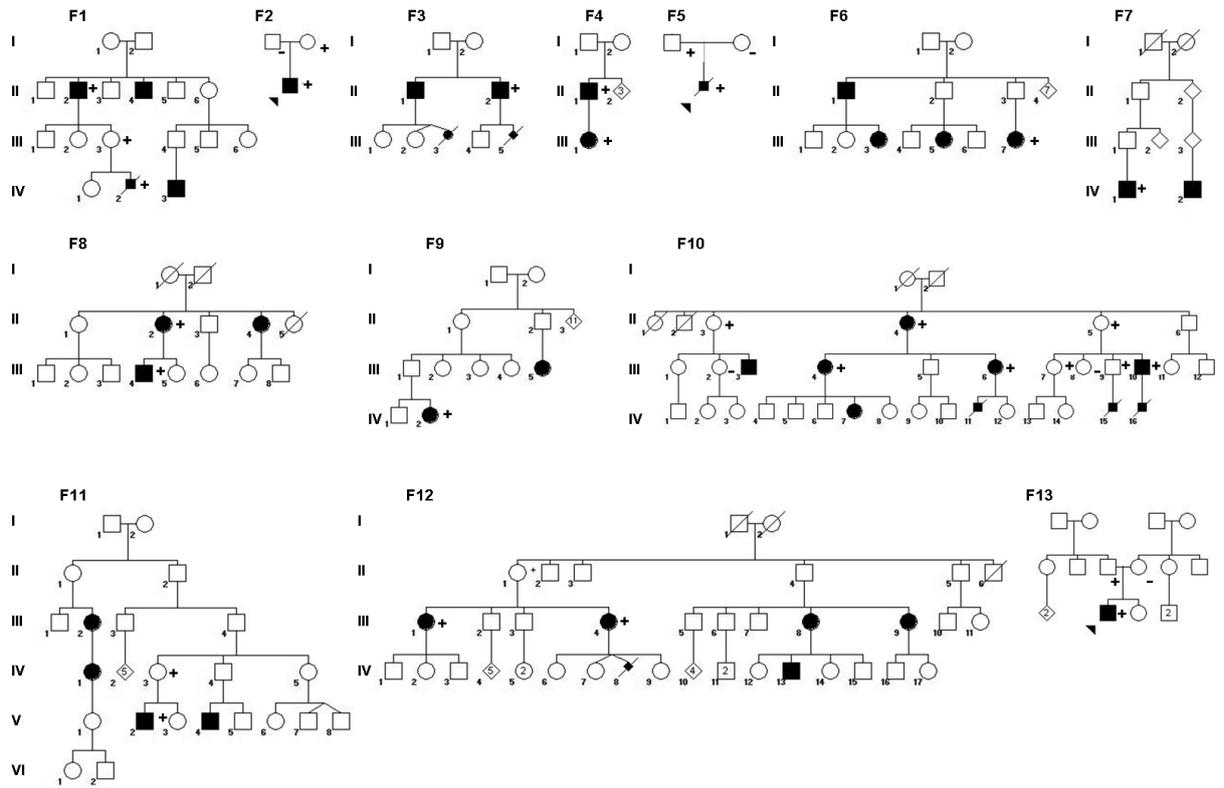


Figure 2



Chapitre I – Croissance et différenciation proximo-distale

Table 1

| Patients | Gender | Upper limbs | | Lower limbs | |
|-----------------------|--------|---|---------------------------------------|---------------------------------------|--|
| | | Left | Right | Left | Right |
| Family 1 | | | | | |
| II2 | M | N | Split-Hand | N | N |
| II4 | M | N | Split-Hand | N | N |
| Fetus IV2 | M | Split-Hand | Monodactyly, radial hypoplasia | N | N |
| IV3 | M | N | Split-Hand | N | N |
| Family 2 | | | | | |
| Sporadic case | M | Split-Hand | Split-Hand | N | N |
| Family 3 | | | | | |
| II1 | M | Unilateral syndactyly of two digits (side?) | | N | N |
| II2 | M | Absence of 3rd to 5th rays | | Oligodactyly, tibial hypoplasia | Oligodactyly, tibial hypoplasia |
| III5 (fetus) | ? | Syndactyly 2-3 and 4-5 | | Tibia and fibular aplasia, club-foot | Tibia and fibular aplasia, club-foot |
| Family 4 | | | | | |
| II1 | M | Syndactyly 2-3 | | Tibial aplasia, leg amputation | Tibial aplasia, leg amputation |
| III1 | F | N | | N | N |
| Family 5 | | | | | |
| Sporadic case (fetus) | M | Split-Hand | Split-Hand | N | N |
| Family 6 | | | | | |
| II1 | M | N | Split-Hand | Tibial hypoplasia, absence of 1st ray | Tibial aplasia, fibular hypoplasia, absence of 1st to 3rd rays |
| III3 | F | N | N | N | Hallux duplication |
| III5 | F | Split-Hand | N | N | N |
| III7 | F | N | N | N | Tibial hypoplasia, absence of 1st ray |
| Family 7 | | | | | |
| IV1 | M | N | Split-Hand | Sandal gap | Sandal gap |
| IV2 | M | Unilateral oligodactyly (side?) | | N | N |
| Family 8 | | | | | |
| II2 | F | N | N | N | 1st metacarpal aplasia |
| II4 | F | N | N | N | Tibial aplasia, fibular hypoplasia |
| III4 | M | N | N | Tibial aplasia | 1st metacarpal aplasia, club-foot |
| Family 9 | | | | | |
| III5 | F | Unilateral monodactyly (side?) | | N | N |
| IV2 | F | Split-Hand | Split-Hand | N | Syndactyly 3-4 |
| Family 10 | | | | | |
| II4 | F | N | N | N | Hexadactyly, 1st ray hypoplasia |
| III3 | M | Split-Hand | Split-Hand | N | N |
| III4 | F | N | N | N | Femur hypoplasia, tibial aplasia, club-foot |
| III6 | F | N | Syndactyly 3-4 | N | N |
| III10 | M | Hexadactyly | | N | N |
| IV7 | F | N | N | N | Syndactyly |
| IV11 (fetus) | M | Split-Hand | Reduction defect | N | Reduction defect |
| IV15 (fetus) | M | N | N | N | Reduction defect |
| IV16 (fetus) | M | N | N | Tibial aplasia, syndactyly 1-2 | Tibial aplasia |
| Family 11 | | | | | |
| III2 | F | Reduction defect | | N | N |
| IV1 | F | Reduction defect | | N | N |
| V2 | M | Split-Hand | Split-Hand | N | N |
| V4 | M | N | Split-Hand | N | Tibial hypoplasia |
| Family 12 | | | | | |
| III1 | F | N | 3rd ray duplication, syndactyly 2-3-4 | N | N |
| III4 | F | N | 5rd ray duplication | N | N |
| III8 | F | Split-Hand | Split-Hand | N | N |
| III9 | F | Split-Hand | N | N | N |
| IV8 (fetus) | ? | Arm reduction defect | | N | N |
| IV13 | M | Split-Hand | Split-Hand | N | N |
| Family 13 | | | | | |
| Sporadic case | M | 3rd ray duplication, syndactyly 2-3 and 3-4 | | N | N |

Discussion

Les réarrangements chromosomiques suspectés altérer la régulation génique par effet de position, modification du dosage génique ou du nombre de copies en élément régulateur, sont largement majoritaires parmi les étiologies des malformations de type mains et pieds fendus. En particulier, les duplications 10q24 et 17p13.3 représentent les deux causes principales des SHFM non syndromiques d'origine génétique. Dans les deux cas, la compréhension de la physiopathogénèse est encore incomplète mais une dérégulation d'un ou des gènes concernés par ces remaniements ou à proximité est très certainement à l'origine des malformations.

Nous avons travaillé plus particulièrement sur les duplications 17p13.3 pour lesquelles l'étude de la région minimale critique a permis d'identifier un seul gène candidat, *BHLHA9* (Klopocki et al., 2012). L'importance de son dosage génique pour le développement des membres a pu être confirmée par l'observation d'anomalies des membres en lien avec son invalidation chez l'animal : il est observé un défaut de croissance des nageoires pectorales chez le zebrafish (Klopocki et al., 2012) et des syndactylies membraneuses chez la souris (Schatz et al., 2014). Ainsi, la surexpression de ce gène est responsable d'une augmentation de l'apoptose au niveau de la crête apicale ectodermique à l'origine des malformations du spectre SHFM, tandis que son absence d'expression est responsable d'une diminution de l'apoptose (Schatz et al., 2014). L'étape à laquelle intervient *BHLHA9* dans la voie de signalisation de l'AER n'est pas encore identifiée à l'heure actuelle.

Nous avons mis en évidence une duplication du gène *BHLHA9* chez 13 individus, soit 17,3% des patients de notre cohorte SHFM/SHFLD. L'analyse clinique de notre série a permis d'observer l'absence de SHFM typique touchant les quatre extrémités. Les présentations les plus fréquentes sont le phénotype SHFLD dans près de la moitié des patients, ou une SHFM touchant deux à trois extrémités dans près de l'autre moitié des cas. Des antécédents familiaux sont rapportés dans près de la moitié des cas. Conformément aux autres familles rapportées dans la littérature, nous avons observé une pénétrance incomplète et une grande variabilité d'expression intra-familiale et intra-individuelle avec des atteintes fréquemment asymétriques chez les patients porteurs d'une duplication *BHLHA9*, rendant le conseil génétique difficile.

Les mécanismes moléculaires expliquant la complexité du mode de transmission ne sont pas connus à ce jour. Un deuxième événement moléculaire est très probable en addition à

la duplication, pour entraîner l'apoptose excessive au niveau de l'AER responsable de l'anomalie de développement du membre.

Dans l'hypothèse d'une variation génomique ponctuelle pouvant se surajouter à la duplication et majorer sa surexpression, nous avons complété notre étude par la recherche chez les patients ayant exprimé la malformation des membres, d'une variation dans la séquence du gène *BHLHA9* (un exon codant, étudié par PCR-séquençage Sanger). Cette étude a également été réalisée chez les patients SHFM/SHFLD non porteurs d'une duplication, dans le but d'identifier l'évènement en cause dans la malformation. Au total, aucun variant pathogène n'a été mis en évidence, suggérant que les mutations ponctuelles gain de fonction de *BHLHA9* ne sont pas responsables du phénotype SHFM/SHFLD.

Actuellement, la région minimale critique dupliquée décrite s'étend sur 11,8 kb et concerne la totalité du gène *BHLHA9* (chr17.hg19:1,170,403-1,182,242) (Figure 17). En amont de celui-ci, plusieurs régions sont suspectées contenir des éléments régulateurs sur la base de leur conservation interspèces, de la fixation de facteurs de transcription ou d'un enrichissement de l'acétylation des histones (données issues d'immunoprécipitation de chromatine), d'une hypersensibilité à la DNase (Figure 17). Nous envisageons de poursuivre les investigations moléculaires dans les familles de SHFM/SHFLD par le séquençage du promoteur et de ces régions d'intérêt en amont. En effet, des mutations ponctuelles concernant ces régions potentiellement régulatrices pourraient également être à l'origine des SHFM, et/ou avoir un impact sur la pénétrance ou la variabilité d'expression, ou encore expliquer l'hérédité complexe décrite dans plusieurs familles (Naveed et al., 2007; Ugur and Tolun, 2008).

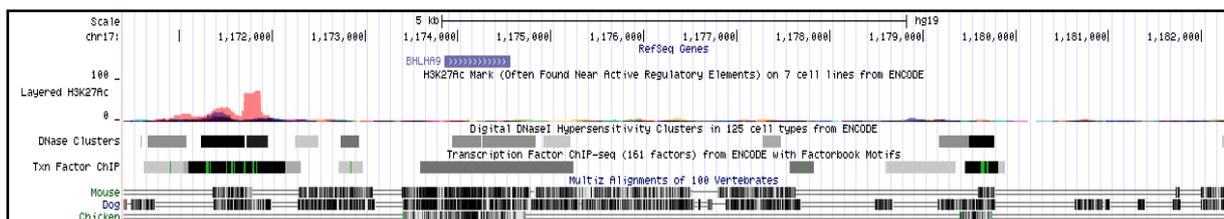


Figure 17 : Région minimale critique associée au SHFLD3.

Dans l'hypothèse alternative d'une hérédité oligogénique, nous avons établi une collaboration avec le Professeur Giuseppe Merla (Casa Sollievo delle Sofferenze, San Giovanni Rotondo, Italie) et le Professeur Alexandre Reymond (Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Suisse) visant à réaliser un séquençage de l'exome chez des patients porteurs d'une duplication *BHLHA9*, avec ou sans malformation des membres, afin

de rechercher un éventuel deuxième événement dans un second gène permettant d'expliquer la pénétrance incomplète de la malformation.

Dans notre série de patients SHFM/SHFLD, nous n'avons identifié aucune délétion ou mutation ponctuelle de *BHLHA9*. Il a été montré chez la souris que le knock-out du gène entraîne des syndactylies 2-3 des membres supérieurs (Schatz et al., 2014). Considérant le phénotype de ces modèles animaux, ce type d'anomalie moléculaire devrait être recherché dans des séries de patients présentant des syndactylies. De façon intéressante, une forme particulière de syndactylie autosomique récessive a été localisée dans deux familles consanguines en 17p13.3 (Malik et al., 2005; Percin et al., 1998), locus comprenant le gène *BHLHA9*. Le phénotype correspond à une syndactylie avec synostose des 3^{ème} et 4^{ème} rayons des mains, associée à des syndactylies membraneuses des pieds (syndactylie de type IX ou mesoaxial synostotic syndactyly with phalangeal reduction, OMIM609432). Le séquençage et la recherche de variation en nombre de copie du gène *BHLHA9* serait donc particulièrement indiquée chez ce type de patient. A cet effet, nous envisageons de reprendre sur le plan clinique tous les patients de notre cohorte présentant une syndactylie afin de sélectionner ceux dont la malformation des membres serait compatible avec ce phénotype en vue de l'étude moléculaire.

La malformation SHFM revêt une grande hétérogénéité clinique et génétique. L'analyse de notre cohorte de 75 patients a permis d'identifier le déterminisme moléculaire dans 46 % des cas. Dans les formes non syndromiques, deux anomalies génomiques sont majoritaires: les duplications 10q24 (22,6 %) et 17p13.3 (17,6 %). A noter que ces duplications concernent des régions chromosomiques peu couvertes par les puces CGH-array commerciales, de ce fait cet examen peut être mis en défaut pour leur détection. Une analyse en PCR quantitative nous semble donc devoir être réalisée en première intention.

Ce travail nous permet aujourd'hui de proposer un arbre décisionnel pour orienter l'analyse moléculaire devant une malformation de type SHFM, reposant sur le mode de transmission apparent et la présentation clinique (Figure 18).

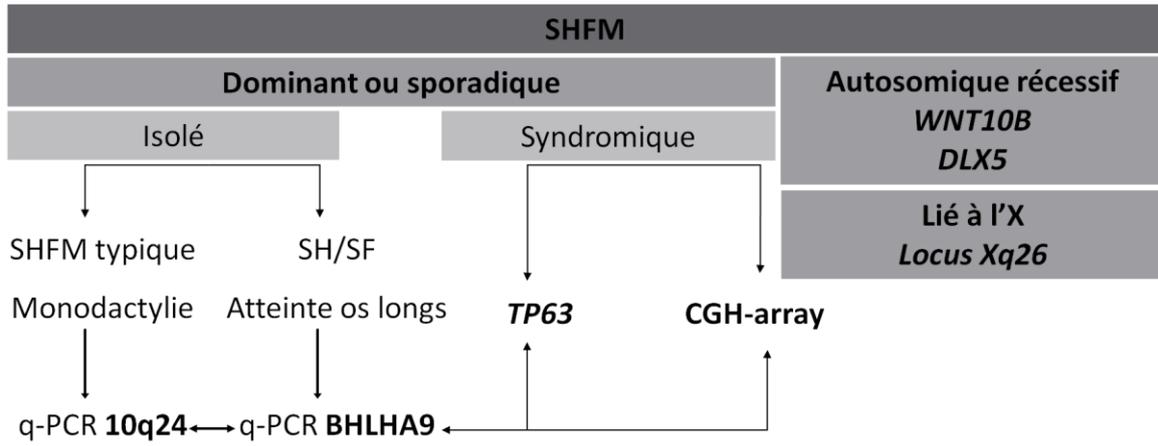


Figure 18 : Arbre décisionnel pour l'étude moléculaire des patients atteints de malformation des mains et pieds fendus.

CHAPITRE II

Polarisation antéro-postérieure du membre

Chapitre II : Polarisation antéro-postérieure du membre

La polarisation antéro-postérieure (ou pré- et post-axiale) des membres est initiée précocement au cours du développement afin de mettre en place le nombre et l'identité des doigts.

I. Centre de signalisation : la zone d'activité polarisante (ZPA)

A la fin des années 1960, des études sur embryon de poulet ont permis d'identifier la ZPA comme le centre de signalisation responsable de la polarisation antéro-postérieure du membre. Cette région mésenchymateuse est située normalement au bord postérieur du bourgeon de membre. Sa transplantation au niveau du bord antérieur du bourgeon de membre est responsable d'une duplication en miroir des doigts (Saunders et al., 1976). Ces observations ont suggéré l'existence d'une molécule secrétée par la ZPA agissant comme un morphogène dont le gradient permet la différenciation des doigts. C'est dans les années 1990 que la molécule signal Sonic HedgeHog (SHH), exprimée spécifiquement par les cellules de la ZPA, a été identifiée comme étant le morphogène responsable de leur activité polarisante (Chang et al., 1994; Riddle et al., 1993). En effet, la transplantation de cellules exprimant *Shh* (Riddle et al., 1993) ou le dépôt d'une bille imprégnée de la protéine (Lopez-Martinez et al., 1995; Yang et al., 1997) dans la partie antérieure du bourgeon de membre reproduit une main en miroir. De plus, l'invalidation de *Shh* chez les modèles animaux résulte en l'absence de développement des doigts, excepté pour le premier rayon qui en est indépendant (Chiang et al., 2001; Chiang et al., 1996) (Figure 19).

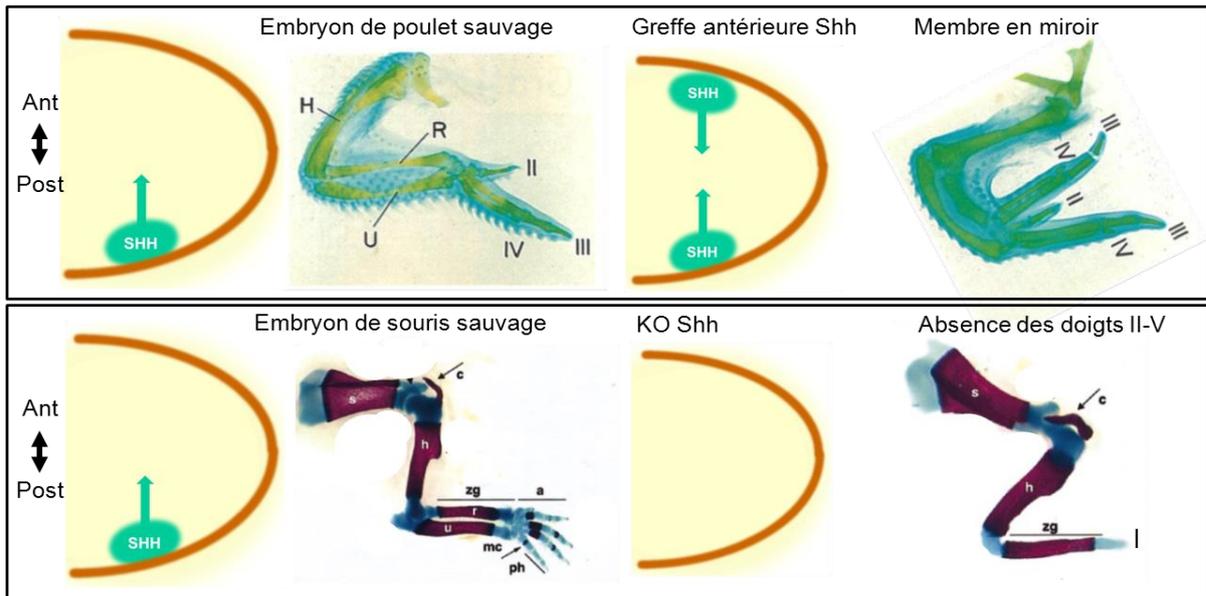


Figure 19 : SHH est le morphogène responsable de la polarisation antéro-postérieure du membre.

Haut : Expérimentations sur l'embryon de poulet. La greffe de cellules exprimant *Shh* au niveau antérieur entraîne le développement d'une extrémité en miroir (d'après Riddle et al., 1993).

Bas : Expérimentations sur l'embryon de souris. Le knock-out de *Shh* résulte en l'absence de développement des doigts, excepté pour le 1^{er} rayon (d'après Chiang et al., 2001).

Ant : antérieur ; Post : postérieur ; s : scapula ; c : clavicule ; h : humerus ; zg : zeugopode ; r : radius ; u : ulna ; a : autopode ; mc : metacarpiens ; ph : phalanges.

II. La voie de signalisation SHH

Les protéines Hedgehog sont une famille de molécules sécrétées agissant localement ou à distance, jouant un rôle dans la croissance et la différenciation des tissus. La voie de signalisation SHH est hautement conservée au cours de l'évolution. Chez les mammifères, c'est au niveau du cil primaire qu'est localisée cette plateforme de signalisation (Figure 20).

En l'absence de son ligand SHH, le récepteur Patched (Ptc1) réprime la protéine signalisatrice Smoothened (Smo) et les facteurs de transcription de la famille Gli (Glioma-associated oncogen homolog) sont clivés sous forme répressive. La liaison de SHH à son récepteur transmembranaire Patched permet l'activation de Smoothened et l'inhibition du clivage des protéines GLI qui sont maintenues sous une forme pleine longueur, activatrice de la transcription.

Chez les vertébrés, on compte 3 protéines Gli (Gli1, 2 et 3). Au niveau du bourgeon de membre, Gli1 est exprimé au niveau du territoire d'expression de *Shh* tandis que Gli2 et 3 sont exprimés dans le territoire complémentaire. Les mutations de *Gli1* et/ou *Gli2* n'entraînent pas de conséquence sur le développement du membre suggérant que ces facteurs de transcription ne sont pas indispensables à la voie de signalisation *Shh* dans cet organe. En

revanche, le KO de *Gli3* et le double KO *Gli3* et *Shh* entraînent une polydactylie (Bai et al., 2002; Hui and Joyner, 1993; Mo et al., 1997; Park et al., 2000).

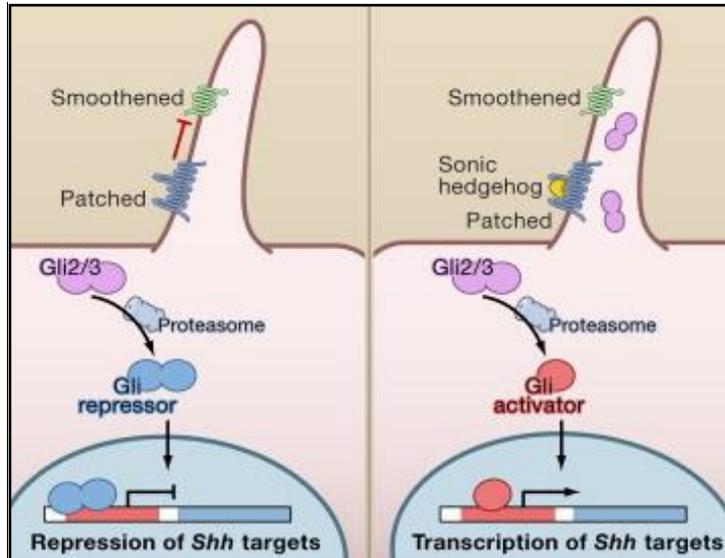


Figure 20 : Voie de signalisation SHH.

Schématisme de la voie de signalisation SHH en l'absence (gauche) ou présence (droite) du ligand. Le cil primaire constitue la plateforme de transduction de cette voie de signalisation qui requiert la participation des protéines de transport intraflagellaire. En l'absence de Sonic hedgehog, Patched réprime Smoothened. Les protéines Gli sous leur forme répressive se lient aux promoteurs des gènes cibles, empêchant leur expression. La présence du ligand Shh recrute Smoothened et Patched au niveau du cil primaire. En réponse à ce stimulus, les protéines Gli sont clivées par le protéasome en leurs isoformes activatrices de la transcription. D'après Gerdes et al., 2009.

L'inactivation de *Shh* à différentes étapes du développement du bourgeon de membre chez la souris a permis de mieux comprendre sa fonction (Zhu et al., 2008). A un stade précoce, *Shh* est un marqueur de différenciation antéro-postérieure, son gradient d'expression déterminant la formation des doigts 5 à 2. En revanche, en l'absence de *Shh*, on observe le développement seul du 1^{er} rayon, suggérant que *Gli3* est suffisant pour son développement (Chiang et al., 2001). Au moins deux modèles ont été proposés pour expliquer le mécanisme par lequel SHH établit l'identité des doigts (McGlinn and Tabin, 2006; Tabin and McMahon, 2008). Le modèle classique suggère que le gradient postéro-antérieur de la concentration de SHH est à l'origine de l'identité des doigts. Les cellules exposées à une forte concentration se différencient en structures postérieures tandis que les cellules exposées à des concentrations moindres vont graduellement contribuer à la formation des structures les plus antérieures. Le modèle alternatif prend en compte non seulement le gradient de concentration de SHH, mais également la durée d'exposition des cellules à ce morphogène (Harfe et al., 2004). Les structures postérieures sont caractérisées par une durée maximale de l'exposition à SHH, tandis que le gradient de concentration détermine les structures antérieures.

III. Régulation de *SHH* au cours du développement du membre

L'expression ectopique de *Shh* dans la partie antérieure du bourgeon de membre est capable d'induire la formation de doigts surnuméraires au niveau antérieur/préaxial (Blanc et al., 2002; Chan et al., 1995; Masuya et al., 1995). Compte tenu de cette observation, l'étude des modèles murins porteurs de polydactylies préaxiales a permis de mieux comprendre la régulation de *Shh* au cours du développement du membre. Ce sont les travaux sur le modèle murin Sasquatch (Ssq) (Lettice et al., 2003; Lettice et al., 2002; Sharpe et al., 1999) qui ont permis de localiser le premier élément régulateur de *Shh* spécifique au membre. Ce modèle murin Ssq, porteur d'une polydactylie préaxiale, a été généré accidentellement lors d'une expérience de transgénèse résultant en une duplication de 20kb au niveau de l'intron 5 du gène *Lmbr1* (limb region 1) (Lettice et al., 2002). Le mutant Ssq présente une expression ectopique antérieure de *Shh* mais également un pattern similaire d'expression du transgène, suggérant la présence d'un élément régulateur de *Shh* au niveau de cet intron.

L'hypothèse de l'implication de *LMBR1* dans le développement du membre a pu rapidement être écartée devant plusieurs observations. Tout d'abord, la dérégulation de son expression chez l'embryon de poulet n'interfère pas avec le développement du membre (Maas and Fallon, 2004). De plus, aucune mutation de ce gène n'a été mise en évidence chez les patients porteurs d'une polydactylie préaxiale (Lettice et al., 2002; Li et al., 2009). En revanche, des délétions étendues du gène entraînent des anomalies des membres, suggérant que sa séquence codante n'est pas directement impliquée dans leur développement (Clark et al., 2000; Ianakiev et al., 2001). Afin de démontrer que la mutation de l'intron 5 du gène *Lmbr1* est effectivement responsable d'une altération de la régulation de *Shh*, des modèles murins porteurs en *cis* de la mutation *Lmbr1* et d'une délétion de *Shh* ont été générés (Lettice et al., 2002; Sagai et al., 2004). Ces souris présentent un phénotype normal, démontrant l'action en *cis* de cet élément régulateur, nommé initialement MFCS1 (Mammal-Fish Conserved Sequence 1) puis ZRS (ZPA regulatory sequence).

III.1 La ZRS (ZPA regulatory sequence)

L'étendue de la ZRS a pu être précisée par une approche de génomique comparative entre plusieurs espèces, mettant en évidence un domaine hautement conservé d'environ 800 pb des vertébrés aux poissons. Cette région est en revanche absente chez les reptiles et amphibiens qui ne possèdent pas de membres. Elle est localisée à environ 1 Mb en amont du gène *SHH* chez l'homme (Figure 21). Elle interagit avec le promoteur de *SHH* par la

formation d'une boucle chromatinienne. Cet élément régulateur comporte deux régions fonctionnelles. Le domaine situé en 5' contrôle l'activité spatio-temporelle de l'élément tandis que le domaine situé en 3' est impliqué dans la modification de la conformation chromatinienne nécessaire à son activité (Lettice et al., 2014).

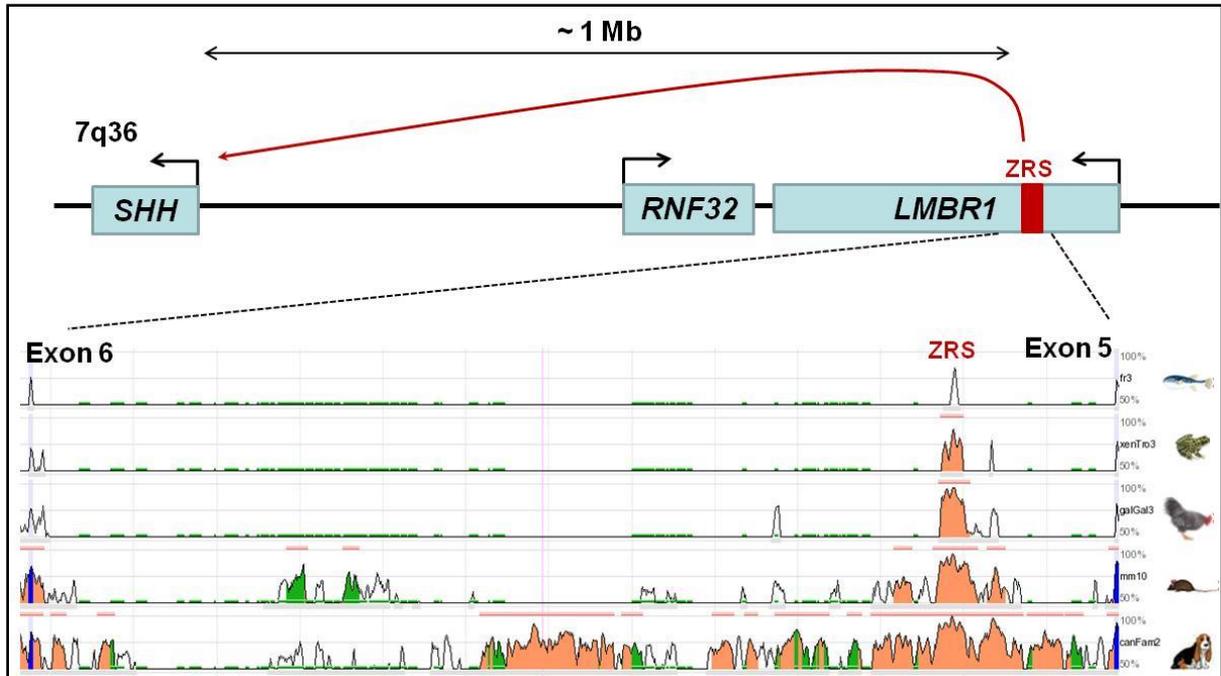


Figure 21 : Structure génomique du locus 7q36 et conservation inter-espèces de la ZRS.

A : Structure génomique du locus 7q36 comprenant *SHH* et la ZRS, élément régulateur spécifique du développement du membre. La ZRS est localisée au sein de l'intron 5 du gène *LMBR1*, à environ 1 Mb en amont de *SHH*. B : Alignement inter-espèces de l'intron 5 du gène *LMBR1* montrant une conservation de la région correspondant à la ZRS. Modifié d'après Albuissou et al., 2011.

L'action à longue distance de la ZRS est probablement un paramètre crucial dans la régulation de *SHH*, cette distance génétique étant hautement conservée au cours de l'évolution. Les mécanismes permettant à la ZRS de réguler *SHH* spécifiquement dans les membres sont mal connus. Deux étapes indépendantes ont été décrites : tout d'abord l'interaction physique entre la ZRS et le promoteur de *Shh*, puis la délocalisation chromatinienne du locus *Shh* hors de son territoire chromosomique permettant l'activation de son expression (Amano et al., 2009). Ainsi, on distingue trois conformations possibles au niveau chromatinien : un état « silencieux » où il n'y a pas d'interaction entre *Shh* et son enhancer ; un état « intermédiaire » où la ZRS interagit avec le promoteur de *Shh* sans délocalisation hors du territoire chromosomique ; un état « activé » où la délocalisation chromosomique a lieu permettant la transcription de *Shh*. De façon intéressante, chez la souris KO pour ZRS, la délocalisation chromatinienne est perdue alors que l'interaction entre la

région flanquant la ZRS et le promoteur de *Shh* est maintenue (Amano et al., 2009). Ainsi, un autre élément régulateur pourrait être responsable de l'interaction physique entre ZRS et *Shh*.

III.2 Facteurs de transcription impliqués dans la régulation du domaine d'expression de *SHH*

La polarisation antéro-postérieure est déterminée précocement dans le bourgeon de membre par l'activité mutuellement antagoniste de *GLI3* dans la partie antérieure du bourgeon et *HAND2* (Heart And Neural crest Derivates-expressed 2) dans sa partie postérieure (te Welscher et al., 2002) (Figure 22). C'est l'expression de *HAND2* conjointement à celle des gènes situés en 5' du cluster *HOXD* (*5'HOXD*) qui permet l'initiation de l'expression de *SHH* au niveau de la partie postérieure du bourgeon, par fixation directe de ce complexe protéique à la ZRS (Capellini et al., 2006; Galli et al., 2010; Kmita et al., 2005; Zakany et al., 2004). Ainsi, le positionnement correct de la ZPA est déterminé précocement par l'expression de ces facteurs de transcription (Tarchini et al., 2006). Leur expression est inhibée par l'isoforme répressive de *GLI3* dans la région antérieure du bourgeon (Chen et al., 2004; Galli et al., 2010; Kmita et al., 2005; Wang et al., 2000; Zakany et al., 2004).

Ensuite, de multiples autres facteurs de transcription interviennent afin de réguler l'extension du domaine d'expression de *SHH*, certains agissant par liaison directe à la ZRS (Figure 22). L'altération de leur expression entraîne des malformations des membres par dérégulation de la voie *SHH*.

Parmi ceux-ci, le gène *Alx4* est spécifiquement exprimé au bord antérieur du bourgeon de membre et agit comme un répresseur de *SHH*, indépendamment de *GLI3R*. Des délétions ou mutations de *Alx4* sont responsables de l'expression antérieure ectopique de *Shh* et de polydactylie préaxiale chez le modèle murin « Strong luxoid » (Kuijper et al., 2005; Panman et al., 2005; Qu et al., 1998; Takahashi et al., 1998).

Plusieurs facteurs de transcription de la famille ETS (*ETV4*, *ETV5*, *ETS1* et *GABP α*) sont impliqués dans la régulation de l'extension du domaine d'expression de *SHH* (Lettice et al., 2012), par le biais de leur fixation sur la ZRS. *ETV4* et *ETV5* (ETS variant gene) sont exprimés au niveau du mésenchyme distal du bourgeon de membre et maintenus à un fort taux d'expression par les FGFs dans l'ectoderme sus-jacent (Lettice et al., 2012). Ils inhibent l'activité enhancer de la ZRS par liaison directe. L'inactivation de ces facteurs de transcription, ou la mutation de leurs sites de fixation à la ZRS, entraîne une expression ectopique de *SHH* au niveau antérieur et l'apparition d'une polydactylie préaxiale. *ETS1* et

GABP α (GA-Binding Protein transcription factor, alpha subunit) ont en revanche une action antagoniste. L'inactivation de leurs sites de fixation entraîne la réduction du territoire d'expression de *SHH* ; tandis que l'introduction de sites supplémentaires entraîne une extension de son domaine d'expression.

Le facteur de transcription TWIST1 appartient à la famille des bHLH (basic helix-loop-helix). Il forme un hétérodimère avec HAND2 pour sa liaison à l'ADN (Dai et al., 2002; Firulli et al., 2005) et est requis au stade précoce du développement du membre pour l'initiation de l'expression de *SHH* (Zuniga et al., 2002). Il est également impliqué à un stade ultérieur dans la régulation du domaine d'expression de *SHH* (Krawchuk et al., 2010) : dans la région postérieure, il induit les FGFRs permettant l'activation de l'expression de *SHH* ; dans la région antérieure, il induit l'expression des facteurs ALX4 et ETV4/5, permettant la répression de *SHH*.

Enfin, le rôle des facteurs de transcription de la famille GATA a été mis en évidence plus récemment au cours du développement du membre, par l'observation d'un gradient d'expression antéro-postérieur pour *GATA4* et *GATA6* (Karamboulas et al., 2010; Kozhemyakina et al., 2014). L'inactivation conditionnelle de *Gata6* lors du développement du membre chez la souris entraîne une expression ectopique antérieure de *Shh* et de ses cibles transcriptionnelles, responsable d'une polydactylie préaxiale. Inversement, la surexpression de *Gata6* réprime l'expression de *Shh* et entraîne des membres hypoplasiques. *GATA6* apparaît ainsi comme un régulateur essentiel de l'expression de *SHH* au cours du développement du membre. Son action se fait par la fixation directe sur la ZRS et le recrutement de co-facteurs de type FOG (Kozhemyakina et al., 2014).

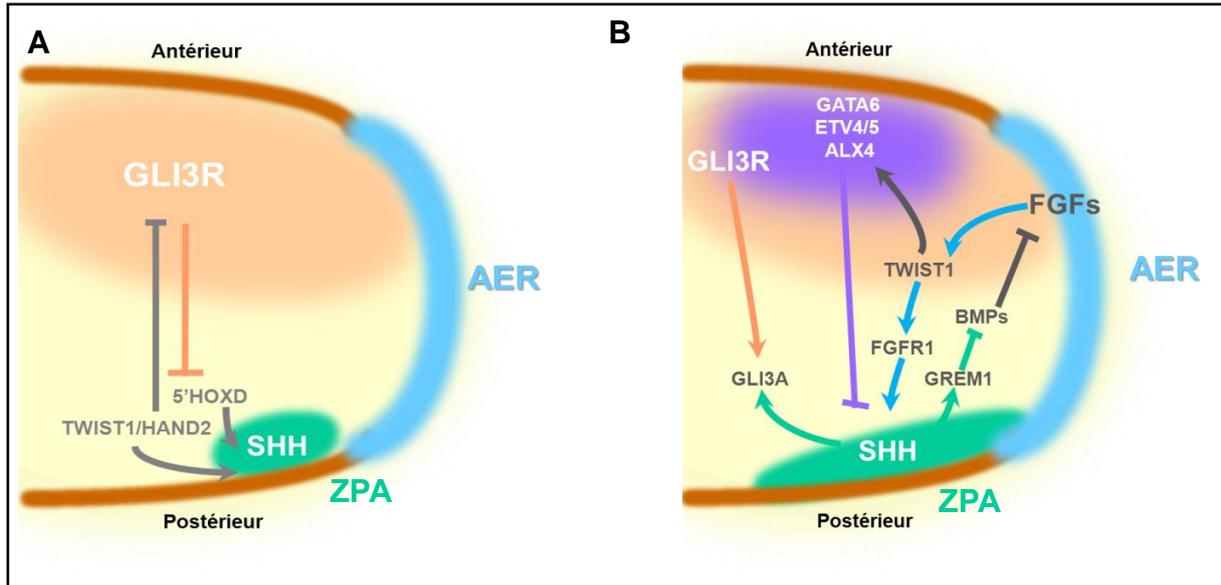


Figure 22 : Représentation schématique de la régulation de *SHH* au cours du développement du membre.

A : Stade d'initiation de la polarisation antéro-postérieure : La polarisation antéro-postérieure est établie précocement par l'antagonisme mutuel entre *HAND2* exprimé dans le mésenchyme postérieur et la forme répressive de *GLI3* (*GLI3R*) exprimée dans le mésenchyme antérieur. *TWIST1* et *HAND2* s'associent en hétérodimères et leur expression dans le mésenchyme postérieur, conjointement à celle des gènes situés en 5' du cluster *HOXD*, est nécessaire à l'induction de *SHH*, et à l'apparition de la *ZPA*.

B : A un stade ultérieur du développement, l'expression de *SHH* est régulée par l'interaction de signaux répresseurs et activateurs. *SHH* est réprimé dans la région antérieure du bourgeon par les facteurs de transcription *ALX4*, *ETV4/5* et *GATA6*. Cette répression est régulée par *TWIST1* qui active leur expression. La signalisation *SHH* entraîne l'activation des protéines *GLI* au niveau postérieur (*GLI3A*). En parallèle, il existe une boucle de rétrocontrôle positif entre la *ZPA/SHH* et l'*AER/FGFs*, faisant intervenir *TWIST1* et la voie des *BMPs*.

IV. Premier modèle d'étude : les polydactylies préaxiales

Les polydactylies correspondent à une altération de la polarisation antéro-postérieure de l'autopode. Elles font partie des malformations des membres d'origine génétique les plus fréquentes, avec une prévalence à la naissance estimée à 0,3-3.6/1000 (Castilla et al., 1973; Mellin, 1963). Il existe une grande variabilité phénotypique ainsi qu'une hétérogénéité génétique. On distingue les polydactylies préaxiales (PPD, Preaxial Polydactyly) (rayon radial surnuméraire), les polydactylies postaxiales (rayon cubital surnuméraire) et les polydactylies mésoaxiales (rayon central surnuméraire) qui sont plus rares. Leur sévérité est définie par le nombre d'éléments squelettiques concernés par la duplication. Dans la grande majorité des cas, la polydactylie est sporadique et unilatérale. En revanche, les formes familiales sont plus volontiers bilatérales et symétriques (Malik et al., 2014).

De nombreuses classifications ont été proposées pour les polydactylies, celle de Temtamy-McKusick étant la plus largement utilisée par les généticiens dysmorphologistes (Temtamy and McKusick, 1978). Une actualisation récente de cette classification a été proposée par Malik (Malik, 2014). Quatre types de PPD y sont décrits (Figure 23).

Sur le plan physiopathogénique, les PPD sont liées à l'expression antérieure ectopique de *SHH*. Les anomalies moléculaires de *GLI3* et de la *ZRS* représentent la majeure partie des étiologies des PPD chez l'homme, confirmant leur rôle crucial dans le contrôle du nombre et de l'identité des doigts via la régulation de l'expression de *SHH* (Tableau 4).

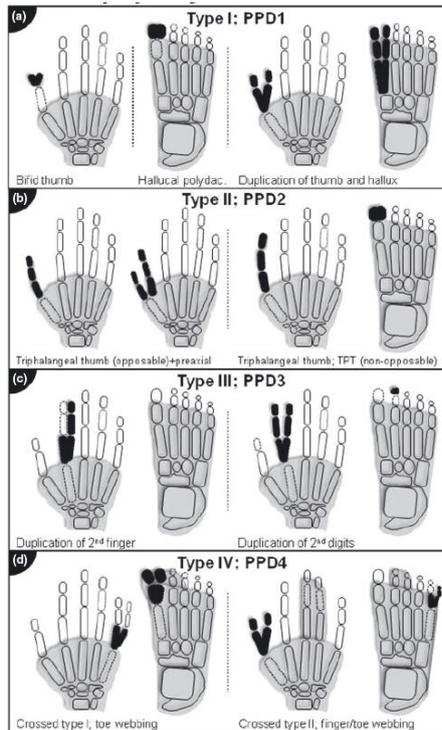


Figure 23 : Représentation des différents types de polydactylie préaxiale.
D'après Malik, 2014.

| OMIM | Type; Symbol | Description | Inheritance | Locus; Gene |
|--------|---|--|--------------------------------|---|
| 174400 | Pre-axial I; PPD1 | Polydactyly of biphalangeal thumb/hallux; hypoplasia of thumb musculature, radial deviation of thumb terminal phalanx | AD, reduced penetrance | 7q36; <i>ZRS/SHH</i> |
| 601759 | Pre-axial hallucal polydactyly | Pre-axial hallucal polydactyly, proximal placement of extra digit | ? | |
| 174500 | Pre-axial II; PPD2; TPT-PS | TPT; duplication of distal thumb phalanx, opposable/non-opposable TPT, duplication of great toes. Other phenotypes: TPT-polysyndactyly syndrome (TPT-PS; webbing of 3–4–5; pre-, post-axial polysyndactyly of toes); tibial hemimelia-TTPS; complex polysyndactyly (TPT-pre-, post-axial polydactyly, syndactyly) | AD, nearly complete penetrance | 7q36; <i>ZRS/SHH</i> |
| 174600 | Pre-axial III; PPD3 | Duplication of index fingers; thumb replaced by one or two triphalangeal digits, distal epiphyses present for metacarpals of accessory digits; occasional polydactyly of first or second toes | AD | |
| 174700 | Pre-axial IV; PPD4; Crossed polydactyly | Polysyndactyly; mild thumb duplication, dysplastic distal thumb phalanges with a central hole; syndactyly of three to four fingers; first or second toe duplication, syndactyly of all toes, crossed type I (post-axial polydactyly in hands and pre-axial in feet); crossed type II (pre-axial polydactyly in hands and post-axial in feet) | AD | 7p14.1; <i>GLI3</i> ; 7q36; <i>ZRS/SHH</i> |

Tableau 4 : Classification des polydactylies préaxiales.
Selon Temtamy and McKusick, 1978, réactualisée par Malik, 2014.

IV.1 Polydactylies préaxiales et anomalies de la ZRS

A l'instar des modèles animaux ayant permis la compréhension de la régulation de *Shh* au cours du développement du membre, la région ZRS chez l'homme a été reconnue comme responsable d'anomalies de la polarisation antéro-postérieure des membres. Il a tout d'abord été mis en évidence une liaison au locus 7q36 dans de grandes familles de PPD autosomique dominante (Heus et al., 1999; Heutink et al., 1994; Hing et al., 1995; Tsukurov et al., 1994; Zguricas et al., 1999). De la même façon, l'observation d'un patient porteur d'une PPD et d'une translocation réciproque dont le point de cassure est localisé dans l'intron 5 du gène *LMBR1* en 7q36 a souligné le rôle crucial de ce locus dans le phénotype (Lettice et al., 2002). L'étude moléculaire de la ZRS dans des familles de PPD a permis d'identifier des mutations ponctuelles ainsi que des duplications de grande taille, responsables d'une expression antérieure ectopique de *SHH* dans le bourgeon de membre (VanderMeer and Ahituv, 2011). Les malformations des membres observées peuvent être limitées aux extrémités (polydactylie préaxiale, syndactylie, polysyndactylies complexes), ou être associées à une atteinte des os longs.

IV.1.1 Mutations gain de fonction de la ZRS

La plupart des mutations gain de fonction de la ZRS ont été décrites chez des patients présentant une PPD de type I ou II (Albuisson et al., 2011; Furniss et al., 2009; Furniss et al., 2008; Gurnett et al., 2007; Lettice et al., 2003; Lettice et al., 2008) (Figure 24).

Un cas particulier est celui de la mutation en position 404, responsable du syndrome mésomélique de Werner (Werner mesomelic syndrome (WMS) ou tibial hypoplasia-polysyndactyly-triphalangeal thumb, OMIM188770). Les malformations des membres sont sévères, associant une PPD de type I ou II à une hypoplasie ou aplasie tibiale (Cho et al., 2013; Werner, 1915; Wiczorek et al., 2010).

IV.1.2 Gain en nombre de copies de la ZRS

Les patients présentant une duplication étendue de la ZRS ont en général des malformations des membres plus sévères de type pouce triphalangé-polysyndactylie ou polysyndactylie de type IV (Sun et al., 2008; Wiczorek et al., 2010; Wu et al., 2009) (Figure 24). De façon non surprenante, un patient présentant une triplication étendue de la ZRS a été décrit avec un phénotype encore plus sévère à type de polysyndactylie de type IV touchant les quatre extrémités (Furniss et al., 2009).

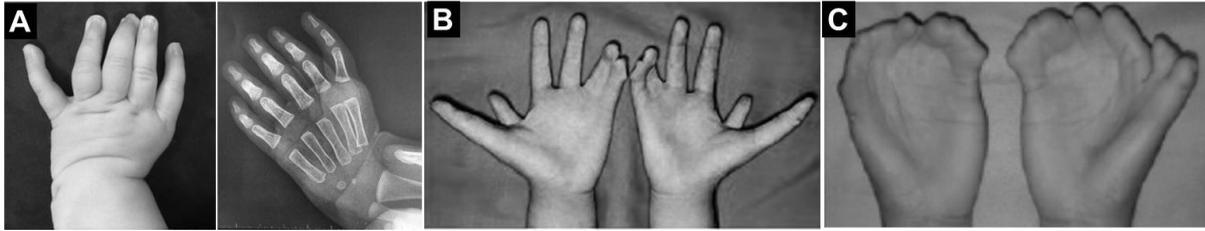


Figure 24 : Variabilité d'expression de la polydactylie des membres supérieurs dans les anomalies de la ZRS.

A : Pouce triphalangé, polydactylie préaxiale de type 2 ; B : Pouce triphalangé – polysyndactylie ; C : Polysyndactylie de type 4 (d'après Sun et al., 2008).

IV.1.3 *Limites des corrélations génotype-phénotype*

Les corrélations génotype-phénotype décrites simplement ci-dessus sont mises en défaut au vu de certaines observations, illustrant la difficulté d'interprétation des anomalies moléculaires concernant en particulier les éléments régulateurs.

En effet, des mutations ponctuelles de la ZRS ont été rapportées chez des familles présentant une polydactylie préaxiale associée à une atteinte radiale (Al-Qattan et al., 2012) ou tibiale (Lettice et al., 2003; Wieczorek et al., 2010), voire à une polydactylie en miroir (Vanlerberghe et al., 2014). De plus, la mutation en position 404 a été rapportée chez des patients présentant uniquement une polydactylie sans atteinte des os longs (Lettice et al., 2003; Wieczorek et al., 2010; Zguricas et al., 1999). Récemment, une microduplication de la ZRS a été identifiée dans 3 familles présentant un syndrome de Laurin-Sandrow (OMIM135750) qui associe une polysyndactylie des mains et/ou des pieds, une duplication en miroir des pieds, une atteinte du tibia et du péroné et un nez caractéristique (Lohan et al., 2014). Pour finir, des cas de pénétrance incomplète ont été décrits (Farooq et al., 2010; Gurnett et al., 2007).

IV.2 **Polydactylies préaxiales et anomalies de *GLI3***

L'interruption du gène *GLI3* (OMIM165240) par des translocations concernant la région 7p13 été initialement rapportée en 1991 dans une série de patients présentant un syndrome de Greig (acro-céphalo-polysyndactylie, OMIM175700) (Vortkamp et al., 1991). Ce syndrome comprend une polydactylie associée à des malformations cranio-faciales. La polydactylie est classiquement préaxiale aux membres inférieurs et postaxiale aux membres supérieurs, réalisant une polydactylie croisée de type I (OMIM174700) (Baraitser et al., 1983). Les anomalies cranio-faciales comprennent une macrocéphalie et un hypertélorisme avec une racine du nez large.

Après la caractérisation moléculaire du syndrome de Greig, *GLI3* a été identifié comme responsable également du syndrome de Pallister-Hall (OMIM146510) qui associe une polydactylie postaxiale, un hamartome hypothalamique, des malformations laryngées et des mal-segmentations pulmonaires (Kang et al., 1997a; Kang et al., 1997b).

Des mutations de *GLI3* ont par ailleurs été décrites dans quelques cas de polydactylie préaxiale de type IV (Fujioka et al., 2005; Radhakrishna et al., 1999). Dans cette forme de polydactylie, on observe aux membres supérieurs une duplication ou un élargissement du pouce et une syndactylie des doigts 3 et 4. Les malformations des pieds consistent en une duplication partielle ou complète du premier ou du deuxième orteil et une syndactylie touchant l'ensemble des orteils. Ce type de polydactylie a été décrit antérieurement dans plusieurs grandes familles (Goodman, 1965; Reynolds et al., 1984). En 1983, Baraitser et coll. ont observé que ces anomalies des membres sont superposables à celles rencontrées dans le syndrome de Greig (OMIM175700), suggérant qu'il puisse s'agir de formes mineures de ce spectre, où les malformations faciales et cérébrales ne seraient pas mises en évidence (Baraitser et al., 1983). Ainsi, la description des PPD de type IV comme une entité non syndromique à part entière est controversée (Biesecker and Johnston, 2005).

Une corrélation génotype-phénotype claire a pu être mise en évidence démontrant une pathogenèse différente dans les deux syndromes : le syndrome de Pallister-Hall est exclusivement associé à des mutations tronquantes dans le tiers moyen du gène tandis que le syndrome de Greig est associé à différents types de mutations inactivatrices (Biesecker and Johnston, 2005; Johnston et al., 2005).

IV.3 Identification d'un nouvel élément cis-régulateur de *SHH* responsable de polydactylie préaxiale autosomique dominante avec hypertrichose

La description de multiples familles où ségrége une polydactylie préaxiale localisée en 7q36 et ne présentant pas d'anomalie moléculaire de la ZRS a fait suspecter l'existence à ce locus d'autres éléments *cis*-régulateurs de *SHH* impliqués dans le développement du membre, non encore identifiés (Albuisson et al., 2011; Gurnett et al., 2007; Lettice et al., 2003; Li et al., 2009). Similairement, plusieurs modèles animaux porteurs d'une anomalie de la polarisation antéro-postérieure des membres ne présentent pas d'anomalie de la ZRS (Dorshorst et al., 2010; Heus et al., 2001; Park et al., 2008).

Afin de mieux comprendre les mécanismes par lesquels *SHH* est régulé au cours du développement du membre chez l'homme, nous avons étudié une large famille où ségrége une polydactylie préaxiale syndromique. Il s'agit d'une nouvelle forme clinique autosomique

dominante de PPD, associée à une hypertrichose. Cette association phénotypique n'a jamais été décrite à notre connaissance et est compatible avec une dérégulation de *SHH*.

Bien que ce phénotype particulier n'ait pas été décrit en association avec les anomalies moléculaires de la ZRS, nous avons débuté la caractérisation moléculaire de cette famille par l'étude de cet élément régulateur. Il s'agit en effet du seul élément régulateur de *SHH* connu comme impliqué dans le développement du membre. Ces analyses n'ont pas permis d'identifier de mutation ponctuelle ou de variation en nombre de copie concernant la ZRS, suggérant qu'un élément régulateur non encore connu puisse être en cause.

Afin de localiser cet élément, une analyse de liaison par SNP-array a été effectuée dans la famille. A cet effet, nous avons sélectionné 14 patients atteints et 2 apparentés sains sur la base d'un phénotypage non équivoque et d'un éloignement maximal sur l'arbre généalogique afin de réduire le nombre d'allèles en commun. Les puces SNPs ont été réalisées en collaboration avec le Département de cytogénétique du Groupe Hospitalier de la Pitié-Salpêtrière à Paris (Dr Boris Keren). L'analyse bioinformatique des résultats nous a permis d'identifier une liaison à un locus unique sur le génome, avec un lod-score supérieur à 3, sur un intervalle de 2,1 Mb. Le phénotype polydactylie préaxiale-hypertrichose est localisé en 7q36, en amont de *SHH*.

Suite à cette localisation, nous avons mis au point la capture de l'ensemble du locus identifié, en vue de son séquençage (puce « à façon » SureSelect, Agilent). Le séquençage haut-débit a été effectué sur séquenceur MiSeq (Illumina), pour l'un des patients atteints ainsi que pour un témoin sain. Les données obtenues ont été alignées sur le design de capture et analysées par le logiciel du fournisseur (SureCall, Agilent). Nous avons sélectionné pour l'analyse bioinformatique les régions hautement conservées au cours de l'évolution, préalablement identifiées sur la base d'une conservation supérieure à 77% pour une taille minimale de 350 pb après alignement inter-espèces des séquences génomiques humaine, de la souris et du poulet (seuil défini par Ovcharenko et al., 2004). Aucune mutation ponctuelle n'a été mise en évidence dans ces régions conservées, couvrant environ 58,3 kb.

Parallèlement, l'analyse visuelle des variations en nombre de copie sur les puces SNPs au niveau du locus candidat, nous a permis de détecter la délétion hétérozygote d'une sonde. Cette délétion était présente chez tous les patients atteints, et absente chez leurs apparentés sains. Les bornes des points de cassure ont pu être déterminées par des analyses en PCR-séquence, permettant d'identifier une délétion de 2026 pb, située environ 240 kb en amont du promoteur de *SHH*, au sein d'un désert génique suspecté contenir plusieurs éléments

régulateurs. Cette délétion n'est pas rapportée dans les bases de données de variations en nombre de copie et n'a pas été retrouvée chez 100 chromosomes de témoins.

Dans l'hypothèse que la région délétée contienne un élément régulateur, nous avons effectué des transfections cellulaires en lignées Caco2 (lignée dérivée d'adénocarcinome colique humain, exprimant *SHH*). Ces expérimentations montrent que la région d'intérêt contient un élément régulateur de type silencer. La délétion de cet élément chez les patients est très probablement responsable d'une dérégulation de *SHH* au cours du développement du membre, à l'origine de la polydactylie préaxiale. Ces résultats sont présentés dans l'article 2 ci-après.

Article 2

Manuscrit soumis (European Journal of Human Genetics)

The disruption of a novel limb *cis*-regulatory element of *SHH* is responsible for autosomal dominant preaxial polydactyly-hypertrichosis

Florence Petit^{1,2,3}, Anne-Sophie Jourdain^{2,4*}, Muriel Holder-Espinasse^{3,5*}, Boris Keren⁶, Joris Andrieux^{2,7}, Martine Duterque-Coquillaud^{3,8}, Nicole Porchet^{3,4}, Sylvie Manouvrier-Hanu^{1,2,3}, Fabienne Escande^{2,4}

¹ Centre de Référence Maladies Rares pour les syndromes malformatifs d'origine génétique, Service de Génétique Clinique, Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU Lille, France

² RADEME (Research team on rare developmental and metabolic diseases), Université Lille 2, France

³ Université Lille 2, France

⁴ Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Centre de Biologie-Pathologie, CHRU Lille, France

⁵ Clinical Genetics Department, Guy's Hospital, London, United Kingdom

⁶ Laboratoire de Cytogénétique, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, CHU Paris, France

⁷ Laboratoire de Génétique Médicale, Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU Lille, France

⁸ UMR8161 CNRS, Institut de Biologie de Lille, Institut Pasteur de Lille, Université Lille 1 et 2, IFR 142, France

* Equally contribution

Corresponding author:

Florence Petit

Service de Génétique Clinique

Chapitre II – Polarisation antéro-postérieure

Hôpital Jeanne de Flandre – CHRU

59037 Lille cedex

France

Tel: 0033320444911

Fax: 0033320444901

Email: florence.petit@chru-lille.fr

Running title: *SHH* deregulation causes polydactyly-hypertrichosis

Abstract

The expression gradient of the morphogen *Sonic Hedgehog* (*SHH*) is crucial in establishing the number and the identity of the digits during anteroposterior patterning of the limb. Its anterior ectopic expression is responsible for preaxial polydactylies. Most of these malformations are due to the gain of function of the Zone of Polarizing Activity Regulatory Sequence, so far the only known limb-specific enhancer of *SHH*. We report a family affected with a novel condition associating preaxial polydactyly and hypertrichosis of the upper back, following an autosomal dominant mode of inheritance. This phenotype is consistent with the deregulation of *SHH* expression during limb and follicle development. In affected members, we identified a 2 kb deletion located approximately 240 kb upstream from the *SHH* promoter. The deleted sequence is capable of repressing the transcriptional activity of the *SHH* promoter *in vitro*, consistent with a silencer activity. We conclude that the deletion of this silencer could be responsible for *SHH* deregulation during development, leading to a preaxial polydactyly-hypertrichosis phenotype.

Key words: preaxial polydactyly, hypertrichosis, SHH regulation, limb development

Introduction

Anteroposterior patterning of the limb is initiated early during development to assign the number and the identity of the digits. The zone of polarizing activity (ZPA) is a mesenchymatous region of the posterior margin and is recognised as centre for this signalling pathway. ZPA cells express the secreted morphogen *Sonic Hedgehog* (*SHH*), encoding a signal protein. Its gradient of expression determines the differentiation of the digits ¹. The anterior ectopic expression of *SHH* is responsible for congenital limb malformations, in particular preaxial polydactyly (PPD) ²⁻⁶. PPD has an incidence of around 1/2000 births. Most PPDs are due to the gain of function (by pathogenic variant or copy-number gain) of a *SHH* cis-regulatory element. This element, the ZPA regulatory sequence (ZRS), has an enhancer activity specific for the developing bud (for review, see ⁷). This enhancer is located around 1Mb upstream of *SHH* (7q36). This distance can slightly differ among vertebrate species while the ordering of genes and regulatory elements is highly conserved, therefore probably playing a crucial role in *SHH* regulation. The existence of other cis-regulatory elements of *SHH* specific for limb development is likely, as numerous PPD families linked to the 7q36 region do not have a ZRS alteration ^{8,9}.

We studied a large family affected with autosomal dominant PPD. Limb malformations were associated with hypertrichosis affecting the upper back. This phenotypic association has not, to our knowledge, been previously reported and we hypothesize that this could be due to *SHH* deregulation. We first confirmed the linkage at the 7q36 locus in this family, performing haplotyping with SNP-arrays. ZRS sequencing and copy number study was normal. Sequencing of evolutionary conserved regions among the candidate locus did not reveal any pathogenic variant. We then identified a 2 kb deletion at long-distance upstream of *SHH*, comprising a silencer. Deletion of this regulatory element could lead to anterior overexpression of *SHH*, therefore causing PPD. Given the role of *SHH* during follicle

morphogenesis and growth¹⁰⁻¹², it is likely that its deregulation is also responsible for the hypertrichosis in this family.

Material and Methods

Patients

Through the Clinical Genetics department of the Lille University Hospital, France, we recruited a large family of European ancestry comprising 25 index cases in 5 generations (pedigree, Figure 1) presenting with preaxial polydactyly and upper back hypertrichosis, following an autosomal dominant mode of inheritance. Phenotypic expressivity was variable among individuals, ranging from triphalangeal thumbs, duplicated thumbs, preaxial extra ray to syndactyly between digits I and II (Table1, Figure 2, Supplementary Figures 1 and 2). All affected members presented with hirsutism, starting as a low posterior hairline and spreading down to the middle of the back (Table 1, Figure 2, Supplementary Figure 3). Written patient consents were obtained prior to the analyses. Standard karyotype was normal in affected individuals.

Array-CGH

We performed array-CGH 44K (Agilent Technologies, Courtaboeuf, France) in one affected member of the family (IV-21), to search for copy number variation, according to the manufacturer protocol. Male genomic DNA was used as a reference in sex-match hybridization and results were analyzed with the CGH analytics software.

ZRS screening

ZRS Sanger sequencing was performed in 18 members of the family (I-1, II-1, II-2, II-3, II-5, III-2, III-3, III-4, III-6, III-9, III-12, III-18, IV-4, IV-5, IV-6, IV-7, IV-19, IV-21.) using 3 couples of primers (primers' sequences are provided in Supplementary Table 1) in order to study the whole ZRS region (chr7.hg19:g.156,583,690-156,584,790). The sequence was

compared to the reference sequence (Ref Seq, hg19, NC_000007.14) using SeqScape software.

In order to study ZRS copy number, we performed a quantitative PCR assay with two couples of primer (primers' sequences are provided in Supplementary Table 1). The reaction was performed with the SYBR® Green technology according to manufacturer's protocol (Applied Biosystems®). Quantification of the target sequences was normalised to an assay from *RNAse P* gene, and the relative copy number was determined on the basis of the comparative $\Delta\Delta C_t$ method using a normal control DNA as the calibrator.

Haplotyping by SNP-arrays

We performed SNP-arrays (CytoSNP-12 v2.1, Illumina, San Diego, USA) in 16 family members (I-1, II-1, II-2, II-3, II-3's partner, III-2, III-3, III-9, III-12, III-20, IV-3, IV-4, IV-5, IV-7, IV-19, IV-21). Samples were processed according to the manufacturer's protocol, and results were analyzed using Illumina GenomeStudio software. Lod-scores were calculated using Merlin software¹³ with the following parameters: autosomal dominant model, 100% penetrance, frequency of disease 0.0001, rate of *de novo* mutation 0.0001 in both sexes).

Evolutionary conserved regions study

To identify the evolutionary conserved regions (ECRs) comprised in the candidate locus, we performed human genomic sequence alignment with the orthologous sequences of mice and chicken using the browser <http://ecrbrowser.dcode.org> with the following parameters: minimal ECR length 350 bp, minimal ECR similarity 77% (threshold defined in¹⁴). The ECRs were sequenced in an affected individual using a custom capture design SureSelect (Agilent Technologies) on the MiSeq (Illumina), according to the manufacturers' protocols. The design was performed with the SureDesign software and variant calling with the SureCall software (Agilent Technologies).

Plasmid constructs

Constructs were generated by inserting target sequence into the pLS_Prom_SHH vector (pLightSwitch_Prom_SHH vector, #S716462, Active Motif, La Hulpe, Belgium). This plasmid contains a minimal *SHH* promoter and the Renilla luciferase reporter gene. The 2026 bp sequence of interest was obtained by PCR on genomic DNA and cloned upstream of the *SHH* promoter in the pLS_Prom_SHH vector using the MluI restriction site (primers' sequences are provided in Supplementary Table 1). Two constructs were generated, with forward (pLS_Prom_SHH_2026F) and reverse pLS_Prom_SHH_2026R) orientation of the 2026 bp sequence.

As controls, we used the pLS_Prom_SHH vector and the pLS_EmptyProm (pLightSwitch_EmptyProm, #S790005, Active Motif, La Hulpe, Belgium). The latter do not contains any promoter upstream of the Renilla luciferase reporter gen and serves as a measure of background signal in the experiment.

In order to normalize with the transfection efficiency, we performed co-transfections with the pGL3 Promoter Vector (#E1761, Promega, France) that contains a SV40 promoter and the Firefly luciferase reporter gene.

Cell culture and luciferase assay

Cells of the human colon adenocarcinoma cell line Caco2 were maintained in 20%FBS/MEM containing 110 mg/L sodium pyruvate, 0.1 mM non-essential amino acids, 1% glutamine and 0.5% of Penicillin-Streptomycin. Cells at 60-70% confluence were transfected with 0.4µg Renilla luciferase reporter constructs and 50ng Firefly luciferase reporter plasmid using the Effectene transfection reagent (Qiagen, Courtaboeuf, France) in 6-well plates, according to the manufacturer's protocol. After 48h of transfection, cells were washed twice with phosphate buffer saline and lysed with Passive Lysis Buffer (Promega, France). Renilla and Firefly luciferase reporter activities were assessed with the Dual-Luciferase® Reporter Assay (Promega, France) according to the manufacturer's protocol, using the Mithras LB 940

Multimode Microplate Reader (Berthold Technologies, Thoiry, France). The Renilla/Firefly luciferase activity ratio for each construct was compared to the pLS_Prom_SHH construct. The transfections were performed in triplicate, three times.

Results

ZRS study is normal in PPD-hypertrichosis

ZRS Sanger sequencing in 18 affected individuals of the family was compared to the ZRS reference sequence, showing no pathogenic variant. We found the polymorphic variant rs10254391 heterozygous in 13 and homozygous in 5 individuals (minor allele frequency in dbSNP: 38%).

Quantitative PCR assay performed for 7 affected members of the family showed 2 copies of the limb-specific enhancer (Supplementary Figure 4).

PPD-hypertrichosis is linked to the 7q36 locus

We performed array-CGH 44K in one affected member of the family. No copy number variation was identified at the mean resolution of 150kb. In order to map the PPD-hypertrichosis condition, we performed whole genome haplotyping by SNP-arrays in 16 individuals from the family. Results showed linkage to a single locus in 7q36 (Lod-score>3). There was no other locus in the genome with positive lod-score (Supplementary Figure 5). The candidate region spans 2.1 Mb between rs2305944 and rs4101 (chr7.hg19:g.155809123_157947033), containing 15 genes (Figure 3). It is located upstream of the *SHH* gene and encompasses its limb-specific enhancer, the ZPA Regulatory Sequence (ZRS).

The candidate locus contains several ECRs

The phenotypic association of preaxial polydactyly and hypertrichosis is highly suggestive of *SHH* deregulation. Given that the ZRS study (sequencing and quantitative PCR) was normal

in this family, we hypothesized that another *SHH* regulatory element located at 7q36 could be disrupted. In this hypothesis, we identified 66 ECRs (including the ZRS) in the candidate locus of 2.1 Mb (Supplementary Table 2). Some of these have already been described and studied in preaxial polydactyly families^{8,9}. Sequencing of these regions in one individual affected with PPD-hypertrichosis (individual IV-21) revealed no pathogenic variant.

Identification of a 2 kb deletion segregating with the phenotype

The data generated by SNP-arrays in the candidate region of 2.1 Mb were reanalysed for copy-number variation. We identified a heterozygous deletion of rs4296934 located in the gene desert upstream of *SHH*, at approximately 240 kb from its promoter (Figure 3). This deletion was confirmed by long-range PCR-sequencing (Figure 3) and spans 2026 bp (chr7.hg19:g.155845627_155847652). This deletion segregates with the phenotype in the family with complete penetrance. The deletion was absent from 100 control chromosomes and no identical copy number variation was reported in the Database of Genomic Variants (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>). We therefore hypothesize that this deletion could be responsible for the PPD-hypertrichosis phenotype by the deregulation of *SHH* expression.

Structure of the 2 kb sequence

After mapping the PPD-hypertrichosis phenotype to the 7q36 locus, we identified a 2026 bp region deleted in the family. Inter-species alignments show that the wild-type sequence is highly conserved between human and rhesus primate, and partially conserved in mouse, dog, chicken and zebrafish (Supplementary Figure 5). In the less conserved parts of the region, 3 repetitive elements are located: one DNA repeat (Mer112) of 113 bp, one simple repeat of 76 bp and one *Alu* sequence of 298 bp (Supplementary Figure 6). Besides, the 2026 bp sequence contains numerous predicted binding sites for transcription factors (MatInspector®, Genomatix). We selected the sites for which the matrix similarity was over 95% and filtered the transcription factors for which less than three binding sites were predicted. With these

criteria, 28 transcription factors have three or more predicted binding sites on the sequence (Supplementary Table 3). Regarding these data, we hypothesize that this region could possibly contain a regulatory element.

The 2 kb deletion contains a cis-regulatory element

To elucidate possible regulatory effect of the 2026 bp element, a functional study was initiated in cell culture. The 2026 bp sequence was subcloned into the expression vector pLS_Prom_SHH. Since the human colon adenocarcinoma Caco2 cell line expresses *SHH*, we therefore performed transfections in these cells with the construct containing the 2026 bp sequence in forward (pLS_Prom_SHH_2026F) and reverse orientation (pLS_Prom_SHH_2026R). Both constructs shows an approximately 2-fold decrease of the relative reporter activity, as compared to the control vector without regulatory element pLS_Prom_SHH (Figure 4). Thus, the 2026 bp sequence contains an element capable of repressing in *cis* the transcriptional activity of the *SHH* promoter, consistent with a silencer activity.

Discussion

We report a large family affected with preaxial polydactyly and upper back hypertrichosis, with autosomal dominant inheritance and variable expressivity. To our knowledge, this phenotypic association has never been described before. The main differential diagnoses are the non-syndromic PPDs (Supplementary Table 4), as the hypertrichosis of the back can remain unnoticed or non-considered, especially in males. Non-syndromic PPDs are caused by gain-of-function mutations or copy number gain of the ZRS, a limb-specific enhancer of *SHH*. Besides, some cases of non-syndromic PPDs have been reported in association with *GLI3* mutations^{15,16}. *GLI3* is the gene responsible for Greig cephalopolysyndactyly syndrome (GCPS, OMIM#175700) and Pallister-Hall Syndrome (PHS, OMIM#146510). GCPS usually

presents with crossed polysyndactyly (preaxial polydactyly of lower limbs and post-axial polydactyly of upper limbs), macrocephaly, corpus callosum agenesis and sometimes craniosynostosis. In PHS, the polydactyly is usually meso-axial or postaxial and is associated with hypothalamic hamartoma. It is debated if *GLI3* could effectively be responsible for non-syndromic polydactyly or if this is only a variable expressivity of GCPS or PHS¹⁷. Hypertrichosis has not been reported in these *GLI3*-associated syndromes, except for some cases harbouring 7p13 microdeletions involving *GLI3*¹⁸. This feature is therefore likely due to the contiguous gene deletion.

Given the central role of *SHH* in the anteroposterior polarization of the limb and in the follicle morphogenesis¹⁰⁻¹², we hypothesized that the phenotype PPD-hypertrichosis is consistent with a deregulation of *SHH* expression. No pathogenic variant or copy-number variation was identified in the ZRS, which is so far the only known limb-specific enhancer of *SHH*. Nevertheless, other limb-specific cis-regulatory elements of *SHH* are likely, since numerous PPD families with linkage at 7q36 do not present with ZRS alteration^{8,9}. The identification of a 4-6 kb deletion between ZRS and *SHH* in acheiropodia, which phenotype is consistent with the loss of *SHH* expression in the developing limb, is a further clue. In this PPD-hypertrichosis family, linkage at the 7q36 locus upstream of the *SHH* gene was confirmed by SNP-arrays haplotyping. We identified the loss of a 2026 bp region in the gene desert 240 kb from the *SHH* promoter. This region, deleted in our patients, is partially conserved among species and absent from the Database of Genomic Variants and in 100 controls tested. Transfection experiments showed that the deleted sequence contains an element capable of repressing the transcriptional activity of the *SHH* promoter, consistent with a silencer activity. Therefore, the deletion of this novel cis-regulatory element in our patients could explain *SHH* over-expression during limb development, leading to preaxial polydactyly. This element may

interact with the *SHH* promoter located at long distance by formation of a chromosome loop, similarly to the ZRS enhancer¹⁹.

In silico analysis of the candidate sequence shows numerous predicted binding sites for transcription factors. Among these, 4 transcription factors are good candidates to explain the regulatory activity of our sequence, given the literature data. ETS and HAND transcription factors families have respectively 6 and 4 predicted binding sites on the sequence that is deleted in the PPD-hypertrichosis family. These factors, in particular ETS1/ETV4/ETV5 and HAND2, are known to play central roles in the SHH spatial pattern during limb development *via* their direct binding to the ZRS^{20,21}. Furthermore, variants of ETV4/5 binding sites on the ZRS are responsible for its ectopic activity leading to preaxial polydactyly²¹. To our knowledge, these transcription factors families are not known to be involved in follicle morphogenesis or growth.

Binding sites for GATA and NKX family factors are over-represented on the 2 kb sequence and especially along its more evolutionary conserved part, with respectively 16 and 33 predicted sites, suggesting a “homotypic clustering”. The latter, corresponding to the enrichment of multiple binding sites for the same transcription factor, is a common feature of cis-regulatory elements in vertebrate and invertebrate²². These two families of transcription factors are known to act synergistically to regulate tissue-specific gene expression during development²³. This co-regulation activity has been well described for GATA4-NKX2.5 in cardiogenesis²⁴⁻²⁶ and for GATA6-NKX2.1 in lung development^{23,27}. To our knowledge, no major role in limb development has been described for NKX factors so far. Interestingly, it has recently been demonstrated that *Gata4* and *Gata6* are differentially expressed in the anterior mesenchyme of the developing limb buds in mice²⁸. *Gata6* represses ectopic expression of *Shh* in the anterior region of the limb buds by directly binding to the ZRS. The limb bud-specific *Gata6* deletion results in ectopic expression of *Shh* and its target genes in

the anterior margin, therefore resulting in preaxial polydactyly. A simultaneous deletion of *Gata6* and *Shh* rescues the phenotype. Conversely, forced-expression of *Gata6* throughout the limb bud down-regulates *Shh*, resulting in a decreased number of digits. Therefore, Gata transcription factors are crucial negative regulators of ectopic *Shh* expression during limb development. Furthermore, these factors contribute to transcriptional regulation by facilitating chromosome looping, thereby mediating long-range gene regulation²⁹. Given these observations, we hypothesize that GATA transcription factors, and in particular GATA6, could bind to the regulatory element deleted in the PPD-hypertrichosis patients, conferring its silencing activity.

Given the role of SHH during follicle morphogenesis and growth, it is likely that its deregulation is also responsible for the hypertrichosis in the family. Wnt/ β -catenin signalling relayed through *Shh* and *Bmp* signals is the principal regulatory mechanism of hair follicle development³⁰. Studies in mice showed that follicle morphogenesis and hair growth is altered when *Shh* is either down-regulated¹⁰⁻¹² or over-expressed³¹. This pathway is deregulated by knock-out of *Gata3* in mice, the animals showing abnormal hair formation³². Therefore, GATA transcription factors are candidates for interacting with the regulatory element identified, responsible for deregulation of *SHH* in the developing limb and hair follicle.

Chromatin immunoprecipitation experiments may be conducted to identify which transcription factors are involved in the regulatory activity of the 2 kb element described. Similarly to the ZRS, the interaction between this cis-regulatory element and the SHH promoter located at a 240 kb distance could occur by chromosomal looping. Chromosome conformation capture experiments may be performed to validate this hypothesis. PPD-hypertrichosis phenotype has never been described before and is therefore presumed to be an extremely rare condition. Nevertheless, study of this newly described *SHH* limb regulatory

element in families affected with autosomal dominant preaxial polydactyly would be interesting.

Acknowledgements

We gratefully thank the cell culture platform of the Center of Biology-Pathology, Lille University Hospital (France) for their technical assistance in cell culturing and transfection experiments. This work was supported by funds from Lille University Hospital (France).

Conflict of Interest Statement: The authors declare no conflict of interest.

References

- 1 Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C: Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 1993; **75**: 1401-1416.
- 2 Heus HC, Hing A, van Baren MJ *et al*: A physical and transcriptional map of the preaxial polydactyly locus on chromosome 7q36. *Genomics* 1999; **57**: 342-351.
- 3 Heutink P, Zguricas J, van Oosterhout L *et al*: The gene for triphalangeal thumb maps to the subtelomeric region of chromosome 7q. *Nat Genet* 1994; **6**: 287-292.
- 4 Hing AV, Helms C, Slaugh R *et al*: Linkage of preaxial polydactyly type 2 to 7q36. *Am J Med Genet* 1995; **58**: 128-135.
- 5 Tsukurov O, Boehmer A, Flynn J *et al*: A complex bilateral polysyndactyly disease locus maps to chromosome 7q36. *Nat Genet* 1994; **6**: 282-286.
- 6 Zguricas J, Heus H, Morales-Peralta E *et al*: Clinical and genetic studies on 12 preaxial polydactyly families and refinement of the localisation of the gene responsible to a 1.9 cM region on chromosome 7q36. *J Med Genet* 1999; **36**: 32-40.
- 7 VanderMeer JE, Ahituv N: cis-regulatory mutations are a genetic cause of human limb malformations. *Dev Dyn* 2011; **240**: 920-930.
- 8 Albuisson J, Isidor B, Giraud M *et al*: Identification of two novel mutations in Shh long-range regulator associated with familial pre-axial polydactyly. *Clin Genet* 2011; **79**: 371-377.
- 9 Li H, Wang CY, Wang JX *et al*: Mutation analysis of a large Chinese pedigree with congenital preaxial polydactyly. *Eur J Hum Genet* 2009; **17**: 604-610.
- 10 Chiang C, Swan RZ, Grachtchouk M *et al*: Essential role for Sonic hedgehog during hair follicle morphogenesis. *Dev Biol* 1999; **205**: 1-9.
- 11 St-Jacques B, Dassule HR, Karavanova I *et al*: Sonic hedgehog signaling is essential for hair development. *Curr Biol* 1998; **8**: 1058-1068.

- 12 Wang LC, Liu ZY, Gambardella L *et al*: Regular articles: conditional disruption of hedgehog signaling pathway defines its critical role in hair development and regeneration. *J Invest Dermatol* 2000; **114**: 901-908.
- 13 Abecasis GR, Cherny SS, Cookson WO, Cardon LR: Merlin--rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat Genet* 2002; **30**: 97-101.
- 14 Ovcharenko I, Stubbs L, Loots GG: Interpreting mammalian evolution using Fugu genome comparisons. *Genomics* 2004; **84**: 890-895.
- 15 Fujioka H, Ariga T, Horiuchi K *et al*: Molecular analysis of non-syndromic preaxial polydactyly: preaxial polydactyly type-IV and preaxial polydactyly type-I. *Clin Genet* 2005; **67**: 429-433.
- 16 Radhakrishna U, Bornholdt D, Scott HS *et al*: The phenotypic spectrum of GLI3 morphopathies includes autosomal dominant preaxial polydactyly type-IV and postaxial polydactyly type-A/B; No phenotype prediction from the position of GLI3 mutations. *Am J Hum Genet* 1999; **65**: 645-655.
- 17 Biesecker LG, Johnston J: Syndromic and non-syndromic GLI3 phenotypes. *Clin Genet* 2005; **68**: 284; author reply 285.
- 18 Kroisel PM, Petek E, Wagner K: Phenotype of five patients with Greig syndrome and microdeletion of 7p13. *Am J Med Genet* 2001; **102**: 243-249.
- 19 Amano T, Sagai T, Tanabe H, Mizushina Y, Nakazawa H, Shiroishi T: Chromosomal dynamics at the Shh locus: limb bud-specific differential regulation of competence and active transcription. *Dev Cell* 2009; **16**: 47-57.
- 20 Galli A, Robay D, Osterwalder M *et al*: Distinct roles of Hand2 in initiating polarity and posterior Shh expression during the onset of mouse limb bud development. *PLoS Genet* 2010; **6**: e1000901.

- 21 Lettice LA, Williamson I, Wiltshire JH *et al*: Opposing functions of the ETS factor family define Shh spatial expression in limb buds and underlie polydactyly. *Dev Cell* 2012; **22**: 459-467.
- 22 Gotea V, Visel A, Westlund JM, Nobrega MA, Pennacchio LA, Ovcharenko I: Homotypic clusters of transcription factor binding sites are a key component of human promoters and enhancers. *Genome Res* 2010; **20**: 565-577.
- 23 Zhang Y, Rath N, Hannenhalli S *et al*: GATA and Nkx factors synergistically regulate tissue-specific gene expression and development in vivo. *Development* 2007; **134**: 189-198.
- 24 Durocher D, Charron F, Warren R, Schwartz RJ, Nemer M: The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *Embo J* 1997; **16**: 5687-5696.
- 25 Shiojima I, Komuro I, Oka T *et al*: Context-dependent transcriptional cooperation mediated by cardiac transcription factors Csx/Nkx-2.5 and GATA-4. *J Biol Chem* 1999; **274**: 8231-8239.
- 26 Molkenkin JD, Antos C, Mercer B, Taigen T, Miano JM, Olson EN: Direct activation of a GATA6 cardiac enhancer by Nkx2.5: evidence for a reinforcing regulatory network of Nkx2.5 and GATA transcription factors in the developing heart. *Dev Biol* 2000; **217**: 301-309.
- 27 Liu C, Glasser SW, Wan H, Whitsett JA: GATA-6 and thyroid transcription factor-1 directly interact and regulate surfactant protein-C gene expression. *J Biol Chem* 2002; **277**: 4519-4525.
- 28 Kozhemyakina E, Ionescu A, Lassar AB: GATA6 is a crucial regulator of Shh in the limb bud. *PLoS Genet* 2014; **10**: e1004072.

- 29 Chen Y, Bates DL, Dey R *et al*: DNA binding by GATA transcription factor suggests mechanisms of DNA looping and long-range gene regulation. *Cell Rep* 2012; **2**: 1197-1206.
- 30 Suzuki K, Yamaguchi Y, Villacorte M *et al*: Embryonic hair follicle fate change by augmented beta-catenin through Shh and Bmp signaling. *Development* 2009; **136**: 367-372.
- 31 Ellis T, Smyth I, Riley E *et al*: Overexpression of Sonic Hedgehog suppresses embryonic hair follicle morphogenesis. *Dev Biol* 2003; **263**: 203-215.
- 32 Kurek D, Garinis GA, van Doorninck JH, van der Wees J, Grosveld FG: Transcriptome and phenotypic analysis reveals Gata3-dependent signalling pathways in murine hair follicles. *Development* 2007; **134**: 261-272.

Titles and legends to figures

Figure 1: Pedigree of the family affected with autosomal dominant preaxial polydactyly and upper back hypertrichosis. Individuals available for phenotyping and genotyping are indicated with an asterisk.

Figure 2: Clinical and radiological findings in patients affected with preaxial polydactyly and hypertrichosis. A: Hand malformations are variable, ranging from triphalangeal thumb, biphlangeal partly duplicated thumb, preaxial extra ray to syndactyly between digits I and II. B: Foot malformations are variable, ranging from large to duplicated hallux, potentially associated with syndactyly between the first and second rays. C: Pictures showing upper back hypertrichosis, starting as a low posterior hairline and spreading down to the middle of the back. More clinical pictures are available in Supplementary Figures 1, 2, 3.

Figure 3: A: Locus for PPD-hypertrichosis identified by SNP-arrays haplotyping (delimited by the dotted line). The region spans 2.1 Mb at 7q36 (chr7.hg19:g.155809123_157947033). It is located upstream of the *SHH* gene and encompasses the ZRS. B: SNP array profile for the linkage region showing the heterozygous deletion of rs4296934 (arrow). C: Sanger sequencing of the deletion breakpoint. Identification of a heterozygous 2026 bp deletion in the gene desert upstream *SHH* segregating in affected individuals.

Figure 4: Functional study of the 2026 bp element. Relative luciferase expression was examined in Caco2 cells using a reporter construct pLS_Prom_SHH_2026 containing the 2026 bp sequence that is deleted in patients affected with PPD-hypertrichosis, in forward (F) or reverse (R) orientation. Reporter activity was normalised to the pLS_Prom_SHH control vector that do not contains any regulatory element upstream of the *SHH* promoter. In presence

of the 2026 bp sequence and in absence of the promoter, the reporter activity is significantly reduced (****, $p < 0.0001$). Error bars represent the SD obtained from 3 independent experiments performed in triplicates.

Table 1: Clinical summary of patients affected with PPD-hypertrichosis. ND: not determined.

Supplementary Figure 1: Pictures and x-rays of hand malformations. Phenotype is variable, ranging from triphalangeal thumb, biphangeal partly duplicated thumb, preaxial extra ray to syndactyly between digits I and II. Most patients have benefited from surgical correction of the hand malformation.

Supplementary Figure 2: Pictures and x-rays of foot malformations. Phenotype was variable, ranging from large to duplicated hallux, potentially associated with syndactyly between first and second rays.

Supplementary Figure 3: Pictures showing upper back hypertrichosis, starting as a low posterior hairline and spreading down to the middle of the back.

Supplementary Figure 4: Results of the ZRS quantitative PCR study showing no copy number variation. The dark and grey bars correspond to the two sets of primers. Results shown are for patient IV-21 and a heterozygous deleted control.

Supplementary Figure 5: Lod-Scores results after linkage analysis in the polydactyly-hypertrichosis family showing that the condition is mapped to the 7q36 locus (indicated by the arrow).

Supplementary Figure 6: Structure of the 2026 bp sequence that is deleted in PPD-hypertrichosis family (chr7.hg19:g.155845627_155847652). Up: Location of the predicted binding sites for NKX, GATA, ETS, and HAND transcription factors families. Middle: Multi-alignments showing inter-species conservation. Bottom: Location and nature of repetitive elements along the sequence.

Supplementary Table 1: Sequence of primers used for cloning the 2026 bp region.

Supplementary Table 2: Evolutionary conserved regions among the candidate locus for polydactyly-hypertrichosis family (chr7.hg19:g.155809123_157947033). ECR: evolutionary conserved region; mm10: mouse; galGal3: chicken.

Supplementary Table 3: Occurrence of transcription factors binding sites in the 2026 bp sequence, predicted *in silico* by the MatInspector® software (Genomatix). Only transcription factors with more than two binding sites on the sequence and a matrix similarity over 95% are cited.

Supplementary Table 4: Differential diagnoses for the PPD-hypertrichosis syndrome.

AD: Autosomal Dominant.

Figure 1

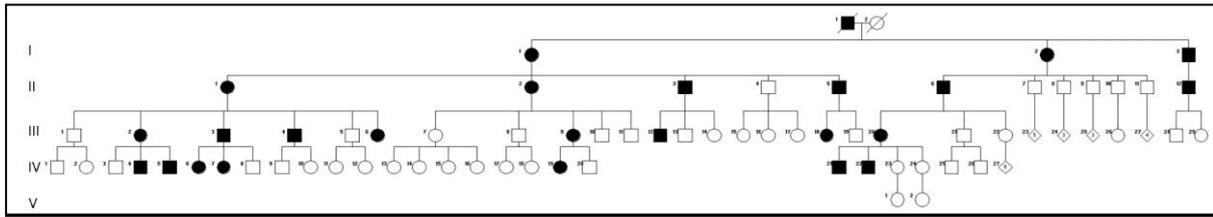


Figure 2

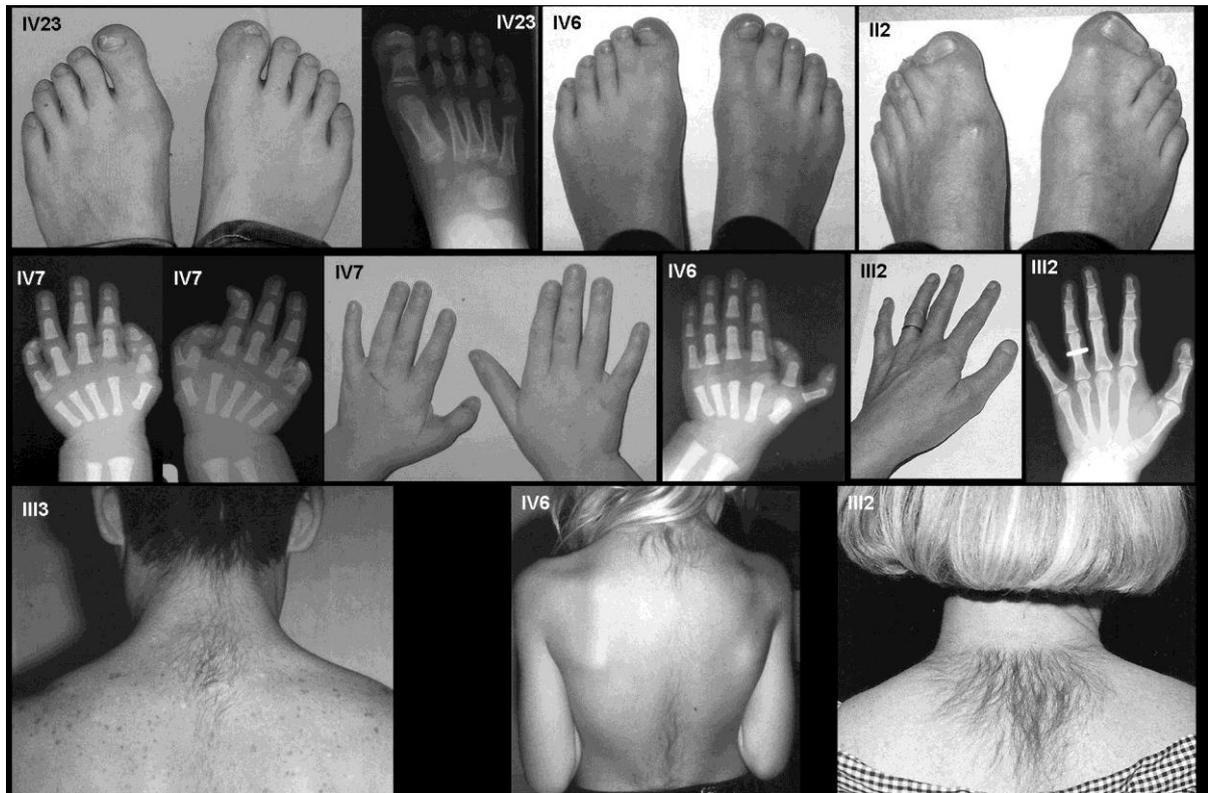


Figure 3

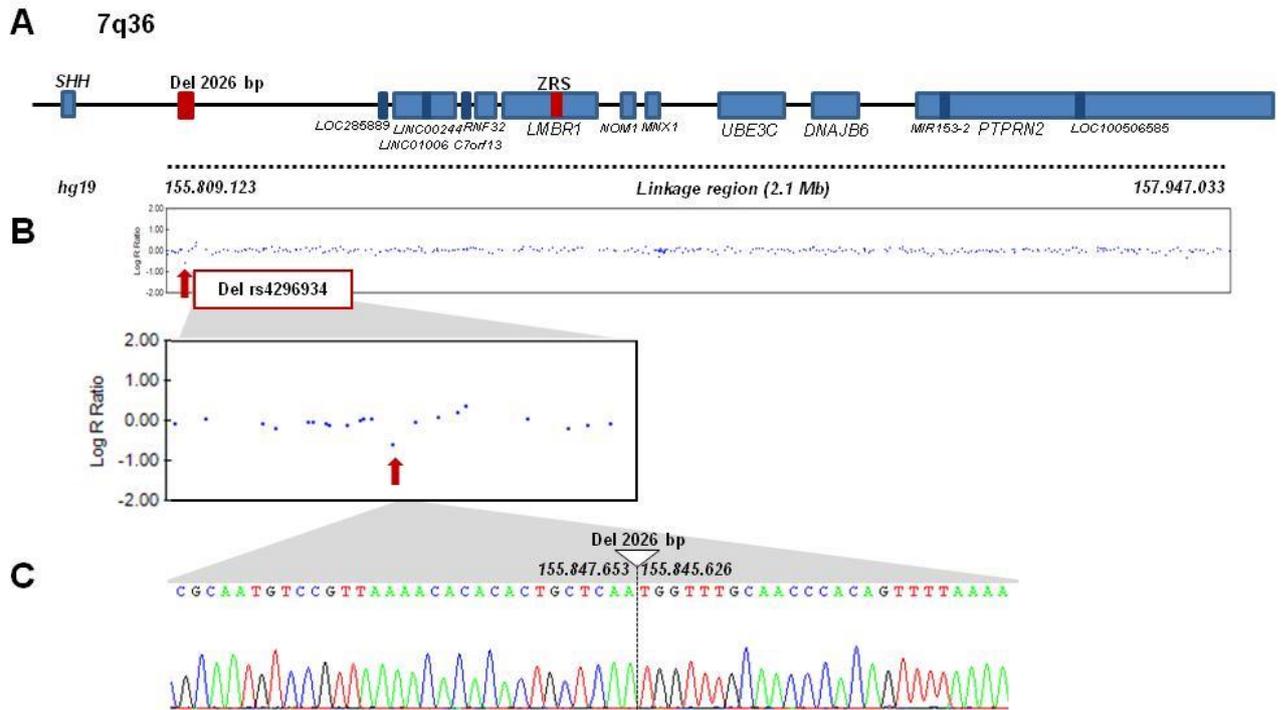


Figure 4

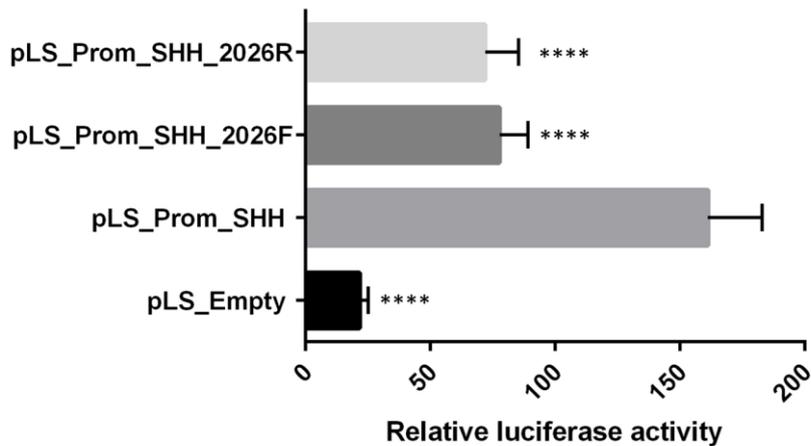


Table 1

| Patients | I-1 | II-1 | II-2 | II-3 | II-5 | III-2 | III-3 | III-4 | III-6 | III-9 | III-12 | III-18 | III-20 | IV-4 | IV-5 | IV-6 | IV-7 | IV-19 | IV-21 | Total (% limb) |
|--------------------------------------|-----|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|------|------|------|------|-------|-------|----------------|
| Upper limb malformations | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Triphalangeal thumb | +/+ | -/+ | -/- | -/- | +/+ | -/- | +/+ | -/+ | -/- | -/- | +/+ | +/+ | -/- | -/- | -/- | +/+ | +/+ | -/- | -/- | 16/38 (42%) |
| Biphalangeal partly duplicated thumb | -/- | +/+ | -/- | -/- | -/- | +/+ | -/- | -/- | +/+ | -/- | -/- | -/- | -/- | +/+ | +/+ | -/- | -/- | -/- | -/- | 10/38 (26%) |
| Preaxial extra-ray | -/- | -/- | +/+ | -/- | -/- | -/- | -/- | +/+ | -/- | +/+ | -/- | -/- | -/- | -/- | -/- | +/+ | -/+ | +/+ | +/+ | 11/38 (29%) |
| Syndactyly digits I-II | +/+ | +/+ | +/+ | -/- | -/- | -/- | -/- | -/- | ND | -/- | -/- | -/- | -/- | -/- | -/- | -/- | -/- | +/+ | -/- | 7/36 (19%) |
| Lower limb malformations | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Large hallux | -/- | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ | -/- | ND | -/+ | -/+ | +/+ | +/+ | -/- | -/- | +/+ | +/+ | -/- | +/+ | 24/36 (67%) |
| Duplicated hallux | -/- | +/+ | +/+ | -/- | -/- | +/+ | +/+ | -/- | +/+ | -/- | -/- | -/- | +/+ | -/- | -/- | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ | 19/38 (50%) |
| Syndactyly toes I-II | -/- | +/+ | +/+ | -/+ | -/- | +/+ | -/- | -/- | ND | +/+ | -/- | -/- | -/- | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ | -/- | -/- | 13/36 (36%) |
| Upper back hypertrichosis | + | + | + | + | + | + | + | + | ND | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 18/18 (100%) |

Supplementary Figure 1



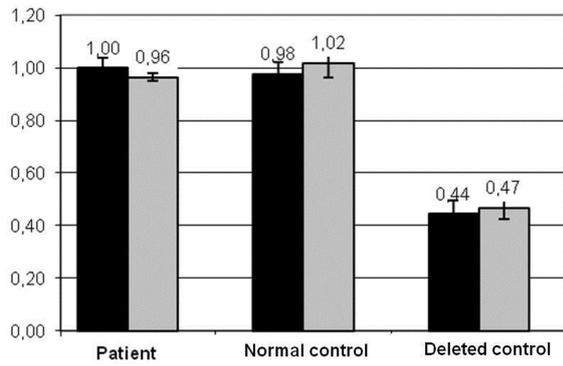
Supplementary Figure 2



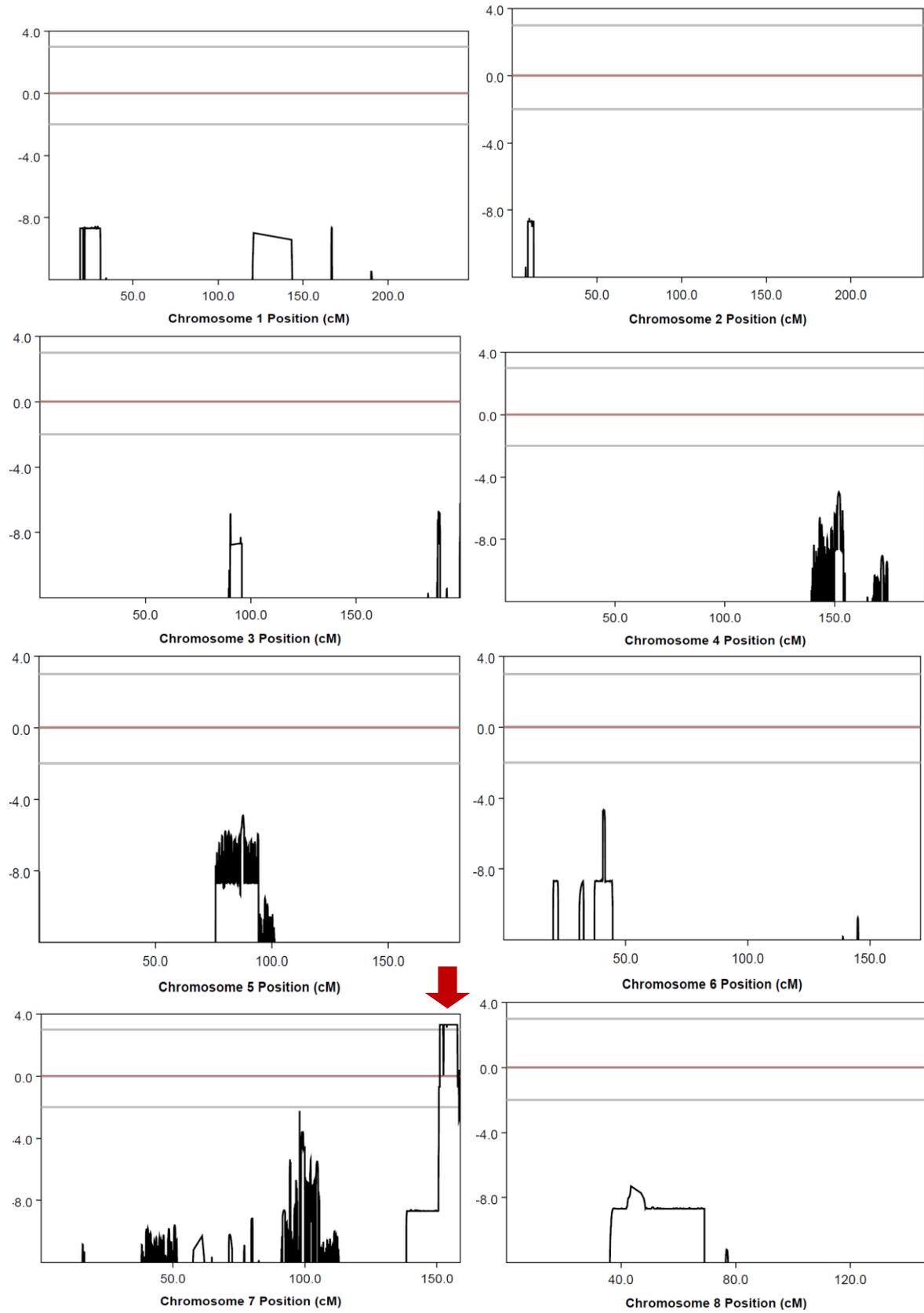
Supplementary Figure 3



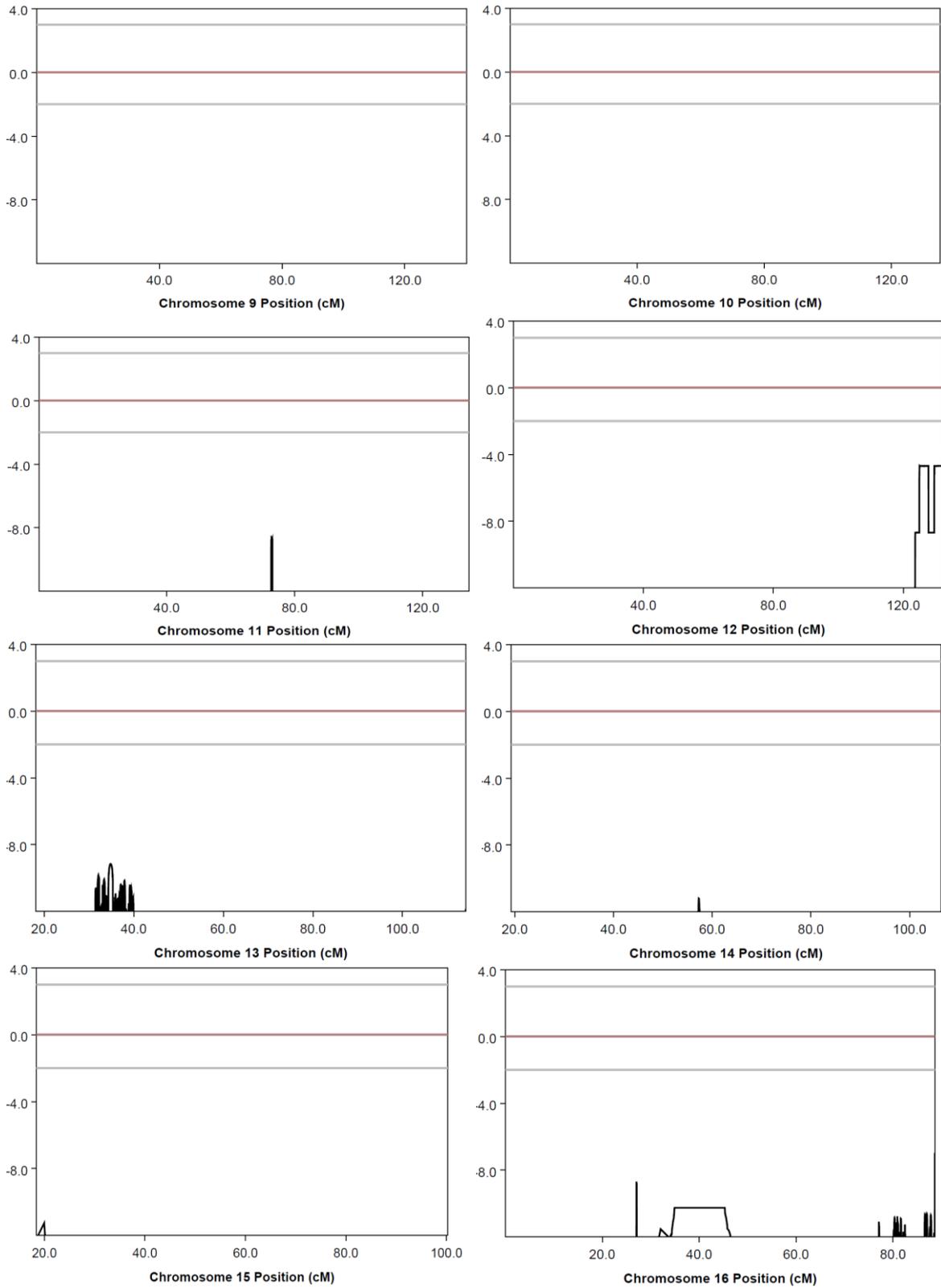
Supplementary Figure 4



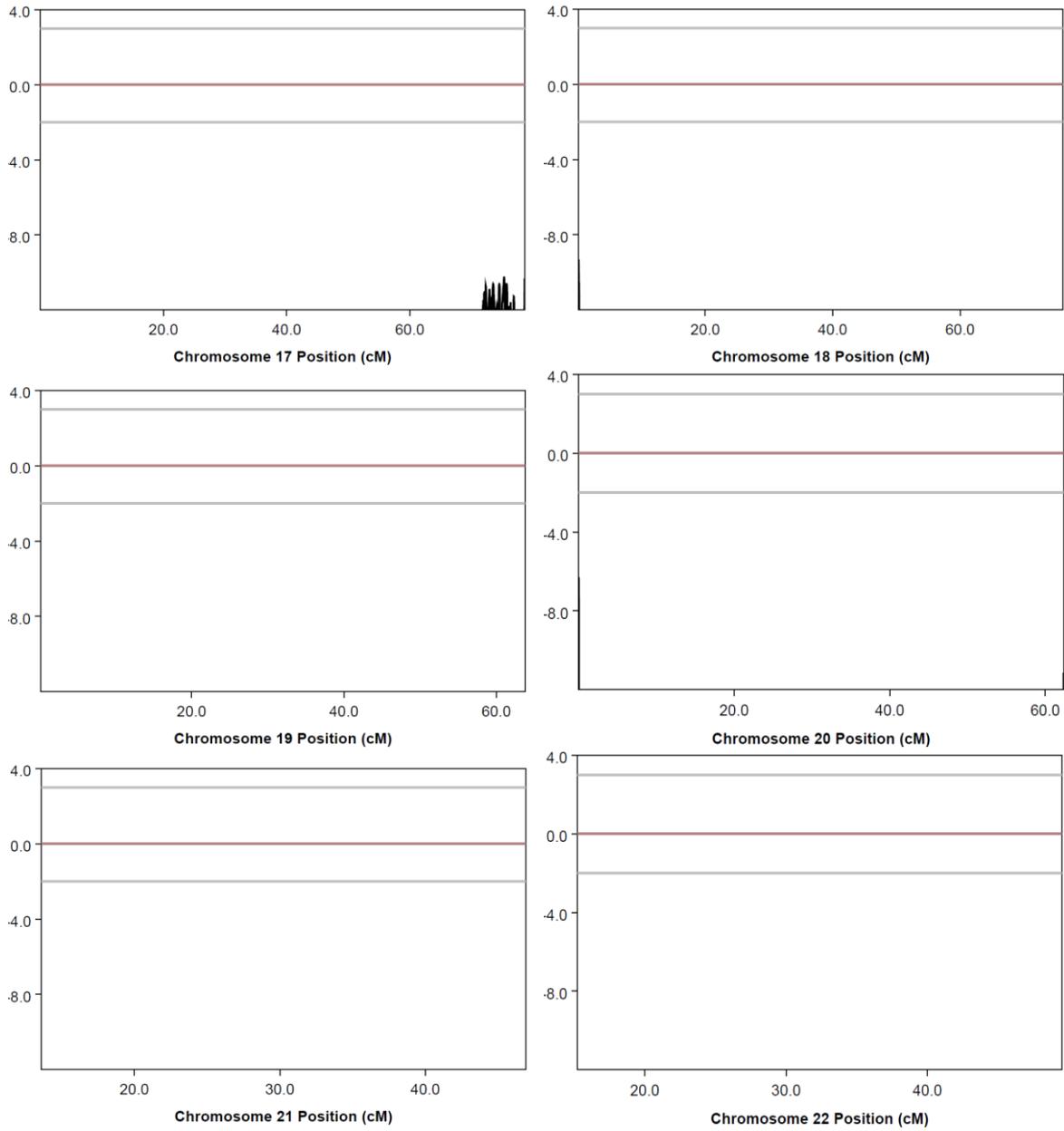
Supplementary Figure 5



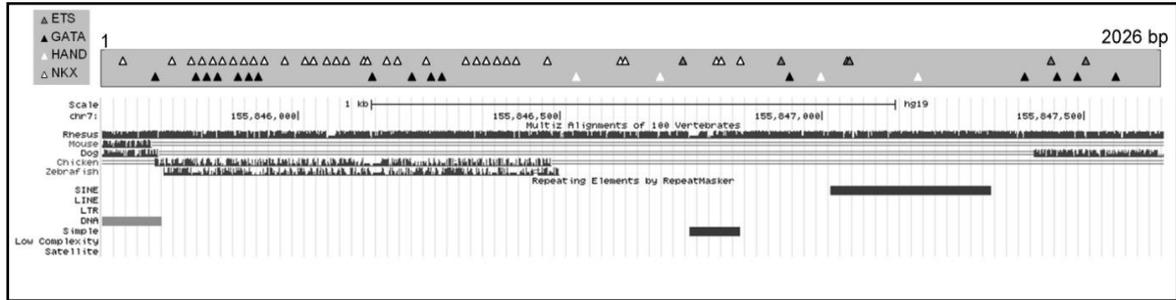
Chapitre II – Polarisation antéro-postérieure



Chapitre II – Polarisation antéro-postérieure



Supplementary Figure 6



Supplementary Table 1

| Purpose | F/R | Primer Sequence (5'>3') |
|--------------------------|-----|--|
| ZRS sequencing | F1 | GAGGTATAACCTCTGGCCAGTG |
| ZRS sequencing | R1 | CGCTTCCACCTGGTCAGTCC |
| ZRS sequencing | F2 | CCAGAGCGTAGCACACGGTC |
| ZRS sequencing | R2 | AATTTATGGATCATCAGTGGC |
| ZRS sequencing | F3 | AAGTCCAGCCTCTGTCTCCA |
| ZRS sequencing | R3 | CAATTCCAAAAGGAAGCTGAA |
| ZRS quantitative PCR | F1 | TTTTTGCCACTGATGATCCA |
| ZRS quantitative PCR | R1 | TTCCTCTACCCACCAGAAC |
| ZRS quantitative PCR | F2 | GGTGAAGCGAAGAGTTCTG |
| ZRS quantitative PCR | R2 | GCCAAAAGGGACATAAACCA |
| 2026 bp sequence cloning | F | <u>CGCACGCGT</u> GCGTACCCACATTAGCCTAGC |
| 2026 bp sequence cloning | R | <u>CGCACGCGT</u> GGGAGACCTCTGTTGAGCAC |

Supplementary Table 2

| ECR | Genomic position (hg19) | Species | Identity (%) |
|-----|--------------------------|---------|--------------|
| 1 | chr7:155837807-155838177 | mm10 | 77.1 |
| 2 | chr7:155856551-155857259 | mm10 | 77.3 |
| 3 | chr7:155857678-155858110 | galGal3 | 77.6 |
| 4 | chr7:155934341-155935442 | mm10 | 78.3 |
| | chr7:155934422-155935119 | galGal3 | 78.5 |
| 5 | chr7:156002855-156003726 | mm10 | 77.5 |
| 6 | chr7:156060996-156061976 | mm10 | 79.6 |
| | chr7:156061130-156061860 | galGal3 | 79.8 |
| 7 | chr7:156066818-156067199 | mm10 | 77.2 |
| 8 | chr7:156120492-156121349 | mm10 | 77.2 |
| 9 | chr7:156148606-156149045 | mm10 | 78.0 |
| 10 | chr7:156171830-156172523 | galGal3 | 80.1 |
| 11 | chr7:156192319-156192791 | galGal3 | 78.6 |
| 12 | chr7:156235018-156235819 | mm10 | 77.3 |
| 13 | chr7:156290360-156290776 | galGal3 | 80.8 |
| 14 | chr7:156360809-156362023 | mm10 | 77.1 |
| 15 | chr7:156381973-156382457 | mm10 | 78.8 |
| 16 | chr7:156391482-156391984 | mm10 | 77.3 |
| 17 | chr7:156406969-156408132 | mm10 | 79.9 |
| | chr7:156407422-156407941 | galGal3 | 79.6 |
| 18 | chr7:156459438-156460263 | mm10 | 79.7 |
| 19 | chr7:156514918-156515711 | mm10 | 77.6 |
| 20 | chr7:156517567-156518557 | galGal3 | 78.1 |
| | chr7:156517582-156518322 | mm10 | 77.1 |
| 21 | chr7:156539366-156540243 | mm10 | 79.6 |
| | chr7:156539573-156540114 | galGal3 | 86.0 |
| 22 | chr7:156564311-156564688 | mm10 | 77.5 |
| 23 | chr7:156583637-156584881 | mm10 | 82.0 |
| | chr7:156583781-156584647 | galGal3 | 84.8 |
| 24 | chr7:156589045-156589437 | mm10 | 77.9 |
| 25 | chr7:156704001-156704777 | mm10 | 77.5 |
| 26 | chr7:156719399-156720090 | mm10 | 77.6 |
| 27 | chr7:156729983-156730339 | mm10 | 77.0 |
| 28 | chr7:156802175-156803537 | mm10 | 79.2 |
| 29 | chr7:156811152-156811709 | mm10 | 77.6 |
| | chr7:156811291-156811694 | galGal3 | 77.5 |
| 30 | chr7:156812172-156813509 | mm10 | 80.6 |
| | chr7:156812244-156812812 | galGal3 | 79.6 |
| 31 | chr7:156820478-156821303 | mm10 | 80.6 |
| 32 | chr7:156867954-156868377 | galGal3 | 77.1 |
| 33 | chr7:156871601-156871983 | mm10 | 77.0 |
| 34 | chr7:156880659-156881310 | mm10 | 78.8 |
| 35 | chr7:156882310-156882930 | mm10 | 77.5 |
| 36 | chr7:156894499-156895243 | mm10 | 78.0 |
| 37 | chr7:156916113-156916537 | mm10 | 77.6 |
| 38 | chr7:156974672-156975084 | mm10 | 78.0 |
| 39 | chr7:157000065-157000633 | mm10 | 79.4 |
| 40 | chr7:157001332-157002268 | mm10 | 81.8 |
| | chr7:157001392-157002187 | galGal3 | 80.5 |
| 41 | chr7:157028514-157029303 | mm10 | 78.1 |
| 42 | chr7:157037103-157038127 | galGal3 | 83.2 |
| | chr7:157037107-157038179 | mm10 | 87.3 |
| 43 | chr7:157046597-157047010 | mm10 | 79.7 |
| 44 | chr7:157060846-157061213 | mm10 | 77.4 |
| 45 | chr7:157178074-157179154 | mm10 | 80.5 |
| | chr7:157178222-157179047 | galGal3 | 84.9 |
| 46 | chr7:157242995-157243884 | mm10 | 78.3 |
| 47 | chr7:157253956-157254395 | mm10 | 78.6 |
| 48 | chr7:157256821-157257265 | galGal3 | 77.3 |
| 49 | chr7:157279082-157279875 | mm10 | 78.5 |
| | chr7:157279128-157279856 | galGal3 | 80.7 |
| 50 | chr7:157302722-157304002 | mm10 | 78.9 |
| 51 | chr7:157366817-157367445 | galGal3 | 79.2 |
| 52 | chr7:157370708-157371109 | galGal3 | 78.4 |
| 53 | chr7:157372095-157372512 | galGal3 | 77.5 |
| 54 | chr7:157428474-157429233 | mm10 | 82.9 |
| 55 | chr7:157473353-157474378 | mm10 | 79.6 |
| 56 | chr7:157476344-157477084 | mm10 | 78.1 |
| | chr7:157476387-157477014 | galGal3 | 84.2 |
| 57 | chr7:157480255-157481053 | mm10 | 79.8 |
| | chr7:157480479-157480862 | galGal3 | 78.4 |
| 58 | chr7:157483277-157484084 | mm10 | 78.8 |
| 59 | chr7:157610594-157610960 | mm10 | 78.7 |
| 60 | chr7:157635530-157636128 | galGal3 | 80.1 |
| 61 | chr7:157672299-157673000 | galGal3 | 79.6 |
| | chr7:157672361-157673114 | mm10 | 79.2 |
| 62 | chr7:157684994-157685475 | mm10 | 77.8 |
| 63 | chr7:157697990-157698482 | mm10 | 84.0 |
| | chr7:157698121-157698485 | galGal3 | 87.4 |
| 64 | chr7:157710020-157710713 | mm10 | 77.5 |
| 65 | chr7:157809146-157809987 | mm10 | 81.0 |
| | chr7:157809169-157809723 | galGal3 | 83.2 |
| 66 | chr7:157844318-157844987 | galGal3 | 82.8 |
| | chr7:157844339-157845103 | mm10 | 77.9 |

Chapitre II – Polarisation antéro-postérieure

Supplementary Table 3

| Matrix Family | Detailed Family Information | Match total |
|----------------------|--|--------------------|
| V\$ZF02 | C2H2 zinc finger transcription factors 2 | 38 |
| V\$NKXH | NKX homeodomain factors | 33 |
| V\$RUSH | SWI/SNF related nucleophosphoproteins with a RING finger DNA binding motif | 18 |
| V\$FKHD | Fork head domain factors | 16 |
| V\$GATA | GATA binding factors | 16 |
| V\$CLOX | CLOX and CLOX homology (CDP) factors | 12 |
| V\$SIX3 | Sine oculis homeobox homolog 3 | 11 |
| V\$GCMF | Chorion-specific transcription factors with a GCM DNA binding domain | 10 |
| V\$HOMF | Homeodomain transcription factors | 7 |
| V\$ETSF | Human and murine ETS1 factors | 6 |
| V\$ZFHX | Two-handed zinc finger homeodomain transcription factors | 6 |
| V\$CART | Cart-1 (cartilage homeoprotein 1) | 5 |
| V\$NEUR | NeuroD, Beta2, HLH domain | 5 |
| V\$TALE | TALE homeodomain class recognizing TG motifs | 5 |
| V\$CIZF | CAS interacting zinc finger protein | 4 |
| V\$EVI1 | EVI1-myleoid transforming protein | 4 |
| V\$GUCE | GTF2IRD1 upstream control element | 4 |
| V\$HAND | Twist subfamily of class B bHLH transcription factors | 4 |
| V\$IKRS | Ikaros zinc finger family | 4 |
| V\$TCFF | TCF11 transcription factor | 4 |
| V\$ZF08 | C2H2 zinc finger transcription factors 8 | 4 |
| V\$ARID | AT rich interactive domain factor | 3 |
| V\$BCDF | Bicoid-like homeodomain transcription factors | 3 |
| V\$HIF | Hypoxia inducible factor, bHLH/PAS protein family | 3 |
| V\$HOXF | Paralog hox genes 1-8 from the four hox clusters A, B, C, D | 3 |
| V\$NFAT | Nuclear factor of activated T-cells | 3 |
| V\$PAXH | PAX homeodomain binding sites | 3 |
| V\$PURA | Pur-alpha binds both single-stranded and double-stranded DNA in a sequence-specific manner | 3 |

Supplementary Table 4

| | PPD type I (thumb polydactyly) | PPD type II (triphalaengeal thumb polydactyly) | PPD type III (index fingers polydactyly) | PPD type IV (polysyndactyly) |
|-----------------------|---------------------------------------|---|---|-------------------------------------|
| OMIM# | 174400 | 174500 | 174600 | 174700 |
| Upper limb PPD | + | + | + | + |
| Lower limb PPD | + | + | + | + |
| Hypertrichosis | - | - | - | - |
| Inheritance | AD | AD | AD | AD |
| Etiology | ZRS | ZRS | ? | ZRS, <i>GLI3</i> |

Discussion

La polarisation antéro-postérieure du bourgeon de membre est sous le contrôle principal du gène *SHH* qui est régulé par un enhancer spécifique du membre, la ZRS. Il s'agit de l'un des éléments régulateurs les plus étudiés dans le cadre des anomalies du développement. Des mutations gain de fonction ou des gains en nombre de copie de cet élément sont responsables de polydactylies préaxiales chez l'homme et plusieurs modèles animaux. Dans notre grande famille porteuse d'une polydactylie préaxiale associée à une hypertrichose de transmission autosomique dominante, l'étude de la ZRS n'a pas mis en évidence d'anomalie, suggérant l'implication d'un autre élément régulateur de *SHH*. Nous avons identifié une délétion d'environ 2 kb ségrégeant avec le phénotype, dans la zone de désert génique en amont de *SHH*. Par des expériences de transfection cellulaire, nous avons montré que la délétion emporte un élément régulateur de type silencer capable de moduler l'activité du promoteur de *SHH in vitro*. Ainsi, chez les patients porteurs de cette délétion, la perte du silencer entraînerait une surexpression de *SHH* responsable de la polydactylie préaxiale observée. Les patients ne présentant pas d'autre anomalie développementale hormis l'hypertrichose, nous supposons que cet élément régulateur pourrait être spécifique au développement du bourgeon de membre et des follicules pileux.

Les prédictions *in silico* ont montré de nombreux sites de fixation potentiels à des facteurs de transcription dans cette région. Parmi ceux-ci, quatre facteurs de transcription ont particulièrement attiré notre attention. Les facteurs de la famille ETS et HAND présentent plusieurs sites de fixation potentiels sur la séquence d'intérêt. Plusieurs membres de ces familles sont connus pour se fixer directement à la ZRS, jouant un rôle dans la régulation de *SHH* au cours du développement du membre. D'autre part, il existe de nombreux sites de fixation potentiels aux facteurs de transcription des familles GATA et NKX. Ces deux familles sont connues pour agir de façon synergique lors de la régulation de nombreux processus développementaux. L'implication des facteurs NKX dans le développement des membres n'a pas été observée à ce jour à notre connaissance. En revanche, le facteur de transcription Gata6 a été décrit récemment comme un régulateur négatif de l'expression de *Shh* au cours du développement du membre en agissant par fixation directe sur la ZRS (Kozhemyakina et al., 2014). De plus, les facteurs de la famille GATA jouent un rôle dans la régulation transcriptionnelle en facilitant la formation de boucles chromatiniennes, permettant la régulation à longue distance, comme c'est le cas pour le gène *SHH* (Chen et al., 2012).

Par ailleurs, compte tenu du rôle de *SHH* dans la morphogenèse et la croissance des follicules pileux (Chiang et al., 1999; Ellis et al., 2003), il est probable que sa dérégulation soit également responsable de l'hypertrichose observée chez les patients. Cette voie de signalisation est dérégulée chez le modèle murin KO pour *Gata3*, qui présente une anomalie de la folliculogénèse (Kaufman et al., 2003). Ceci est un argument supplémentaire en faveur de la candidature des facteurs de transcription GATA comme interagissant avec l'élément régulateur mis en évidence.

Afin de poursuivre ce travail, nous souhaitons réaliser des délétions partielles dans la région d'intérêt afin de préciser les différents domaines d'intérêt au sein de cette séquence de 2 kb. L'identification des facteurs de transcription interagissant avec cette séquence nécessitera la mise au point d'expériences d'immunoprécipitation de chromatine à partir de lignées cellulaires exprimant *SHH* (cellules Caco2 par exemple). Celles-ci pourront être complétées secondairement par des transfections cellulaires après mutagenèse dirigée des sites prédits de fixation. Enfin, une collaboration pour la réalisation de modèles animaux transgéniques devra être envisagée afin, d'une part, de confirmer le territoire d'activité de l'élément régulateur identifié ; et d'autre part, de déterminer si la délétion de cet élément entraîne une expression ectopique de *Shh* au cours du développement du bourgeon de membre.

Par ailleurs, nous ne pouvons écarter actuellement l'hypothèse d'un effet de position comme conséquence de la délétion mise en évidence. En effet, cette délétion pourrait avoir un impact sur l'interaction de *SHH* avec ses éléments régulateurs, en particulier la ZRS, comme cela a été décrit suite à une translocation chromosomique les séparant physiquement (Lettice et al., 2002). Dans cette hypothèse, des expérimentations de type capture de conformation chromosomique (3C et techniques dérivées) pourraient être envisagées.

Les événements moléculaires aboutissant à la régulation précise de *SHH* au cours du développement du membre sont probablement beaucoup plus complexes qu'une simple juxtaposition d'éléments *cis*-régulateurs fonctionnant de façon indépendante. L'élucidation de la cause des polydactylies préaxiales à ce jour inexplicables, chez l'homme et les modèles animaux, devrait aider à la compréhension des interactions entre les multiples éléments régulateurs, agissant probablement en *cis* et en *trans*, pour la régulation génique fine, spatiale et temporelle, nécessaire aux processus développementaux.

V. Deuxième modèle d'étude : Le Syndrome de Nager

Les dysostoses acrofaciales chez l'homme correspondent à une anomalie de développement des structures dérivées du premier et du deuxième arc branchial associée à des malformations des membres touchant les extrémités. Environ 18 formes de dysostoses acrofaciales ont été décrites. Elles sont subdivisées en 3 entités selon les anomalies des extrémités : préaxiales, postaxiales, ou autres (non classables dans les deux groupes précédents). Les anomalies craniofaciales sont d'expressivité très variable, notamment en intrafamilial : fentes palpébrales obliques en bas et en dehors, colobomes de la paupière inférieure, hypoplasie zygomatique, rétromicrognathie et microtie souvent associée à un déficit auditif.

Actuellement, le Syndrome de Nager (OMIM154400) est la seule dysostose acrofaciale préaxiale reconnaissable, décrite dans de multiples familles et récemment caractérisée sur le plan génétique. Par ailleurs, trois autres dysostoses acrofaciales préaxiales ont été décrites dans des familles isolées (Kelly et al., 1977; Kennedy and Teebi, 2004; Reynolds et al., 1986). Le fait qu'il s'agisse d'entités distinctes est incertain, compte tenu d'un chevauchement phénotypique important dans le groupe plus large des dysostoses mandibulofaciales, d'un mode de transmission non équivoque et de l'absence d'étude moléculaire. Ces affections sont listées dans le Tableau 5.

| Sous-type | OMIM | Mode héréditaire | Gène |
|---------------|--------|------------------|--------------|
| Nager | 154400 | AD | <i>SF3B4</i> |
| Kennedy-Teebi | - | AR | - |
| Kelly | - | AR/RX | - |
| Reynolds | - | AD | - |

Tableau 5 : Dysostoses acrofaciales préaxiales.

AD : autosomique dominant, AR : autosomique récessif, RX : récessif lié à l'X. D'après Wiczorek, 2013.

V.1 Signes cliniques du Syndrome de Nager

L'incidence du Syndrome de Nager est mal connue, une centaine de cas ayant été décrits actuellement. Cette affection a été décrite en 1948 par Nager et DeReynier (Nager and DeReynier, 1948). Elle est caractérisée par des anomalies cranio-faciales associant des fentes palpébrales obliques en bas et en dehors, une hypoplasie malaire, un rétromicrognathisme, des anomalies des oreilles responsables d'une surdité de transmission, et une fente palatine. Les anomalies préaxiales des membres sont variables et souvent asymétriques. Aux membres

supérieurs, on peut observer une absence de pouce, une hypoplasie du pouce, un pouce triphalangé ou dupliqué, une limitation de la flexion du pouce ou un symphalangisme. Au niveau radial, on observe une hypoplasie voire une aplasie du radius, souvent associée à une synostose radio-cubitale proximale. L'atteinte des membres inférieurs est en général discrète : pied bot, hypoplasie de l'hallux ou d'autres rayons, absence de plis inter-phalangiens. Le Syndrome de Nager a fait l'objet en 1993 d'une revue clinique des 76 cas rapportés dans la littérature par McDonald et Gorski, dans le cadre d'un « Syndrome of the month » du Journal of Medical Genetics (McDonald and Gorski, 1993). Ces données sont résumées dans le Tableau 6. Il existe un chevauchement phénotypique important au sein du groupe des dysostoses mandibulofaciales, qui constituent donc les principaux diagnostics différentiels du Syndrome de Nager.

Primary clinical features of Nager acrofacial dysostosis (NAD).

| Clinical features | Published cases* | Present cases† | | Apparently autosomal recessive cases‡ | Autosomal dominant cases§ |
|--------------------------------------|------------------|----------------|--------|---------------------------------------|---------------------------|
| | | Proband | Mother | | |
| <i>Craniofacial</i> | | | | | |
| Malar hypoplasia | 67/67 | + | + | 7/7 | 13/13 |
| Downward slanting palpebral fissures | 61/61 | + | + | 6/6 | 12/12 |
| Reduced number of eyelashes | 20/25 | + | – | 1/3 | 5/6 |
| Lower lid coloboma | 15/30 | – | – | 3/3 | 1/5 |
| High nasal bridge | 43/44 | + | + | 4/4 | 4/4 |
| Micrognathia | 68/69 | + | + | 6/6 | 13/13 |
| Cleft palate | 26/36 | – | + | 2/2 | 5/6 |
| Absent soft palate | 14/14 | – | – | – | – |
| Cleft lip | 6/60 | – | – | 2/5 | 1/9 |
| Extension of hair onto cheek | 10/14 | – | – | – | 3/5 |
| External ear defects | 51/56 | + | + | 8/9 | 8/10 |
| External auditory canal atresia | 48/52 | – | + | 8/8 | 6/8 |
| Low set ears | 39/39 | + | + | 3/3 | 6/6 |
| Conductive hearing loss | 33/35 | + | + | 5/5 | 6/6 |
| <i>Limb defects</i> | | | | | |
| Absent thumb | 44/67 | + | – | 6/6 | 6/7 |
| Hypoplastic thumb | 33/69 | + | + | 4/4 | 11/11 |
| Radial hypo/aplasia | 34/34 | – | – | 5/5 | 3/5 |
| Proximal radioulnar synostosis | 16/19 | + | – | 5/6 | 2/2 |
| <i>Other structural anomalies</i> | | | | | |
| Central nervous system | 6 | – | – | – | – |
| Cardiovascular system | 4 | – | – | 1 | – |
| Gastrointestinal tract | 3 | – | – | – | 1 |
| Genitourinary | 7 | – | – | – | 1 |

* Clinical features previously reported in 76 cases of NAD.³⁻⁹

† NAD family described in this report; affected family members include the proband (fig 1) and his mother (fig 2).

‡ Five previously reported families with normal parents and 2 affected sibs.³⁻⁷

§ These eight families include the NAD family described in this report (figs 1 and 2) and seven previously reported cases showing vertical transmission.⁹⁻¹³

Tableau 6 : Signes cliniques rencontrés dans la dysostose acrofaciale de Nager.

Revue de 76 cas rapportés dans la littérature par McDonald and Gorski, 1993.

V.2 Génétique du Syndrome de Nager

Une hétérogénéité génétique est probable compte tenu de la description de formes familiales où la transmission est autosomique dominante ou récessive. Actuellement, un seul gène a été identifié dans le cadre d'une collaboration internationale par séquençage de

l'exome chez 35 patients présentant une forme autosomique dominante ou sporadique de Syndrome de Nager. Des mutations du gène *SF3B4* ont été mises en évidence dans environ deux tiers des cas (Bernier et al., 2012). Un cas de délétion du locus comprenant le gène avait également été rapporté précédemment (Waggoner et al., 1999).

Le gène *SF3B4* (*Splicing Factor 3B, subunit 4*) est localisé en 1q21.2. Il comporte 6 exons et code la protéine SAP49 de 424 acides aminés appartenant au complexe SF3B du spliceosome majeur. SAP49 joue un rôle dans l'épissage en permettant l'attachement du snRNP U2 au site de branchement (Champion-Arnaud and Reed, 1994)(Figure 25). De plus, elle intervient dans la voie de signalisation des BMPs au cours du développement squelettique en inhibant la différenciation ostéocondrale médiée par la voie des BMPs. Cette action se fait par liaison directe avec le récepteur BMPRIA, entraînant une réduction du nombre de récepteurs à la surface cellulaire (Watanabe et al., 2007).

Chez l'embryon de souris, l'orthologue de *SF3B4* est exprimé fortement dans les membres supérieurs et inférieurs ainsi que les somites, confirmant son rôle dans le développement squelettique. De plus, une expression transitoire est détectée au cours du développement cardiaque (Ruiz-Lozano et al., 1997).

Ainsi, les malformations observées dans le Syndrome de Nager pourraient être liées à des anomalies de l'épissage de gènes impliqués dans le développement et/ou au rôle direct de la protéine SAP49 dans le développement squelettique.

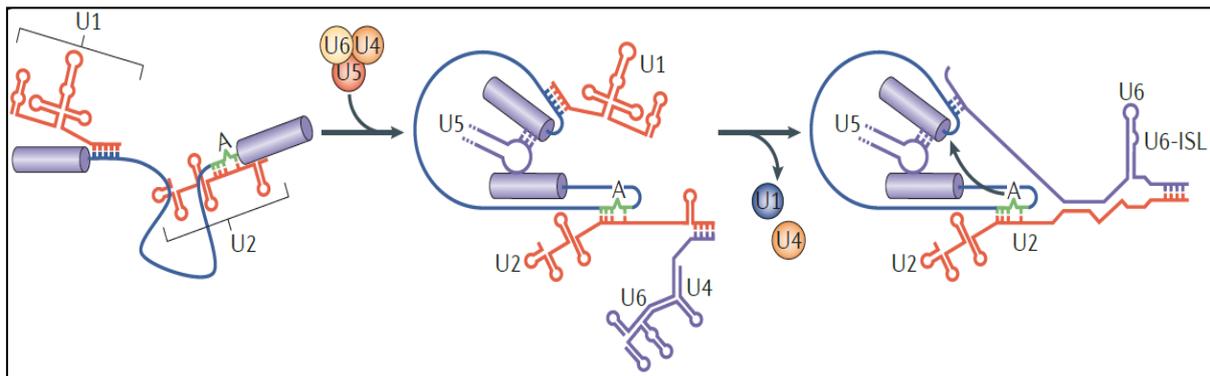


Figure 25 : Etapes de l'assemblage du spliceosome et étapes catalytiques de l'épissage.

Au cours de l'épissage, des interactions ARN-ARN spécifiques permettent l'assemblage du centre catalytique du spliceosome. Initialement, les snRNP U1 et U2 se fixent respectivement au site donneur d'épissage et au site de branchement (Adénosine indiquée par un A), formant le pré-spliceosome (complexe A), permettant le rapprochement des deux exons flanquants. L'arrivée du tri-snRNP U4/U5/U6 au sein des séquences consensus d'épissage entraîne la formation du complexe B. Sa présence permet de libérer le site de branchement de même que le site d'épissage en 3'. Finalement, le complexe catalytique, ou complexe C, est formé par l'association de U6 et U2 au site d'épissage en 5' déclenchant le départ de U1 et U4. L'interaction entre U6 et U2 permet de juxtaposer le site donneur d'épissage au site de branchement réalisant le complexe C qui correspond à une structure intermédiaire « en lasso » libérant l'extrémité de l'exon précédent. D'après Matera and Wang, 2014.

V.3 Nos données cliniques et moléculaires dans 14 familles de Syndrome de Nager

Ce projet a débuté en 2010, alors que le déterminisme moléculaire du Syndrome de Nager n'était pas identifié. Dans le cadre de notre activité de génétique clinique, nous avons identifié 5 patients atteints de syndrome de Nager suivis au CHRU de Lille, appartenant à 4 familles différentes. Par le biais de collaborations nationales et internationales nous avons recruté progressivement 10 familles supplémentaires, aboutissant à un total de 18 patients atteints, dans le but d'identifier l'anomalie moléculaire en cause dans cette affection.

Un séquençage haut-débit de l'exome a été réalisé chez les 3 premiers patients recrutés, selon une stratégie de chevauchement (Biesecker and Green, 2014). Il s'agissait de 3 cas sporadiques de Syndrome de Nager. Ces analyses avaient été effectuées par la plateforme de prestation Otogenetics (Norcross, GA, USA), utilisant la technologie MiSeq, Illumina. Alors que l'analyse des résultats était en cours, l'identification du gène *SF3B4* comme responsable du Syndrome de Nager a été publiée par Bernier et coll. dans le cadre du projet FORGE Canada (Finding Of Rare Disease Genes in Canada) (Bernier et al., 2012). Ce gène était couvert par le séquençage de l'exome réalisé chez nos 3 patients, en revanche la profondeur de lecture était particulièrement faible (< 20X) pour les exons 1 à 3 (Figure 26).

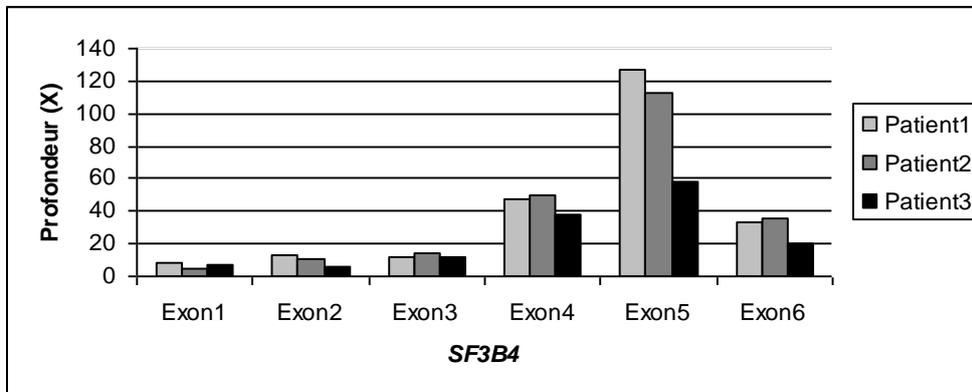


Figure 26 : Profondeur moyenne de lecture des 6 exons de *SF3B4* pour les 3 exomes réalisés.

Suite à l'identification du gène *SF3B4*, nous avons mis au point le séquençage Sanger de ses 6 exons. Les 3 patients étudiés en exome étaient porteurs d'une mutation (Patient 1 : Exon 1 c.1A>G, p.Met1?; Patient 2 : Exon 3 c.452C>A, p.Ser151X ; Patient 3 : Exon 3 c.577C>T, p.Arg193X). Rétrospectivement, la visualisation des lectures couvrant les nucléotides concernés sur nos exomes a permis de suspecter une mutation uniquement chez le

Patient 1. Cependant, la profondeur de lecture était trop faible pour que ce variant soit retenu après les filtres de l'analyse bioinformatique (Figure 27).

Nous avons poursuivi le séquençage Sanger du gène *SF3B4* chez les 18 patients de notre cohorte. Les données cliniques et moléculaires ont fait l'objet de l'article 3 ci-après.



Figure 27 : Mise en défaut du séquençage de l'exome chez 3 patients porteurs de mutations du gène *SF3B4*.

Les nucléotides concernés par les mutations identifiées en séquençage Sanger sont encadrés.

Pour le Patient 1, 5% des lectures (1/19) mettent en évidence la mutation. Pour les Patients 2 et 3, la mutation n'est pas identifiée malgré une profondeur respective de 22 et 35 lectures. Total count : profondeur de lecture.

Article 3

Publié dans *Clinical Genetics*, 2014 ;86(3):246-51.

Nager syndrome: report on 14 families and confirmation of *SF3B4* haploinsufficiency as the major cause

Florence PETIT^{1,2,3}, Fabienne ESCANDE², Anne-Sophie JOURDAIN², Nicole PORCHET^{2,3}, Jeanne AMIEL^{4,5}, Bérénice DORAY⁶, Marie-Ange DELRUE⁷, Elisabeth FLORI⁶, Chong Ae KIM⁸, Sandrine MARLIN⁹, Stephen P. ROBERTSON¹⁰, Sylvie MANOUVRIER-HANU^{1,3}, Muriel HOLDER-ESPINASSE^{1,3,11}

¹ Service de Génétique Clinique, Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU Lille, France

² Laboratoire de Biologie Moléculaire, Centre de Biologie Pathologie, CHRU Lille, France

³ Université Lille Nord de France

⁴ Département de Génétique, Hôpital Necker-Enfants Malades, AP-HP, Paris, France

⁵ Unité INSERM U781, Faculté Paris-Descartes, Institut IMAGINE, Paris, France

⁶ Service de génétique médicale, Hôpital de Hautepierre, CHU Strasbourg, France

⁷ Service de génétique médicale, Hôpital Pellegrin, CHU Bordeaux, France

⁸ Instituto da Crianca, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brazil

⁹ Centre de référence des surdités génétiques, service de génétique médicale, Hôpital Armand Trousseau, APHP, Paris, France

¹⁰ Clinical Genetics Laboratory, Department of Paediatrics and Child Health, University of Otago, New Zealand

¹¹ Clinical Genetics Department, Guy's Hospital, London, UK

Corresponding author:

Florence PETIT

Service de génétique clinique

Hôpital Jeanne de Flandre

CHRU

59037 Lille cedex

FRANCE

tel +33 3 20 44 49 11

fax +33 3 20 44 49 01

florence.petit@chru-lille.fr

Conflict of interest statement: the authors declare no conflict of interest.

Aknowledgements: We gratefully acknowledge Dr Ellen Thomas for critical reading of the manuscript and Cécile Prud'homme for her contribution to the clinical data compilation.

Abstract

Nager syndrome belongs to the group of acrofacial dysostoses, which are characterized by the association of craniofacial and limb malformations. Recently, exome sequencing studies identified the *SF3B4* gene as the cause of this condition in most patients. *SF3B4* encodes a highly conserved protein implicated in mRNA splicing and bone morphogenic protein (BMP) signaling. We performed *SF3B4* sequencing in 14 families (18 patients) whose features were suggestive of Nager syndrome and found 9 mutations predicted to result in loss-of-function. *SF3B4* is the major gene responsible for autosomal dominant Nager syndrome. All mutations reported predict null alleles, therefore precluding genotype-phenotype correlations. Most mutation-negative patients were phenotypically indistinguishable from patients with mutations, suggesting genetic heterogeneity.

Key Words: Nager syndrome, SF3B4, acro-facial dysostosis, spliceosome.

Introduction

Nager syndrome belongs to the group of acrofacial dysostoses, which is characterized by craniofacial and limb malformations. The former comprise down-slanting palpebral fissures, absent lower medial eyelashes, malar hypoplasia, microretrognathia, cleft palate, ankylosis of temporo-mandibular joint, and external ear malformations often associated with conductive deafness. Limb defects typically involve the radial ray: hypoplasia or absent thumbs are the most characteristic features, frequently associated with radioulnar synostosis. Occasional associated anomalies have been reported such as short stature, costo-vertebral, renal or cardiac malformations. Most individuals have normal intelligence. There is evidence of autosomal dominant and autosomal recessive inheritance for Nager acrofacial dysostosis, suggesting genetic heterogeneity (1). Recently, exome sequencing identified mutations in the *SF3B4* gene (*Splicing Factor 3B, subunit 4*) as responsible for autosomal dominant Nager syndrome (MIM605593) (2). Heterozygous *SF3B4* mutations predicted to result in loss-of-function (LoF) were identified in approximately two-third of families (2, 3). *SF3B4* encodes SAP49, a 424 amino acid spliceosomal protein which belongs to the mammalian SF3B complex. SAP49 plays a crucial role in RNA-splicing by tethering the U2 snRNP to the branch site (4). In addition, SAP49 is linked with bone morphogenic protein (BMP) signaling. This pathway is involved in early embryogenesis and skeletal development and it has been previously demonstrated that SAP49 specifically inhibits BMP-mediated osteochondral cell differentiation (5). In mice embryos, *SF3B4* is expressed at a high level in fore-limbs, hind-limbs and somites during early stages suggesting its involvement in skeletal development. *SF3B4* displays a dynamic pattern of expression in the developing heart as well (6).

Here, we report 14 families comprising 18 patients with features suggestive of Nager syndrome. *SF3B4* mutations were identified in 64% of these families, confirming its major implication in Nager syndrome.

Patients, Materials and Methods

We recruited 14 families (18 patients) with features suggestive of Nager syndrome, from several clinical genetics departments. Eleven probands were sporadic cases. Among them, cases 1 and 2 are monozygotic twins for whom termination of pregnancy was performed after prenatal sonographic diagnosis of severe mandibulofacial dysplasia and radial defects, suggestive of Nager syndrome (7). The other nine patients had a family history concordant with autosomal dominant inheritance. Case 5 presented with a mild phenotype and Nager syndrome was suggested after the birth of her first child, who is more severely affected (Case 6). A previous pregnancy had been terminated after prenatal diagnosis of bilateral radial agenesis in a male fetus on scan at 10 WG (weeks of gestation) with no necropsy. Case 8 and 10 are dizygotic twins, second and third children of unrelated parents of Congo Zairian origin. Nager syndrome was suspected since midface retrusion and micrognathia were associated with hypoplastic thumbs. Their mother (case 11) presented with a milder phenotype. Case 14 is the second child of unrelated parents, born with a severe acro-facial dysostosis. Familial Nager syndrome was then suspected in his father and his brother, both presenting with a milder phenotype associating interphalangeal synostosis of the thumbs and micrognathia. Case 17 is the third child of unrelated parents of Brazilian origin. His mother, both sibs and one of his two children are also affected with Nager Syndrome. His affected female child has a more severe acro-facial dysostosis with midface retrusion, micrognathia, cleft palate, dysplastic ears, deafness, bilateral triphalangeal thumbs and radioulnar synostosis. Other affected family members present with limb anomalies including bilateral partially duplicated or triphalangeal thumbs accompanied by deafness and micrognathia .

DNA was extracted from peripheral blood for most patients, and from frozen lung tissues for both fetuses. We performed Sanger sequencing of all 6 exons and flanking introns of the *SF3B4* gene (sequence of primers available on request). The electropherograms were

compared to the reference sequence NM_005850.4. Patient consent for molecular studies had been collected prior to the analysis.

Results

We found mutations in *SF3B4* in 9/14 families (64%). All mutations are suspected to cause LoF. Clinical and molecular results are summarized in Table 1 (only cases for whom *SF3B4* testing has been performed are included in the table). Clinical features of patients with *SF3B4* mutations are depicted in Figure 1.

Discussion

In our series of patients, we found mutations in *SF3B4* in 64%, in accordance with its identification as a major disease causing gene in Nager Syndrome (2, 3). The phenotype of patients harboring a mutation is consistent with the characteristic clinical picture of Nager Syndrome. The intrafamilial variability of expression was particularly striking in our familial cases, for whom the diagnosis of Nager Syndrome in a mildly affected parent was made only after the occurrence of a severely affected child or fetus. Thus, genetic counseling remains difficult in this condition.

We found a high incidence of cardiac malformation in our series, occurring in 3 out of our 13 patients with *SF3B4* mutations (patent ductus arteriosus, Fallot tetralogy and ventricular septal defect). Despite expression of the *SF3B4* mouse homolog in the developing heart (6), heart defects in Nager Syndrome have been rarely reported in the literature. It was present in 2 out of the 26 patients reported by Bernier *et al.*, both cases being affected with ventricular septal defect (2). In Czeschik *et al.* series, a congenital cardiac malformation was present in 2 out of 7 patients with *SF3B4* mutations (patent ductus arteriosus, atrioventricular septal defect) (3). In total, heart malformations are reported in 15% of patients mutated for *SF3B4*,

the most frequent one being ventricular septal defect. Considering this finding, cardiac examination should be performed in Nager patients.

In addition, 3 of the 13 mutated cases had feet anomalies: bilateral metatarsus varus (Case 6), bilateral talipes with hypoplasia of the first metatarsals (Case 7), large and short halluces (Case 13). We do not think that these findings are incidental because similar defects have been described in patients with *SF3B4* mutations (2, 3). Thus, lower limb malformation is an infrequent finding, in accordance with expression in the four limb buds in mice embryos, and should not rule out the diagnosis of Nager syndrome.

All mutations identified in *SF3B4* are suspected to cause LoF, therefore no genotype-phenotype correlation could be addressed. We identified 6 novel mutations (Table 1). Three mutations had already been reported by Bernier *et al.* (2012) (2). Indeed, the missense mutation c.1A>G (p.Met1?) predicted to abolish the methionine initiation codon has now been identified in four unrelated families, the nonsense mutation c.452C>A (p.Ser151*) and the frameshift mutation c.1060dupC in two unrelated families (2). All sporadic cases for which parents' samples were available for testing had *de novo* mutations, suggesting complete penetrance.

The patients without *SF3B4* mutations had acrofacial dysostosis similar to the mutated ones (Table 1), except for case 18 which is atypical because of normal upper limbs. Case 17 has a mild phenotype but several of his related are affected with typical Nager syndrome. Since no screening for large rearrangements of *SF3B4* has yet been performed, some of these patients may have an undetected *SF3B4* deletion. In the 5 patients without *SF3B4* mutations, karyotype and/or SNP/CNV array revealed no chromosomal imbalance (SNP-array Illumina® 300K for case 15, 1M for case 17, array-CGH Agilent® 60K for case 18). Nevertheless, resolution of the arrays is insufficient to rule out a rearrangement in *SF3B4* gene (covered by only one probe for the 60K and 300 K arrays, 3 probes for the 1M array). Besides, linkage

study performed by SNP-array for family 17 excluded the *SF3B4* locus. Our series gives further arguments for genetic heterogeneity in Nager Syndrome. Among the differential diagnoses, clinical overlap between Nager, Treacher-Collins Syndrome (MIM 154500) and Mandibulofacial Dysostosis Guion-Almeida type (MIM 610536) have already been described (2, 8, 9). In the 5 patients without *SF3B4* mutations, Treacher-Collins syndrome is unlikely since *TCOF1*, *POLR1C*, and *POLR1D* testing is normal. Mandibulofacial Dysostosis, Guion-Almeida type, has been recently associated with the loss of the GTPase U5-116kD function encoded by *EFTUD2*, another major component of the spliceosome (8, 9). *EFTUD2* is unlikely disease causing in our mutation negative cases as they are of normal intelligence. Moreover, none are microcephalic. However, this alternative diagnosis should be considered. Assuming the existence of genetic heterogeneity, other spliceosomal proteins, notably the U2 snRNPS SAP155 and SAP145 encoded respectively by the *SF3B1* and *SF3B2* genes, could be regarded as candidates. It is surprising to observe that such an ubiquitous system would lead to specific phenotypes when one of its component is mutated. Recent studies have suggested that spliceosomal proteins may participate in cellular functions other than the original splicing function. Indeed, SAP49 encoded by *SF3B4* inhibits BMP-mediated osteochondral cell differentiation (5). Skeletal findings in Nager syndrome could be due, at least in part, to the deregulation of BMP-signaling. Heterozygous *Sf3b1*-null mice exhibit various skeletal alterations along the anterior-posterior axis (10). Consistent with the axial changes, expression of several *Hox* genes is anteriorly extended in the paraxial mesoderm and the second branchial arches. In these animals, splicing activity seem to be normal suggesting that the homeotic transformations are not due to the alteration of general gene expression. Heterozygous mutant mice for *SF3b2* display similar skeletal abnormalities (10). Further studies are therefore necessary to explore the molecular basis of Nager Syndrome since *SF3B4* testing is negative in one-third of cases.

References

1. McDonald MT, Gorski JL. Nager acrofacial dysostosis. *J Med Genet* 1993; 30 (9): 779-782.
2. Bernier FP, Caluseriu O, Ng S et al. Haploinsufficiency of SF3B4, a component of the pre-mRNA spliceosomal complex, causes Nager syndrome. *Am J Hum Genet* 2012; 90 (5): 925-933.
3. Czeschik JC, Voigt C, Alanay Y et al. Clinical and mutation data in 12 patients with the clinical diagnosis of Nager syndrome. *Hum Genet* 2013.
4. Champion-Arnaud P, Reed R. The prespliceosome components SAP 49 and SAP 145 interact in a complex implicated in tethering U2 snRNP to the branch site. *Genes Dev* 1994; 8 (16): 1974-1983.
5. Watanabe H, Shionyu M, Kimura T et al. Splicing factor 3b subunit 4 binds BMPR-IA and inhibits osteochondral cell differentiation. *J Biol Chem* 2007; 282 (28): 20728-20738.
6. Ruiz-Lozano P, Doevendans P, Brown A et al. Developmental expression of the murine spliceosome-associated protein mSAP49. *Dev Dyn* 1997; 208 (4): 482-490.
7. Ansart-Franquet H, Houfflin-Debarge V, Ghoumid J et al. Prenatal diagnosis of Nager syndrome in a monozygotic-diamniotic twin pregnancy. *Prenat Diagn* 2009; 29 (2): 187-189.
8. Lines MA, Huang L, Schwartzentruber J et al. Haploinsufficiency of a spliceosomal GTPase encoded by EFTUD2 causes mandibulofacial dysostosis with microcephaly. *Am J Hum Genet* 2012; 90 (2): 369-377.
9. Gordon CT, Petit F, Oufadem M et al. EFTUD2 haploinsufficiency leads to syndromic oesophageal atresia. *J Med Genet* 2012; 49 (12): 737-746.
10. Isono K, Mizutani-Koseki Y, Komori T et al. Mammalian polycomb-mediated repression of Hox genes requires the essential spliceosomal protein Sf3b1. *Genes Dev* 2005; 19 (5): 536-541.

Legends

Figure 1: Craniofacial and limb findings in individuals with Nager Syndrome, with mutations in *SF3B4* (Cases 3 to 12). Typical facial features comprise downslanting palpebral fissures, mid-face retrusion and micrognathia. Ears are dysplastic, often presenting with a hypoplastic helix and a large lobule. Radial ray defects comprise hypoplastic or absent thumbs frequently associated with radioulnar synostosis. Case 3: Clinical pictures at birth showing downslanting palpebral fissures, mid-face retrusion with microretrognathia, low-set ears with hypoplastic helix and large lobule, low-implantation of hair on the jaw, absent thumbs and left 2nd finger duplication. Upper limbs radiographs: Left: Radio-ulnar synostosis, absent thumb, duplication of the middle and distal phalanges and broad proximal phalange of the second finger. Right: Radio-ulnar synostosis, absent thumb, hypoplastic middle phalange of the second finger. Case 4: Down-slanting palpebral fissures, mid-face retrusion with microretrognathia, bilateral hypoplastic thumbs and left camptodactyly of the 5th finger. Case 5: Mild mid-face retrusion and micrognathia, hypoplastic right thumb. Case 7: Down-slanting palpebral fissures, mid-face retrusion with microretrognathia, low-set ears with hypoplastic helix and large lobule, hypoplastic thumbs and metatarsus varus. Case 8: Down-slanting palpebral fissures, mid-face retrusion with microretrognathia, low-set ears with hypoplastic helix and large lobule, absent thumb. Case 9: Left ear: hypoplastic helix, large lobule, preauricular tag. Right hand: hypoplastic thumb. Case 10: Left ear: preauricular tags. Right hand: hypoplastic thumb. Case 11: bilateral hypoplastic thumbs. Case 12: Microretrognathia, dysplastic ears with hypoplastic helix and large lobule, hypoplastic left thumb.

Table 1: Clinical and molecular features in individuals with Nager syndrome, mutated (Cases 1 to 13) or not mutated for *SF3B4* (Cases 14 to 18). We provide a summary for our series and the literature patients (2, 3). OFC: occipito-frontal circumference; SD: standard deviation; TM: temporo-mandibular; WG: weeks' gestation; y: years old; AD: autosomal dominant; ND: not determined; NA: non applicable.

Figure 1



Table 1

Table 1. Clinical and molecular features in individuals with Nager syndrome, mutated (Cases 1–13) or not mutated for *SF3B4* (Cases 14–18). We provide a summary for our series and the literature patients (2, 3).

| | Case 1, twin1 Anseart-Franquet et al. (7) | Case 2, twin2 Anseart-Franquet et al. (7) | Case 3 | Case 4 | Case 5 | Case 6 | Case 7 | Case 8 | Case 9 | Case 10 |
|---------------------------------|--|---|--|---|---|---|--|---|--|---|
| Clinical | | | | | | | | | | |
| Inheritance | Sporadic, monozygotic twin of case 2 | Sporadic, monozygotic twin of case 1 | Sporadic | Sporadic | AD, mother of case 6 | AD, daughter of case 5 | Sporadic | Sporadic | AD, sib of case 10 | AD, sib of case 9 |
| Gender | Male | Male | Male | Male | Female | Female | Male | Female | Female | Female |
| Age at examination | Fetus 25WG | Fetus 25WG | 3years | 21 years | 36years | 1.5 years | 5 years | 1 years | 2.5 years | 2.5 years |
| Downslanting palpebral fissures | ND | ND | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Absent lower eyelashes | NA | NA | ND | ND | + Medial part | + Medial part | + Medial part | + | + Medial part | + |
| Midface retrusion | ND | ND | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Micrognathia | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Ankylosis of TM joint | ND | ND | + | + | ND | ND | ND | + | ND | ND |
| Cleft palate | + | + | – | – | – | – | ND | – | + | + |
| Tracheostomy | NA | NA | – | + | – | – | + | + | – | – |
| Ears | Dysplastic | Low-set | Low-set, posteriorly rotated, hypoplastic helix, large lobule | Dysplastic | Auditory canal stenosis | Auditory canal stenosis | Low-set, hypoplastic helix, large lobule, auditory canal stenosis | Low-rotated, hypoplastic helix, large lobule | Hypoplastic helix, large lobule, preauricular tags | Low-set, unilateral preauricular tag |
| Hearing loss | NA | NA | + Conductive | + Conductive | – | – | + | + Conductive | + Conductive | + Conductive |
| Upper limbs | Absent thumbs, unilateral radioulnar synostosis | Absent thumbs, bilateral radial and ulnar hypoplasia, bilateral radioulnar synostosis | Absent thumbs and unilateral 2nd finger duplication, bilateral radioulnar synostosis | Hypoplastic thumbs, bilateral radioulnar synostosis | Bilateral metacarpo phalangeal synostosis of thumbs | Bilateral radial hypoplasia, thenar hypoplasia, limited pron- supination, 1st ray metacarpo phalangeal synostosis | Hypoplastic thumbs, hypoplasia of radial head and inferior humeral metaphysis | Absent thumbs, malformation of radial head with limitation of motion, without synostosis | Hypoplastic thumbs | Hypoplastic thumbs, bilateral radioulnar synostosis |
| Weight/stature/OFC (SD) | –1/–1/–1 | –2/–2/–2 | –1.5/–1/–0.5 | –2/–2.5/0 | ND/–0.5/–2.5 | ND/–1/–2 | 0/0/0 | 0/–0.5/–2 | –2.5/–3/–2 | 0/0/+2 |
| Development | NA | NA | Normal | Normal | Normal | Normal | Normal | Normal | Psychomotor retardation | Normal |
| Other anomalies | – | – | Patent ductus arteriosus | Oligodontia | – | Bilateral metatarsus varus | Bilateral club-foot and hypoplasia of 1st metatarsal | Falot tetralogy | Ptosis, epicanthic folds, hypertelorism | Ventricular septal defect |
| Molecular | | | | | | | | | | |
| <i>SF3B4</i> mutation | c.1A>G | c.1A>G | c.452C>A | c.577C>T | c.671_674delins CTCCCA | c.671_674delins CTCCCA | c.817delC | c.1229delC | c.914-1G>A | c.914-1G>A |
| Site | Exon 1 | Exon 1 | Exon 3 | Exon 3 | Exon 3 | Exon 3 | Exon 4 | Exon 6 | Intron 4 | Intron 4 |
| Peptide | p.Met1? | p.Met1? | p.Ser151* | p.Arg193* | p.Val224Alafs*97 | p.Val224Alafs*97 | p.His273Metfs*47 | p.Pro410Hisfs*48 | p.? | p.? |
| Predicted effect | Loss of initiator methionine | Loss of initiator methionine | Nonsense | Nonsense | Frameshift | Frameshift | Frameshift | Frameshift | Splice | Splice |
| Inheritance | <i>De novo</i> | <i>De novo</i> | <i>De novo</i> | <i>De novo</i> | ND | Inherited | ND | <i>De novo</i> | Inherited | Inherited |

Table 1. Continued

| | Case 11 | Case 12 | Case 13 | Total (our series and literature) | Case 14 | Case 15 | Case 16 | Case 17 | Case 18 | Total (our series and literature) |
|---------------------------------|------------------------------|---------------------------------|--|-----------------------------------|---|--|--|---------------------------------|----------------------|-----------------------------------|
| Clinical | | | | | | | | | | |
| Inheritance | AD, mother of cases 9 and 10 | Sporadic | Sporadic | | AD | Sporadic | Sporadic | AD | Sporadic | |
| Gender | Female | Female | Female | | Male | Male | Female | Male | Male | |
| Age at examination | 31 years | 14 years | Fetus 28WG | | 2 years | 4 years | Birth | 31 years | 2 years | |
| Downslanting palpebral fissures | + | - | + | 36/39 (92%) | - | + | + | - | + | 5/10 (50%) |
| Absent lower eyelashes | ND | + | + | 22/27 (81%) | ND | - | + | - | + | 3/9 (33%) |
| Midface retrusion | + | + | - | 34/35 (97%) | - | - | + | - | + | 4/10 (40%) |
| Micrognathia | + | + | + | 43/44 (98%) | + | + | + | - | + | 8/10 (80%) |
| Ankylosis of TM joint | ND | ND | ND | 7/9 (78%) | ND | ND | ND | - | + | 1/5 (20%) |
| Cleft palate | ND | - | - | 26/40 (65%) | + | - | + | - | + | 4/10 (40%) |
| Tracheostomy | - | - | NA | 14/32 (44%) | + | - | - | - | + | 3/10 (30%) |
| Ears | Hypoplastic helix | Hypoplastic helix, large lobule | Low-set, posteriorly rotated, hypoplastic helix, large lobule, auditory canal stenosis | 37/40 (93%) | Low-set, posteriorly rotated | Bilateral absent auditory canals, microtia | Dysplastic | Normal | Dysplastic, microtia | 9/10 (90%) |
| Hearing loss | ND | + Conductive | NA | 30/34 (88%) | ND | + conductive | + | - | + | 3/8 (38%) |
| Upper limbs | Hypoplastic thumbs | Hypoplastic thumbs | Absent thumbs, bilateral limitation of elbow motion | 42/42 (100%) | Hypoplastic thumbs, bilateral radioulnar synostosis | Hypoplastic thumbs | Hypoplastic thumbs, unilateral radioulnar synostosis | Bilateral radioulnar synostosis | - | 8/9 (89%) |
| Weight/stature/OFC (SD) | ND | -1/-1/-1 | 0/+1.5/+1 | | ND | Normal at birth | Normal at birth | Normal | ND | |
| Development | Normal | Normal | NA | 8/31 (26%) | ND | Normal | Normal | Normal | Normal | 0/7 (0%) |
| Other anomalies | - | - | Large and short halluces | | Pituitary insufficiency | Hypertelorism, bilateral cryptorchidism | - | - | Sparse hair | |
| Molecular | | | | | | | | | | |
| <i>SF3B4</i> mutation | c.914-1G>A | c.830C>A | c.1060dupC | | - | - | - | - | - | |
| Site | Intron 4 | Exon 4 | Exon 5 | | - | - | - | - | - | |
| Peptide | p.? | p.Ser277* | p.Arg354Profs*132 | | - | - | - | - | - | |
| Predicted effect | Splice | Nonsense | Frameshift | | - | - | - | - | - | |
| Inheritance | ND | ND | ND | | NA | NA | NA | NA | NA | |

AD, autosomal dominant; ND, not determined; NA, non applicable; OFC, occipito-frontal circumference; SD, standard deviation; TM, temporomandibular; WG, weeks' gestation; y, years old.

Discussion

Le séquençage du gène *SF3B4* chez les 18 patients de notre cohorte a permis de confirmer son implication majeure dans le Syndrome de Nager, avec une anomalie moléculaire identifiée chez environ deux tiers des familles.

La description clinique de nos 18 patients souligne une incidence accrue des cardiopathies congénitales chez ces patients, proche de 15% chez les porteurs d'une mutation *SF3B4*. Ceci est concordant avec le fait que l'orthologue murin de *SF3B4* est exprimé au cours du développement cardiaque (Ruiz-Lozano et al., 1997).

De plus, nous avons décrit la présence d'une atteinte des membres inférieurs chez nos patients à type d'anomalies mineures comme une hypoplasie du premier métatarsien, un hallux court ou des pieds bots, ce qui est également concordant avec l'expression du gène dans le membre inférieur chez la souris. Au vu de ces observations, le diagnostic de Syndrome de Nager ne doit donc pas être remis en question en cas d'atteinte des membres inférieurs.

Enfin, il s'agissait chez nos patients porteurs d'une mutation *SF3B4* d'une majorité de cas sporadiques par mutation *de novo*, ce qui a permis de délivrer un conseil génétique rassurant aux parents.

La dysostose acrofaciale de Nager, constitue un nouvel exemple d'affection développementale en rapport avec une dérégulation génique. Elle appartient à un groupe grandissant d'affections en lien avec une altération de l'épissage que l'on peut regrouper sous le terme de « splicéosomopathies ». Le gène *SF3B4*, en cause dans près de deux-tiers des cas, code la protéine SAP49 qui joue un rôle dans l'épissage médié par le splicéosome majeur.

L'épissage alternatif est une caractéristique de la régulation du transcriptome des eucaryotes et près de 95% des transcrits humains multi-exoniques y sont sujets (Pan et al., 2008). Il est régulé différemment selon le type cellulaire et le stade de développement, cette régulation contrôlant l'expression spatiale et temporelle des différentes isoformes. L'épissage alternatif enrichit le protéome des organismes supérieurs mais accroît également leur complexité de fonctionnement, augmentant d'autant leur susceptibilité aux pathologies. Les mutations des composants de la machinerie d'épissage ou de ses régulateurs peuvent potentiellement altérer l'expression de gènes multiples. Le faible nombre de pathologies en rapport actuellement décrites est probablement lié à la létalité cellulaire ou embryonnaire de ces mutations (Kalsotra and Cooper, 2011). Néanmoins, en plus du Syndrome de Nager,

plusieurs affections en lien avec une altération de la machinerie d'épissage ont été décrites ces dernières années : certaines formes autosomiques dominantes de rétinite pigmentaire (Chakarova et al., 2002; McKie et al., 2001; Vithana et al., 2001), le syndrome de Taybi Linder (ou nanisme primordial ostéodysplasique avec microcéphalie de type 1, MOPD1) (Edery et al., 2011; He et al., 2011), et la dysostose mandibulo-faciale type Guion-Almeida (Lines et al., 2012). Dans ces affections, la raison pour laquelle une altération de la machinerie d'épissage ubiquitaire a des conséquences uniquement tissu-spécifiques est mal connue.

A l'heure actuelle, les gènes dérégulés au cours du développement des membres dans le Syndrome de Nager ne sont pas identifiés. Compte tenu des anomalies préaxiales observées chez les patients, la dérégulation de la voie de signalisation de *SHH* est probable. Cependant, en plus de son rôle dans l'épissage, la protéine SAP49 intervient dans la voie de signalisation des BMPs au cours du développement squelettique en inhibant la différenciation ostéochondrale par liaison directe avec le récepteur BMPRIA (Watanabe et al., 2007). Ainsi, les malformations observées dans le Syndrome de Nager pourraient être liées à des anomalies de l'épissage de gènes impliqués dans le développement et/ou au rôle direct de la protéine SAP49 dans le développement squelettique.

Environ un tiers des patients atteints de Syndrome de Nager ne présentent pas de mutation ponctuelle du gène *SF3B4* (Bernier et al., 2012; Petit et al., 2014). Aussi bien dans les séries de la littérature actuelle que chez nos patients, la recherche de grands réarrangements du gène n'a pas été effectuée, suggérant que ce pourcentage puisse être sous-évalué. Depuis notre étude sur les 18 familles rapportées, le séquençage du gène *SF3B4* a été mis en place en diagnostic de routine dans le laboratoire, permettant l'identification de plusieurs autres patients porteurs de mutations ponctuelles. Afin de compléter les investigations moléculaires dans les cas pour lesquels le séquençage est négatif, la recherche de grands réarrangements du gène par PCR quantitative devra être envisagée.

Néanmoins, l'hypothèse d'une hétérogénéité génétique dans cette affection reste probable. Concernant les 5 familles pour lesquelles l'étude du gène *SF3B4* s'est avérée négative, nous participons à la collaboration FORGE Canada visant à identifier un autre gène en cause par analyse de l'exome.

CHAPITRE III

Polarisation dorso-ventrale du membre

Chapitre III : Polarisation dorso-ventrale du membre

La polarisation dorso-ventrale concerne les trois segments du membre et s'établit en parallèle de la croissance proximo-distale et de la polarisation antéro-postérieure. Ses mécanismes moléculaires s'avèrent aujourd'hui encore largement mal connus et peu d'affections en lien avec un défaut de cette polarisation sont décrites en pathologie humaine.

I. Centre de signalisation : l'ectoderme dorsal

La polarisation dorso-ventrale des membres est initiée précocement au cours du développement sous le contrôle de l'ectoderme dorsal. Les interactions cellulaires entre l'ectoderme et le mésoderme nécessaires à l'établissement de cette polarisation ont été mises en évidence par des greffes tissulaires expérimentales (Geduspan and MacCabe, 1989; MacCabe et al., 1974). Il a été observé que la rotation de l'ectoderme autour de l'axe dorso-ventral induit une inversion de la polarisation du mésoderme. L'ectoderme dorsal acquiert cette capacité de signalisation précocement au cours du développement du bourgeon de membre sous le contrôle de la voie de signalisation canonique WNT médiée par la β -Caténine. En effet, un membre de cette famille de protéines sécrétées, *Wnt7a*, est exprimé sélectivement dans l'ectoderme dorsal du bourgeon de membre chez la souris (Parr et al., 1993) et le poulet (Dealy et al., 1993). Son inactivation chez la souris induit un phénotype « double-ventral » (Cygan et al., 1997; Parr and McMahon, 1995). De plus, l'apparition de son expression dans l'ectoderme coïncide avec l'acquisition de la capacité dorsalisante (Riddle et al., 1995).

II. La voie de signalisation *Wnt7a*

Les gènes *Wnt* des vertébrés sont des orthologues du gène *Wingless* de la *Drosophile* impliqué dans le développement de l'aile (Sharma and Chopra, 1976). Ils codent pour des protéines sécrétées qui se lient à leurs récepteurs membranaires, déclenchant une cascade de signalisation. Les récepteurs sont composés de la protéine Frizzled et d'un co-récepteur LRP5/6 (low density lipoprotein receptor-related protein). *Wnt7a* est capable du déclenchement de deux voies principales de signalisation : la voie canonique Wnt/ β -Caténine et la voie non canonique indépendante de la β -Caténine. C'est cette dernière qui est impliquée dans la polarisation dorso-ventrale du membre.

II.1 Voie canonique de la β -Caténine

En l'absence de signalisation Wnt, la β -Caténine cytoplasmique est présente à taux faible du fait de sa dégradation continue par le protéasome, qui est contrôlée par un complexe composé de plusieurs protéines dont APC (Adenomatous Polyposis Coli), GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3) et Axin (Axis Inhibitor) (Figure 28).

Suite à la fixation de Wnt7a sur son récepteur, la β -Caténine intracellulaire est stabilisée. Cette stabilisation est liée au fait que le récepteur se lie aux protéines Dsh (Dishevelled) et Axin, empêchant la formation du complexe protéique de dégradation de la β -Caténine. Ainsi, la β -Caténine s'accumule dans le cytoplasme et se lie à la E-Cadherine (protéine de surface impliquée dans les interactions cellulaires), ce complexe jouant un rôle dans la chondrogenèse. De plus, la β -Caténine s'accumule dans le noyau pour interagir avec les facteurs de transcription notamment le facteur TCF (T Cell Factor) (Figure 28)(Logan and Nusse, 2004).

La voie canonique est impliquée dans les interactions entre l'ectoderme dorsal et les deux autres centres de signalisation du bourgeon (ZPA et AER).

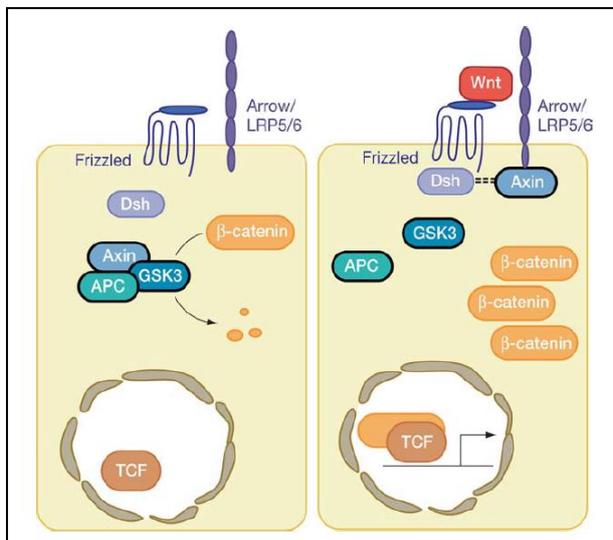


Figure 28 : Voie de signalisation canonique Wnt/ β -Caténine.

En l'absence de signalisation Wnt (panel de gauche), la β -Caténine est dégradée par un complexe protéique comprenant Axin, GSK3 et APC. Lorsque les protéines Wnt se lient à leur récepteur Frizzled/LRP, le signal est transduit aux protéines Dsh et Axin. La dégradation de la β -Caténine est inhibée et cette protéine s'accumule dans le cytoplasme et le noyau où elle interagit avec les facteurs de transcription TCF. Ainsi, la voie de signalisation canonique Wnt permet la stabilisation de la β -Caténine et favorise son internalisation nucléaire pour l'activation de la transcription. D'après Logan and Nusse, 2004.

II.2 Voie non canonique

La voie non canonique de Wnt7a est indépendante de la β -Caténine. Elle est régulée par deux principaux antagonistes, Dickkopf-1 (Dkk1) et Engrailed-1 (En1). C'est cette voie qui est impliquée dans la polarisation dorso-ventrale du membre.

Le déterminisme moléculaire de ce processus est encore mal connu. Les gènes présentant une expression différentielle au niveau du bourgeon de membre selon l'axe dorso-ventral constituent des candidats potentiels. Parmi ceux-ci, le gène codant le facteur de transcription à LIM-homéodomaine *LMX1B* (LIM (Lin-1, Isl-1 and Mec-3)-homeodomain transcription factor 1 beta) est exprimé dans le mésoderme, au même stade de développement que *WNT7a* (Figure 29). Son expression est ensuite rapidement restreinte au niveau du mésoderme dorsal (Loomis et al., 1998; Riddle et al., 1995). L'expression ectopique de *WNT7a* dans l'ectoderme est suffisante pour induire et maintenir celle de *LMX1B* au niveau du mésoderme sous-jacent. De plus, l'expression ectopique de *LMX1B* dans le mésenchyme ventral induit une dorsalisation des structures (Riddle et al., 1995). En revanche, l'étude de modèles murins KO pour *Wnt7a* a montré que l'expression précoce de *Lmx1b* est indépendante de *Wnt7a* (Loomis et al., 1998).

En parallèle, le gène codant le facteur de transcription *Engrailed-1* est exprimé dans l'ectoderme ventral du bourgeon de membre (Davis et al., 1991; Gardner and Barald, 1992), où il inhibe l'expression de *Wnt7a* (Logan et al., 1997; Loomis et al., 1998) (Figure 29). Les modèles murins où *En1* est invalidé présentent une expression de *Wnt7a* et *Lmx1b* étendue au niveau ventral, entraînant un phénotype « double-dorsal » (Chen and Johnson, 2002; Chen et al., 1998a; Cygan et al., 1997; Loomis et al., 1998). *En1* est lui-même induit dans l'ectoderme ventral par la voie de signalisation des BMPs via leur récepteur de type I *BMPR1A* (Pizette et al., 2001). L'invalidation de cette voie aboutit à une dérégulation de *Wnt7a* et à un phénotype « double-dorsal » (Ahn et al., 2001).

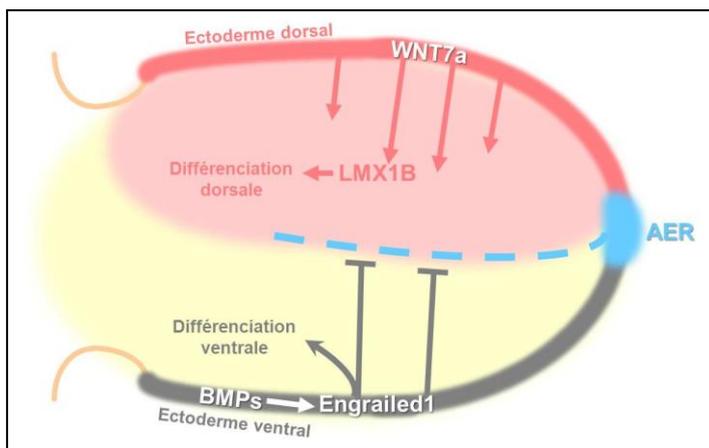


Figure 29 : Voie de signalisation de la polarisation dorso-ventrale du membre.

WNT7a est exprimé par l'ectoderme dorsal tandis qu'il est réprimé au niveau ventral par *Engrailed1*, lui-même induit dans l'ectoderme ventral par les BMPs. *WNT7a* active l'expression de *LMX1B* dans le mésoderme sous-jacent, entraînant une différenciation dorsale des structures. En l'absence d'induction de *LMX1B*, les structures se différencient selon un pattern ventral sous l'influence d'*Engrailed1*. Modifié d'après Loomis et al., 1998.

III. Modèle d'étude : le Syndrome Nail-Patella

III.1 Caractéristiques cliniques

Le syndrome Nail-Patella (NPS), également connu sous le nom d'ostéonychodysplasie héréditaire, est une affection autosomique dominante dont l'incidence est estimée à 1/50000 naissances, touchant plus de 700 personnes en France.

Les anomalies du squelette, notamment des membres, sont caractéristiques et correspondent à un défaut de polarisation dorso-ventrale (McIntosh et al., 2005; Sweeney et al., 2003). On observe de façon quasi-constante des anomalies des ongles d'expressivité variable : ongles absents, hypoplasiques, dystrophiques, striés, ou présentant une lunule d'aspect triangulaire. L'atteinte des ongles prédomine au niveau du premier rayon et s'atténue progressivement vers le 5^e rayon. Un autre élément typique du NPS est l'anomalie des rotules, qui peuvent être absentes, hypoplasiques, ou de forme irrégulière. La rotule est souvent mal-posée au niveau latéral et supérieur. Les symptômes en lien avec ces anomalies des genoux sont des luxations ou subluxations de rotule, des arthralgies, une instabilité ou des blocages du genou, un défaut d'extension du genou, une arthrose précoce. Les anomalies des coudes comportent une limitation de l'extension et de la prono-supination, ou un cubitus valgus. Sur le plan radiologique, on note une dysplasie de la tête radiale qui peut être responsable de luxations. Enfin, un signe radiologique pathognomonique du NPS est la présence de cornes iliaques, correspondant à des processus osseux coniques se projetant en postéro-latéral au niveau de la partie centrale de l'os iliaque. Certains patients présentent des défauts de mobilité voire des luxations ou subluxations de hanche.

En association aux anomalies des membres, on observe de façon fréquente une atteinte rénale ou ophtalmologique chez les patients NPS. L'atteinte rénale dans le NPS est le principal facteur impactant l'espérance de vie. Elle concerne environ 22% à 60% des patients (Bennett et al., 1973; Bongers et al., 2005; Granata et al., 2008; McIntosh et al., 2005; Sweeney et al., 2003). Les premiers signes sont l'apparition d'une protéinurie avec ou sans hématurie (Gubler et al., 1980). Celle-ci peut rester asymptomatique ou progresser vers un syndrome néphrotique voire vers l'insuffisance rénale chez 10% des patients. Les anomalies ultrastructurales observées sont l'épaississement de la membrane basale glomérulaire qui présente un aspect discontinu et la présence de fibres collagéniques au niveau de la membrane basale et de la matrice mésangiale (Bennett et al., 1973; Morello et al., 2001).

Enfin, l'anomalie ophtalmologique la plus fréquemment observée dans le NPS est le glaucome à angle ouvert, ou plus rarement associé à une hypertension intraoculaire (Lichter et al., 1997; Vollrath et al., 1998). Près de la moitié des patients vont développer un glaucome, dont la pathogenèse dans le NPS n'est pas connue. Plus rarement, des malformations de type microcornée, sclérocornée ou cataracte congénitale peuvent être présentes.

Plus récemment, des manifestations neurologiques ont été décrites comme faisant partie du tableau clinique du NPS. Une association entre NPS, troubles de l'attention/hyperactivité et dépression a été suggérée (Lopez-Arvizu et al., 2011). De plus, les patients peuvent présenter des signes de neuropathie : paresthésies intéressant les mains ou les pieds, déficit de sensibilité thermique et à la douleur (Dunston et al., 2005; Sweeney et al., 2003). Enfin, une presbyacousie précoce a été décrite (Bongers et al., 2005).

III.2 Le gène *LMX1B*

LMX1B est à l'heure actuelle le seul gène connu comme responsable du NPS. Il a pu être mis en cause suite à sa localisation par clonage positionnel en 9q34, dans l'intervalle précédemment identifié comme lié au NPS (Iannotti et al., 1997). L'étude du développement des membres chez l'embryon de poulet avait en effet permis d'identifier l'implication de son orthologue *Lmx1* dans la polarisation dorso-ventrale (Riddle et al., 1995). De plus, des souris KO pour *Lmx1b* ont été générées, ces animaux présentant un phénotype caractérisé par l'absence d'ongle et de rotule (Chen et al., 1998a). Devant ces observations, l'implication du gène *LMX1B* dans le NPS a pu être confirmée par l'identification de mutations *de novo* du gène *LMX1B* chez 3 patients atteints de forme sporadique de NPS (Dreyer et al., 1998). Depuis, près de 170 mutations du gène ont été rapportées dans la base de données HGMD® (Human Gene Mutation Database).

Le gène *LMX1B*, dont la séquence est riche en guanine-cytosine, comprend 8 exons (Vollrath et al., 1998) (Figure 30). La taille de son transcrit a été évaluée à 7 kb (Dreyer et al., 1998; McIntosh et al., 1998; Vollrath et al., 1998). L'épissage alternatif des derniers 21 nucléotides de l'exon 7 a été rapporté (Seri et al., 1999).

Son site d'initiation de la transcription est localisé au niveau d'un cluster de 4 îlots CpG et n'est pas associé à une TATA box. Le promoteur contient des boîtes CCAAT et des sites de fixation aux facteurs de transcription SP1, OCT1 (Organic Cation Transporter 1) et TCF1 (Dunston et al., 2004). Le 5'-UTR s'étend sur 1,3 kb en amont du site d'initiation de la traduction. Un deuxième cadre ouvert de lecture a été identifié en 2004, permettant de

redéfinir le site d'initiation de la transcription (Dunston et al., 2004). Les publications antérieures présentent ainsi un décalage de 69 nucléotides (soit 23 acides aminés) par rapport à la nomenclature actuelle (hg19 build). La taille du promoteur minimal a été évaluée à 112 pb en amont du site d'initiation de la transcription (Dunston et al., 2004). Le 3'-UTR a été estimé à environ 4,6 kb en aval du codon de terminaison de la traduction (Dunston et al., 2004).

Le gène est hautement conservé au cours de l'évolution des vertébrés (Chen et al., 1998a; Pressman et al., 2000; Vollrath et al., 1998). L'alignement inter-espèces des séquences s'étendant de 98,5 kb en amont à 113,6 kb en aval des bornes du transcrit met en évidence une importante conservation de ces séquences codantes et non codantes. En particulier, il existe au sein de l'intron 2 cinq régions d'environ 250 pb avec plus de 85% d'identité entre les séquences humaine et murine, suggérant un rôle fonctionnel notamment dans la régulation (Dunston et al., 2004). Cet intron 2 a une taille particulièrement importante, s'étendant sur environ 75 kb chez l'homme.

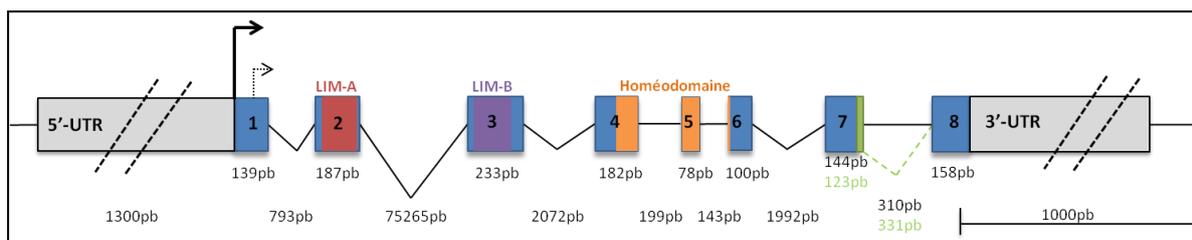


Figure 30 : Schéma du gène *LMX1B*.

III.3 La protéine *LMX1B*

Le facteur de transcription *LMX1B* appartient à la famille des protéines LIM-HD caractérisées par la présence de deux domaines LIM en tandem riches en cystéine/histidine (LIM-A et LIM-B) en amino-terminal, d'un homéodomaine central riche en glutamines, et d'un domaine putatif d'activation transcriptionnelle en carboxy-terminal (Curtiss and Heilig, 1998; Dawid et al., 1995) (Figure 31). La protéine *LMX1B* est composée de 395 ou 402 acides aminés (selon la sélection du site d'épissage en 3' de l'exon 7) (Dunston et al., 2004). Ces deux isoformes diffèrent par la présence ou non de 7 acides-aminés au niveau du domaine carboxy-terminal (Seri et al., 1999), mais il ne leur est pas connu de différence fonctionnelle.

Les domaines LIM sont composés de deux doigts de zinc et comportent une séquence consensus dont les résidus conservés sont importants dans la liaison aux ions zinc (Freyd et al., 1990; Michelsen et al., 1993). LIM correspond aux premières lettres des trois premières

protéines décrites comportant un tel domaine (protéines Lin-11 chez *C. elegans*, Isl-1 chez le rat et Mec-3 chez *C. elegans*). Ils sont impliqués dans les interactions protéiques, en particulier avec des protéines régulatrices de la transcription (Dawid et al., 1995). Parmi celles-ci, les protéines CLIM2 (activation de la transcription) et RLIM (inhibition de la transcription) interagissent avec LMX1B (Marini et al., 2003; Ostendorff et al., 2002). Les deux domaines LIM sont codés respectivement par les exons 2 et 3 du gène *LMX1B* (Figure 30).

L'homéodomaine est codé par les exons 4, 5 et 6 du gène *LMX1B* (Figure 30). Il est nécessaire à la liaison avec l'ADN pour l'activation transcriptionnelle. Sa séquence est hautement conservée au cours de l'évolution. Il s'agit d'un domaine de 60 acides-aminés présentant une séquence caractéristique de 3 acides-aminés Thréonine-Glycine-Leucine en position 38 à 40 (Banerjee-Basu and Baxevanis, 2001). Il a été démontré par des expériences de retard sur gel que l'homéodomaine de LMX1B se lie à un élément FLAT (TTAATAATCTAATTA) (Dreyer et al., 1998; German et al., 1992; McIntosh et al., 1998).

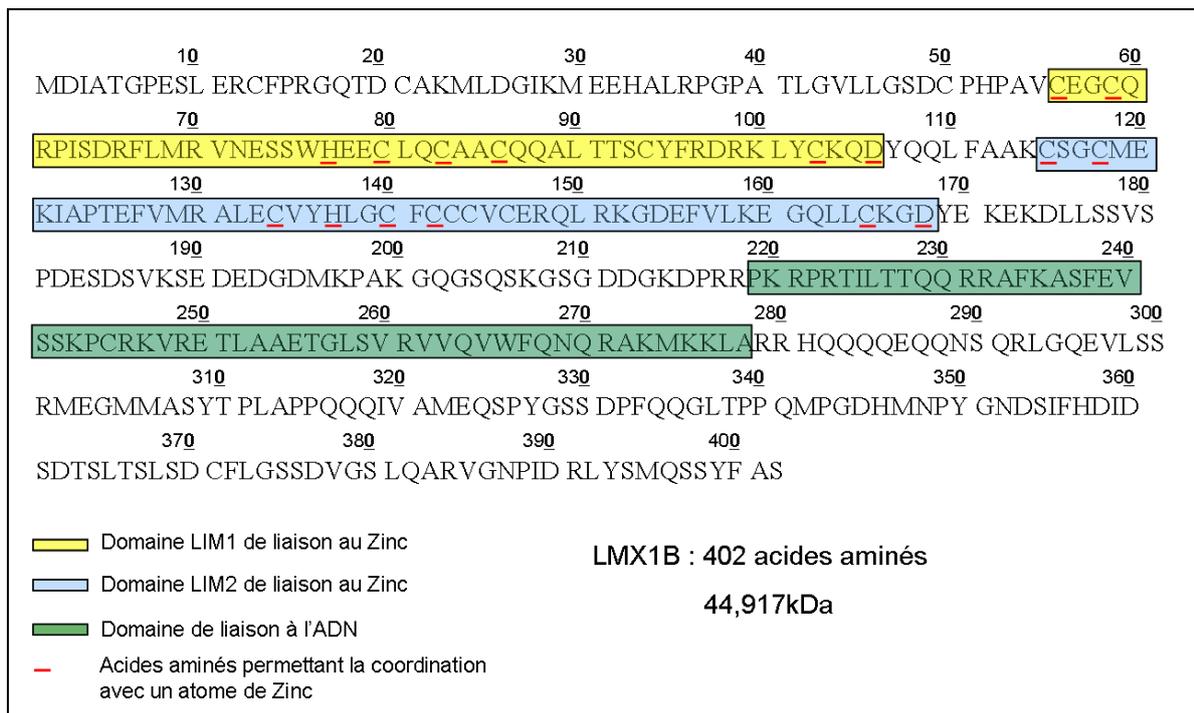


Figure 31 : Séquence de la protéine LMX1B et localisation de ses domaines fonctionnels.

III.3.1 Rôle de *LMX1B* dans le développement

L'étude de la fonction de LMX1B au cours du développement a été facilitée par l'utilisation du modèle murin knock-out homozygote. Ces souris présentent un phénotype

sévère avec décès au premier jour de vie. Contrairement à ce qui est observé chez l'homme, les souris hétérozygotes ont un phénotype normal (Chen et al., 1998a).

III.3.1.1 Développement squelettique

LMX1B est exprimé dans le mésenchyme dorsal du bourgeon de membre chez les vertébrés et joue un rôle crucial dans l'établissement de l'axe dorso-ventral (Figure 32). Son expression est induite par WNT7A qui est sécrété par l'ectoderme dorsal du bourgeon de membre (Riddle et al., 1995; Vogel et al., 1995). Une fois l'axe dorso-ventral établi, *LMX1B* active l'expression de nombreux gènes à action dorsalisante et inhibe l'expression des gènes à action ventralisante, devenant le principal orchestrateur du développement des structures dorsales telles que les ongles, les follicules pileux et les muscles extenseurs (Chen et al., 1998a). Les effecteurs d'aval de la polarisation dorso-ventrale sont encore mal connus. Des études en puces d'expression des bourgeons de membres isolés d'embryons murins knock-out pour *Lmx1b* ont permis d'identifier plusieurs centaines de candidats potentiels, présentant une expression différentielle chez les embryons sauvages (Feenstra et al., 2012; Krawchuk and Kania, 2008).

Chez la souris, *Lmx1b* est exprimé à partir du stade E8.5 dans la plaque mésodermique latérale (Cygan et al., 1997). Cette expression est restreinte au mésenchyme dorsal du bourgeon de membre, puis aux régions dorsales des articulations ainsi qu'aux tendons et

ligaments, jusqu'au stade E18.5 où elle n'est plus détectée (Dreyer et al., 2000). Aucune expression n'est mise en évidence durant le développement musculaire (Dreyer et al., 2004; Schweizer et al., 2004).

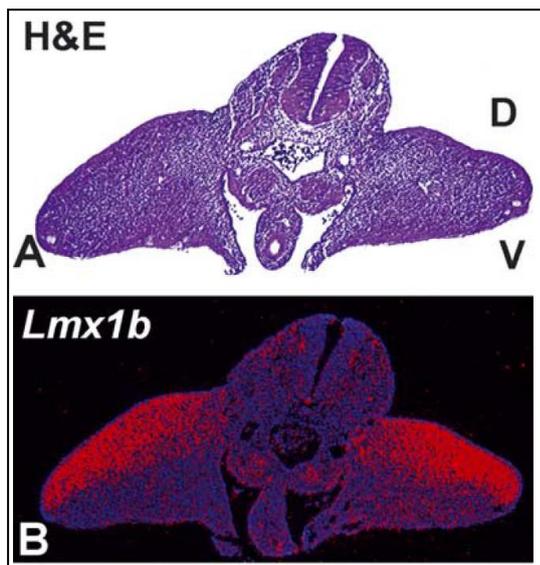


Figure 32 : Expression de *Lmx1b* dans le bourgeon de membre supérieur.

Stade 13.5 de développement chez la souris.

A : Coloration à l'hématoxyline-éosine d'une section embryonnaire montrant une répartition homogène du mésoderme dans l'axe dorso-ventral (D/V) du bourgeon de membre.

B : Hybridation *in situ* montrant la restriction de l'expression de *Lmx1b* au niveau du mésoderme dorsal (en rouge). D'après Dreyer et al., 2004.

Les anomalies des membres observées chez la souris KO pour *Lmx1b* sont plus sévères que le phénotype humain, avec une absence d'ongle et de rotule (Chen et al., 1998a).

De plus, on note au niveau des membres un phénotype « double-ventral », le dos de la patte étant une reproduction en miroir de ses structures ventrales (Figure 33). Les anomalies proximales sont plus difficiles à caractériser : absence de la partie distale de l’ulna, hypoplasie de la scapula et anomalies des clavicules. Ces anomalies reflètent les territoires d’expression de *Lmx1b* au niveau du mésenchyme dorsal du bourgeon de membre et sont compatibles avec un défaut de polarisation dorso-ventrale (Chen et al., 1998a; Chen et al., 1998b; Cygan et al., 1997; Dreyer et al., 2000).

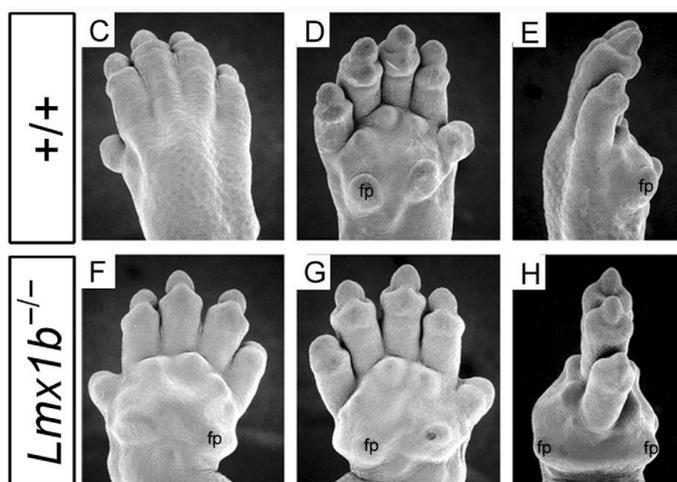


Figure 33 : Perte de la polarisation dorso-ventrale des membres chez la souris KO LMX1B.

Photographies de l’extrémité du membre supérieur au stade de développement E16.5. C-E : souris sauvage ; F-G : souris KO LMX1B. C,F : vue dorsale ; D,G : vue ventrale ; E,H : vue latérale. Mise en évidence d’une absence de structures dorsales (follicules pileux) et de la présence de structures ventrales (coussinets, fp foot pad) chez la souris KO. D’après Chen et al., 1998a.

De plus, la perte d’expression de *Lmx1b* est responsable d’une altération de la migration des axones moteurs de la corne latérale de la moelle épinière (Kania et al., 2000). Normalement, les axones se divisent à la base du membre pour former des contingents médial et latéral migrant au niveau des structures ventrales et dorsales respectivement. En l’absence de *Lmx1b*, la migration de ces axones est aléatoire. Comme *Lmx1b* n’est pas exprimé dans les colonnes motrices de la moelle épinière, ce phénotype est probablement dû à la perte de l’identité dorsale dans le bourgeon de membre résultant en l’expression aberrante des molécules de guidance dirigeant l’innervation des axones (Kania and Jessell, 2003; Kania et al., 2000).

En plus des anomalies squelettiques des membres, les souris KO pour *Lmx1b* présentent des anomalies du crâne avec une hypoplasie ou une absence d’os supraoccipital et interpariétal ainsi qu’une anomalie des sutures (Chen et al., 1998a). *Lmx1b* est exprimé dans le neuroépithélium sous-jacent et dans le mésenchyme contribuant à la formation de la voûte crânienne. En revanche, aucune anomalie du crâne n’a été décrite chez les patients NPS, ce

qui est concordant avec la faible expression relative de *LMX1B* dans cette structure. Les mécanismes moléculaires expliquant ces anomalies sont mal connus.

III.3.1.2 Développement du rein

L'expression de *Lmx1b* est détectée précocement au cours du développement rénal chez la souris, dès E13.5, au niveau des corps en s qui vont former les glomérules. Elle est ensuite détectable au niveau de l'épithélium du glomérule à partir de E14.5, et persiste durant la vie postnatale (Chen et al., 1998a; Morello et al., 2001).

Les souris KO pour *Lmx1b* décèdent quelques heures après la naissance en raison d'une néphropathie sévère, confirmant le rôle essentiel de ce gène dans le développement rénal. Le phénotype histologique rénal de ces souris est similaire aux anomalies décrites chez les patients NPS. On observe un épaissement de la membrane basale glomérulaire, une fusion des pieds des podocytes (Chen et al., 1998a; Morello et al., 2001). Des défauts dans la différenciation des podocytes sont également observés (Rohr et al., 2002). Des expériences de knock-out conditionnel ont montré que *Lmx1b* est nécessaire à la différenciation initiale et au maintien des podocytes (Burghardt et al., 2013; Suleiman et al., 2007).

L'absence de *Lmx1b* résulte en la dérégulation de l'expression de ses nombreuses cibles, jouant un rôle dans la formation de la barrière de filtration : les collagènes alpha 3(IV) et alpha4(IV), la podocine, Cd2ap et la néphrine (Miner et al., 2002; Morello et al., 2001; Rohr et al., 2002).

III.3.1.3 Développement de l'oeil

L'expression de *Lmx1b* au cours du développement de l'œil est détectée au niveau du mésenchyme périoculaire, à l'origine de la sclère et de la cornée, et également au niveau de la chambre antérieure. Les souris knock-out ne présentent pas d'anomalie de la sclère, en revanche une expression anormale du kératocane et une fibrillogenèse anormale du collagène sont décrites au niveau de la cornée (Pressman et al., 2000). De plus, on note des anomalies de la chambre antérieure avec un iris et des corps ciliaires hypoplasiques (Pressman et al., 2000).

III.3.1.4 Développement du système nerveux central

Lmx1b est impliqué dans le développement et la fonction cérébrale. Son expression est initiée chez la souris dès E7.5 au niveau de la partie antérieure de l'embryon, puis est

restreinte à l'isthme à partir de E9.0 (Guo et al., 2007). L'isthme est un centre organisateur du développement au niveau du tube neural, permettant la séparation du mésencéphale et du rhombencéphale. *Lmx1B* est essentiel à son induction (Adams et al., 2000; Guo et al., 2007; Matsunaga et al., 2002; O'Hara et al., 2005). Chez les souris KO, il n'y a pas d'expression des facteurs de transcription de l'isthme, causant une hypoplasie sévère du tectum et du cervelet (Guo et al., 2007). A l'inverse, l'expression ectopique de *Lmx1b* chez l'embryon de poulet est responsable d'une hypertrophie de ces structures (Adams et al., 2000; Matsunaga et al., 2002).

De plus, *Lmx1b* est nécessaire au développement du système dopaminergique mésencéphalique (Asbreuk et al., 2002; Smidt et al., 2000), des neurones sérotoninergiques du rhombencéphale (Cheng et al., 2003; Ding et al., 2003). A l'âge adulte, les neurones exprimant *Lmx1b* sont localisés dans la région dorsale de la moelle épinière et participent à la signalisation de la douleur (Ding et al., 2004).

III.3.2 *Les mutations LMX1B*

L'étude du gène *LMX1B* chez les patients atteints de NPS typique met en évidence une proportion importante de mutations, chez approximativement 85 à 90% des patients de la littérature. Il s'agit de mutations « tronquantes » situées dans les exons 2 à 5, de délétions intra-géniques ou emportant l'ensemble du gène, ou plus rarement de mutations faux-sens situées dans les domaines LIM ou HD (Bongers et al., 2008; Bongers et al., 2002; Bongers et al., 2005; Clough et al., 1999; Dreyer et al., 1998; Hamlington et al., 2001; Knoers et al., 2000; McIntosh et al., 1998; Seri et al., 1999; Vollrath et al., 1998).

Bien que plus d'une centaine de mutations aient été rapportées, seulement quelques-unes ont fait l'objet d'études fonctionnelles. Les mutations situées au niveau de l'homéodomaine abolissent la transactivation, alors que les protéines *LMX1B* mutées au niveau du domaine LIMB ou porteuses de mutations tronquantes pourraient parfois conserver une faible activité résiduelle (Bongers et al., 2008; Bongers et al., 2002; Bongers et al., 2005; Clough et al., 1999; Dreyer et al., 1998; Hamlington et al., 2001; Knoers et al., 2000; McIntosh et al., 1998; Seri et al., 1999; Vollrath et al., 1998). Ces protéines n'auraient cependant pas d'effet dominant négatif sur la protéine *LMX1B* sauvage. Le mécanisme d'action des mutations de *LMX1B* serait donc l'haplo-insuffisance pour les mutations étudiées (Bongers et al., 2005; Dreyer et al., 2000; Dreyer et al., 1998; Sato et al., 2005). Il a néanmoins été rapporté récemment une mutation à effet dominant-négatif *in vivo* chez la

souris (Cross et al., 2014), suggérant que ce mécanisme puisse également être présent chez l'homme pour certaines mutations.

Très peu de corrélations génotype-phénotype ont été observées et la variabilité d'expression est la règle au sein des familles touchées par le NPS (Bongers et al., 2005). Bongers et al. rapportent une prévalence des néphropathies significativement augmentée chez les patients porteurs d'une mutation dans le domaine HD en comparaison avec les patients porteurs d'une mutation dans les domaines LIM (Bongers et al., 2005). Le risque de néphropathie dans le NPS semble également augmenté en cas de sexe féminin. Néanmoins ils ont mis en évidence en parallèle une association significative entre l'atteinte rénale chez les patients NPS et l'existence d'antécédents familiaux de néphropathie, soulignant le rôle majeur des facteurs génétiques et environnementaux additionnels dans la survenue de l'atteinte rénale.

Plus récemment, des mutations faux-sens touchant le résidu Arginine 246 de l'homéodomaine ont été rapportées dans trois familles de patients présentant une atteinte rénale isolée à type de glomérulosclérose segmentaire et focale (Boyer et al., 2013). Cette observation a souligné une nouvelle fois le rôle de l'homéodomaine dans la fonction rénale et les auteurs émettent l'hypothèse que ce résidu jouerait un rôle spécifique dans l'interaction de LMX1B avec ses cibles dans le podocyte. Il s'agit de plus d'un nouvel argument pour supposer que certaines mutations de *LMX1B* pourraient avoir un effet dominant négatif, comme cela a été décrit *in vivo* chez la souris (Cross et al., 2014).

III.4 Nos données cliniques et moléculaires dans 55 familles de NPS

Dans le cadre de notre expertise clinico-biologique, nous avons recruté près d'une centaine de patients présentant un syndrome Nail-Patella caractérisé par des anomalies du squelette, des complications rénales et ophtalmologiques.

Dans près de 90% des familles, nous avons mis en évidence une mutation ou un réarrangement du gène *LMX1B*. Pour la moitié d'entre elles, il s'agissait de mutations récurrentes, rapportées chez plusieurs familles ou déjà décrites dans la littérature. Par ailleurs, 19 nouvelles mutations ponctuelles ont été décrites. Conformément aux séries de la littérature, environ 10% des familles étudiées (soit 5 familles) ne présentaient pas de mutation ponctuelle dans la séquence codante ni de réarrangement de *LMX1B*.

Chapitre III –Polarisation dorso-ventrale

Dans l'hypothèse d'une mutation du gène *LMX1B* localisée dans les régions non étudiées en diagnostic conventionnel, nous avons tout d'abord mis au point son séquençage complet (régions 5' et 3'-UTR, exons et introns). Le gène s'étendant sur environ 95 kb, dont un intron de 75 kb, ce projet a nécessité une approche combinant séquençage haut-débit et séquençage Sanger pour les régions où la couverture était insuffisante. Une étude de la ségrégation des variants polymorphiques identifiés, associée à l'analyse de marqueurs microsatellites a également été réalisée.

L'ensemble des données cliniques et moléculaires concernant les 55 familles étudiées sont rapportées dans le manuscrit soumis ci-après (Article 4).

III.4.1 *Article 4*

Soumis dans European Journal of Human Genetics

Nail-Patella Syndrome: clinical and molecular data in 55 families

Jamal Ghoumid^{1,2,*}, Florence Petit^{1,2,*}, Muriel Holder-Espinasse^{1,2,3}, Anne-Sophie Jourdain⁴, José Guerra¹, Anne Dieux-Coeslier¹, Martin FIGEAC⁵, Nicole Porchet^{2,3}, Sylvie Manouvrier-Hanu^{1,2}, Fabienne Escande³

¹Service de Génétique Clinique, Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU Lille, France

²Université Lille Nord de France

³Clinical Genetics Department, Guy's Hospital, London, UK

⁴Laboratoire de Biologie Moléculaire, Centre de Biologie-Pathologie, CHRU Lille, France

⁵Functional and Structural Genomic Platform, Université Lille 2, IFR 114 Lille, France

* Equal contribution

Corresponding author:

Sylvie Manouvrier-Hanu

Service de Génétique Clinique

Hôpital Jeanne de Flandre – CHRU

2, Avenue Eugène Avinée

59037 LILLE cedex

France

Tél +33 3 20 44 49 11

Fax +33 3 20 44 49 01

Email : sylvie.manouvrier@chru-lille.fr

Conflict of interest statement: The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge all families and clinicians who participated to this study: M Abramowicz, MC Addor, Antignac C, Y Alembick, JL Alessandri, C Baumann, P Blanchet, S Blesson, F Boralevi, A Boutemy, F Bridoux, I Citony-Garnon, E Colin, P Collignon, V Cormier-Daire, Dallocchio, A David, P Edery, C Francannet, C Goizet, A Hovnanian, D Lacombe, M Le Merrer, M Lebrun, B Leheup, JY Lespinasse, D Martin-Coignard, L Martorell-Sampol, G Morin, L Oprea, N Philip, M Rossi, S Sandaradura, P Sarda, S Sigaudy, M Teboul, J Vigneron, A Zankl. We also thank E Thomas for critical reading of the manuscript, MP Delescaut, and O Fruchard for their invaluable technical assistance.

ABSTRACT

Nail Patella Syndrome (NPS) is a rare autosomal dominant condition comprising nail and skeletal anomalies. Skeletal features include dysplastic patellae and iliac horns, as well as scapula and elbow dysplasia. Nephropathy and glaucoma or intra-ocular hypertension can sometimes be present. NPS is due to mutations in *LMX1B*, which encodes a LIM-homeodomain protein critical for limb, kidney and eye development. We describe the phenotype and the molecular data of 55 index patients and their 39 relatives presenting with typical NPS. We identified 38 different *LMX1B* anomalies, 19 of which were not reported before. In our series, 9% of families are not carriers of a *LMX1B* genomic alteration after extensive study of the gene, raising the hypothesis of a genetic heterogeneity.

Key Words: Nail-Patella Syndrome, *LMX1B*, limb malformation

INTRODUCTION

Nail Patella Syndrome (NPS, MIM 161200) is a rare autosomal dominant condition characterised by variable nail, skeletal, renal and ocular anomalies. The disease was first described by Chatelain, in 1820, in a patient with congenital nail, elbow and patellar defects (quoted by (1)). Further reports improved the clinical description and broadened the spectrum of associated findings (2-5). Almost all affected individuals show nail dysplasia, consisting of koilonychia, or even anonychia, usually with the ulnar side of the nail more severely affected than the radial side. Typical lunular anomalies comprise triangular or absent lunulae. The thumbnails are the most severely affected, and the severity tends to decrease towards the little finger. Skeletal features are frequently described, including patellar anomalies (hypoplasia or agenesis), iliac horns and elbow anomalies (radial head hypoplasia or dislocation) (2). Besides nail and skeletal defects, 22% to 60% patients present with renal anomalies (2, 4, 6-9), extending from asymptomatic proteinuria to end-stage renal failure (ESRF). Ocular anomalies were first described in NPS by Lichter et al.(5), corresponding to variable degree of intra-ocular hypertension (IOH), glaucoma or normal tension glaucoma. Recently, neurological features comprising peripheral neuropathies, vasomotor disorder, hyperactivity or depression were also linked to the condition (2, 4).

The disease-causing gene is *LMX1B* (MIM 602575), mapped on chromosome 9q34. It consists of eight exons spanning a region of ≈ 82 kb of genomic DNA and, encodes a LIM-homeodomain transcription factor involved in many developmental mechanisms and accounting for the pleiotropic manifestations of the disease (10, 11). The protein comprises two LIM domains (LIM-A and LIM-B) and a homeodomain (HD). The LIM domains are composed of two zinc fingers and are involved in protein-protein interactions. The homeodomain is a 60-amino acid domain, highly conserved through evolution and necessary for DNA binding and transcriptional activation (11).

The main pathogenic mechanism underlying autosomal dominant NPS in humans is haploinsufficiency (12-14). The majority of patients carry either *LMX1B* mutations or complete or partial deletions responsible for haploinsufficiency through the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) pathway (12). Missense mutations located in functional domains cause diminished transcriptional activity and DNA binding ability, thus responsible for partial loss of function of *LMX1B* (11, 13, 14). Nevertheless, while no clear genotype-phenotype correlation was apparent for extra-renal manifestations, Bongers and co-workers observed that individuals with mutations located in the homeodomain had significantly higher renal involvement raising the possibility of dominant negative and/or gain-of-function effects (2). Furthermore, recent studies in mice have demonstrated that missense mutations of the homeodomain can show dominant-negative activity *in vivo* (15).

In the present study, we describe the phenotype and molecular data of 55 index patients and their 39 relatives affected with NPS. Mutations or large rearrangements of *LMX1B* were identified in 91% of patients. Nineteen previously unreported mutations are described. In the remaining 9% of patients, no mutation was identified in *LMX1B* after further investigation and the hypothesis of a genetic heterogeneity is raised.

MATERIAL AND METHODS

Patients

We studied 94 subjects affected with NPS, 45 males and 49 females. Among them, 33 were sporadic cases and 61 individuals were members of 22 unrelated families (Table 1). Patients' samples were sent to our laboratory for *LMX1B* molecular analysis. Most of them were recruited by clinical geneticists (49 families), a few by dermatologists (2 families), paediatricians (2 families), nephrologists (2 families) and orthopaedic surgeons (1 family). The great majority were of French origin (all geographic areas), while some cases were referred from Belgium, Switzerland, Spain, Australia and USA. Clinical data were obtained

through detailed forms (describing skeletal, nail, renal and ocular features), completed by patients' referring physicians. Renal anomalies were defined as urinary total protein > 0.1 g/l (or > 0.300 g/24h) or as renal insufficiency. Ocular involvement was defined by presence of IOH (>20 mmHg), glaucoma or normal tension glaucoma. Patients' consents were obtained prior to molecular analysis.

Molecular analysis

Exons Sanger sequencing

LMX1B analysis was conducted on genomic DNA extracted from peripheral blood samples using the EZ1 DNA blood kit with the BioRobot® EZ1 (Qiagen®, Courtaboeuf, France). The 8 exons of the *LMX1B* gene and their flanking intronic regions were amplified by PCR and directly sequenced on an ABI310 genetic analyzer (Applied Biosystems®, Courtaboeuf, France). All primer sequences and reaction conditions are available on request. All mutations were described according to the nomenclature GenBank accession number NM_002316.3. In order to compare with previous literature data, the correspondence with NM_002316.2 is indicated in the Table 1.

Multiplex ligation-dependant probe amplification (MLPA)

If no mutation was found by exons sequencing, MLPA analysis was carried out in order to identify large deletions/duplications, according to the manufacturer's protocol (MRC-Holland® SALSA MLPA probe set P289, <http://www.mlpa.com>). MRC Holland Coffalyser Software was employed to analyze the results.

Array-based comparative genomic hybridization (CGH)

If no mutation was found by exon sequencing and MLPA, genome-wide analysis of DNA copy number changes was performed using the Agilent Human Genome CGH microarray 244K (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) according to the protocol provided by the manufacturer. Analysis of the data was performed with Agilent DNA Analytics 4.0

software. Classification as gain or loss was based on identification by the CGH plotter and visual inspection of the \log_2 ratios, using z -score and ADM-2 algorithms.

***LMX1B* whole sequencing**

When exon sequencing, MLPA and array-CGH were negative, we performed *LMX1B* whole sequencing in order to explore the non-coding regions (promoter, 5'UTR, introns and 3'UTR): ch9 hg19: 129,374,658-129,466,967. We designed 15 long-range PCR of approximately 10 kb covering almost entirely the *LMX1B* gene, for pyrosequencing using GS454 Junior (Roche®) technology. The sequencing reads were aligned against the human chromosome 9 reference sequence (NC_000009.11) using GenSearch Software (PhenoSystems, Wallonia, Belgium). Variant calling was performed with the following parameters: at least 5x coverage, minimal variant frequency >10%. Regions uncovered or with less than 10X depth coverage were Sanger sequenced.

RESULTS

Molecular analyses

The first *LMX1B* screening (i.e. exons Sanger sequencing and MLPA) revealed a molecular anomaly in 50 families (91%). We identified truncating mutations in 31 families (48 patients); of these, 4 families were carriers of large deletions. Missense mutations in LIM domains were found in 5 families (10 patients) and missense mutations in HD domain in 14 families (24 patients) (Figure 1, Table 1). All mutations occurred in *LMX1B* functional domains, i.e. HD, LIM-A and LIM-B domains. Several DNA changes were recurrent in our cohort: c.303_304delGT (p.Tyr102Leufs*45), c.661C>T (p.Arg221*), c.668G>A (p.Arg223Gln), c.706G>C (p.Ala236Pro) and c.736C>T (p.Arg246*) respectively identified in 3 families (Table 1). We identified 6 novel missense mutations in our series: c.784G>A (p.Val262Met) occurred *de novo* in a sporadic case (Family 44), c.436T>A (p.Cys146Ser) segregates with the

phenotype in Family 19. Parental studies were not available for the other 4 missense mutations: c.317A>C (p.Asp106Ala) (Families 14 and 15), c.701T>C (p.Phe234Ser) (Family 31), c.713T>C (p.Phe238Ser) (Family 35), c.794T>C (p.Val265Ala) (Family 45). Finally, we identified a novel in-frame insertion c.683_684insTCA (p.Gln230dup) in Family 29, for which parental studies were not available.

In 5 families, no molecular anomaly was identified in the 8 exons of *LMX1B* and no large rearrangements were detected by array-CGH. We therefore performed whole *LMX1B* sequencing, including the non-coding regions, in families 51 to 54 (DNA material was insufficient in the family 55). In average, 450 variants per patient were identified in *LMX1B*, most of them being located in intron 2 which spans approximately 75 kb. We successively filtered: 1/ The homozygous variants, assuming the autosomal dominant mode of inheritance of NPS in these families; 2/ The recurrent variants identified on control samples; 3/ The single nucleotide polymorphisms reported in dbSNP (v135) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>) or 1000 Genomes Project database (<http://www.1000genomes.org/>) with a minor allele frequency >5% . The remaining 64 variants (22 in family 51, 7 in family 52, 20 in family 53, 15 in family 54) were studied by Sanger sequencing. Familial segregation was assessed when possible (families 51 and 52), and 100 control chromosomes were screened for the validated variants. Finally, only 2 variants of uncertain significance were remaining after the filtering (chr9.hg19:g.129,413,679delG in family 52 and chr9.hg19:g.129,437,509G>T in family 54), both being located in intron 2 at long-distance from the exon-intron boundaries (Suppl. Figure 3).

Clinical findings in the 50 families with *LMX1B* mutation/deletion

Skeletal findings

In our cohort, 89% (n=73/82) patients presented with skeletal involvement (patella, scapula, elbow or pelvis) (Figure 2, Table 2). Eighty percent of patients (n=66/82) presented with bilateral patellar involvement. Patellar hypoplasia was reported in 61% of the patients (n=50/82) and patellar agenesis in 16% (n=13/82). Subluxed patellae were observed in 32% (26/82). Elbow dysplasia was present in 71% of the patients (n=54/76), corresponding to elbow limited extension in 59% (45/76), radial subluxation in 26% (20/76), and radial head anomalies in 16% (12/76). Only 37 patients had pelvis X-rays revealing iliac horns in 76% (n=28/37). Scapula involvement (thickening of the lateral border of the scapula, glenoid hypoplasia, or limitation of shoulder motion) was rare, only identified in 9% of the patients (n=7/82).

Nail involvement

Through the clinical form, we obtained information about nail involvement for 88% of the patients (n=72/82) (Figure 2, Table 2). Most patients harboured nail anomalies (96%, n=69/72). Koilonychia and longitudinal striation of nails were the most frequent defects, observed in 36/72 patients (50%). Anonychia was identified in 19/72 patients (26%) and affected mainly the thumbs. Lunulae anomalies comprised triangular lunulae (31/72 - 29%) or even absent lunulae (9/72 - 13%), affecting predominantly the first and second digits.

Renal assessments

Renal investigations, quantitative urinalysis and creatinine clearance measurements were obtained in 80% of the patients (n=68/82), aged 3 to 64 years (median 29). Proteinuria was identified in 25% (n=17/68). Three patients from family 34 had ESRF (Table 1).

Prevalence of nephropathy increased with age. We observed that 12.5% (n=3/24) of affected patients were under 15 while 32% (n=14/44) were over 15. There was no statistically significant gender difference: 19% (n=6/31) of affected patients were males versus 30% (n=11/37) who were females (p=0.48 – adjusted for age).

Ophthalmological assessments

In our cohort, 52% of the patients (n=43/82) had intraocular pressure measurements. IOH was identified in 21% of them (n=9/43). Among these 9 patients, 6 carried a truncating mutation, 2 presented with a missense mutation in LIM-A and one with a missense mutation in HD (Table 1). Five were younger than 40 years old.

Clinical findings in the 5 families without *LMX1B* anomaly

Pedigrees and clinical findings in the 5 families without *LMX1B* anomaly are depicted in Suppl. Figure 1 and summarized in Suppl. Table 1. These families were evaluated by clinical geneticists and considered typical of Nail-Patella Syndrome. The frequency of nail, elbow and patellar dysplasia, ocular and renal involvement was not statistically different from that observed in the series of patients harbouring an *LMX1B* alteration. Regarding the pelvis dysplasia (observed in 76% of patients with *LMX1B* alteration), only 3 patients had pelvis x-rays revealing no iliac horns.

DISCUSSION

LMX1B is the major gene responsible for Nail-Patella syndrome, 91% of patients in our series of 55 families harbor a mutation/deletion identified by routine diagnosis screening (exons Sanger sequencing and MLPA). We identified 38 different *LMX1B* mutations or deletions in 50 index patients and their 32 relatives. About half of the mutations were recurrent, identified in several families or already reported in the literature (Table 1). For most of them, a relationship between families or a founder effect is unlikely since they were of different ethnic origins and from different geographic areas. As previously reported, all identified mutations clustered in the LIM and HD domains (3, 16). Among the 38 different *LMX1B* anomalies, 19 were not reported before. Of these, 12 anomalies were considered clearly

pathogenic regarding their nature (frameshift, nonsense, splice mutation). The remaining anomalies were 6 missense mutations and 1 in-frame insertion. Missense mutation c.784G>A (p.Val262Met) occurred *de novo* in a sporadic case of Nail-Patella Syndrome, and is therefore likely pathogenic. Missense mutation c.436T>A (p.Cys146Ser) was found to segregate with the NPS in the family, indicating that it is likely pathogenic. Family testing was unfortunately not available for the other novel mutations. All variants altered highly conserved nucleotides up to tetraodon (<http://genome.ucsc.edu>) and were predicted *in silico* to be probably (c.436T>A, c.701T>C, c.713T>C, c.794T>C) or possibly (c.317A>C) damaging by Polyphen-2 V2.2.2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml>), and deleterious by SIFT software (<http://sift.bii.a-star.edu.sg/>). Missense c.317A>C (p.Asp106Ala) was identified in 2 unrelated families from Spain, suggesting a founder effect.

Nail and skeletal phenotypes were consistent with the literature data (Table 2) (16, 18, 19, 20, 21, 22). Almost all patients with an *LMX1B* mutation/deletion presented with nail involvement (96%). First and second digits were preferentially involved and anonychia, koilonychia, longitudinal striations, triangular and absent lunulae were observed. Patellar defects were identified in 86% and iliac horns in 76%, which is comparable with previous reports (2, 4). Upper limb defects (66%) were less frequent than lower limb anomalies (86%). Renal involvement is the major determinant of prognosis in NPS. We identified nephropathy in 25% of patients with an *LMX1B* mutation/deletion, usually consisting of proteinuria. In addition, we noted that all 6 individuals from family 34 (missense mutation in HD c.706G>C, p.Ala236Pro) presented with nephropathy, and two of them were severely affected with end-stage renal failure at 26 years old. This recurrent mutation was identified in two other sporadic cases from our cohort (families 32 and 33): the case from family 32 had nephropathy when examined at age 33, while the case from family 33 had no renal disease at age 5. The mutation had also been reported in 4 previous families (2, 3, 17). Interestingly, 4 of the 5

patients reported in the literature had nephropathy, suggesting a high prevalence of renal involvement associated with this mutation. This was consistent with previous studies showing that the p.Ala236Pro mutant has a statistically significant lower contribution to wild-type LMX1B transactivation compared to other mutants (12).

Ophthalmological anomalies were rarely reported in previous studies (2, 4, 18). In our cohort, 20% of patients with an *LMX1B* mutation/deletion presented with either IOH or glaucoma.

NPS patients showed high inter-individual and intra-familial variability, stressing the possible involvement of modifier genes in the expression of the phenotype. Through the clinical form completed by the referring physicians, we realised that patients were inadequately followed up, since most of them had no renal or ophthalmological follow-up. In agreement with previous recommendations for clinical management (2, 4), we stress the need for renal and ophthalmological follow-up in NPS patients. The annual renal screening (blood pressure and urinalysis) should be performed soon after birth, especially if a mutation in *LMX1B* homeodomain has been identified (2). The ophthalmological examination (intraocular pressure measurement, optic disc examination, and visual field assessment) should be performed every two years in any adult affected with NPS.

In 9% of the families tested, no alteration was found in *LMX1B* by the routine screening. These patients were not clinically different from the patients harbouring an *LMX1B* alteration. Analyses were pursued in 4 families by whole *LMX1B* next-generation sequencing. Only 2 variants located within the large intron 2 at long-distance from the exon-intron boundaries were remaining after the filtering: chr9.hg19:g.129,413,679delG in family 52 and chr9.hg19:g.129,437,509G>T in family 54. These variants have never been described. They affect nucleotides that are partly conserved among species but not lie within an evolutionary conserved region (Suppl. Figure 3). No binding-site for transcription factors is predicted *in silico* according to the JASPAR software (<http://jaspardev.genereg.net/>). Therefore, we

considered that these variants are likely to be rare non-pathogenic variants. For family 51, segregation analysis was performed based on variants generated by next-generation sequencing and microsatellite markers (Suppl. Figure 2). Interestingly, no linkage to *LMX1B* locus (9q33.3) was shown, suggesting that a genomic alteration of this gene is not involved in the familial disease.

To our knowledge, the hypothesis of a genetic heterogeneity has never been studied in this disease. Given the large number of genes involved in the WNT-signaling pathway, potential candidate genes are numerous. The deregulation of *LMX1B* due to a genomic alteration in another locus could also be a hypothesis. Quantitative expression studies are difficult to achieve because of very low expression of *LMX1B* mRNA in readily accessible tissues (lymphoblasts, fibroblasts). Therefore, approach by whole genome studies should be considered in these five families with no *LMX1B* alteration.

REFERENCES

1. Roeckerath W. Hereditary osteo-onychodysplasia. *Fortschr Geb Rontgenstr* 1951; 75 (6): 700-712.
2. Bongers EM, Huysmans FT, Levtchenko E et al. Genotype-phenotype studies in nail-patella syndrome show that LMX1B mutation location is involved in the risk of developing nephropathy. *Eur J Hum Genet* 2005; 13 (8): 935-946.
3. McIntosh I, Dreyer SD, Clough MV et al. Mutation analysis of LMX1B gene in nail-patella syndrome patients. *Am J Hum Genet* 1998; 63 (6): 1651-1658.
4. Sweeney E, Fryer A, Mountford R et al. Nail patella syndrome: a review of the phenotype aided by developmental biology. *J Med Genet* 2003; 40 (3): 153-162.
5. Lichter PR, Richards JE, Downs CA et al. Cosegregation of open-angle glaucoma and the nail-patella syndrome. *Am J Ophthalmol* 1997; 124 (4): 506-515.
6. Bennett WM, Musgrave JE, Campbell RA et al. The nephropathy of the nail-patella syndrome. Clinicopathologic analysis of 11 kindred. *Am J Med* 1973; 54 (3): 304-319.
7. Granata A, Nori G, Ravazzolo R et al. Nail-patella syndrome and renal involvement. Description of three cases and literature review. *Clin Nephrol* 2008; 69 (5): 377-382.
8. McIntosh I, Dunston JA, Liu L et al. Nail patella syndrome revisited: 50 years after linkage. *Ann Hum Genet* 2005; 69 (Pt 4): 349-363.
9. Meyrier A, Rizzo R, MC G. The nail-patella syndrome, a review. *J Nephrol* 1990; 2: 133-140.
10. Chen H, Lun Y, Ovchinnikov D et al. Limb and kidney defects in *Lmx1b* mutant mice suggest an involvement of LMX1B in human nail patella syndrome. *Nat Genet* 1998; 19 (1): 51-55.
11. Dreyer SD, Zhou G, Baldini A et al. Mutations in LMX1B cause abnormal skeletal patterning and renal dysplasia in nail patella syndrome. *Nat Genet* 1998; 19 (1): 47-50.

12. Bongers EM, de Wijs IJ, Marcelis C et al. Identification of entire LMX1B gene deletions in nail patella syndrome: evidence for haploinsufficiency as the main pathogenic mechanism underlying dominant inheritance in man. *Eur J Hum Genet* 2008; 16 (10): 1240-1244.
13. Dreyer SD, Morello R, German MS et al. LMX1B transactivation and expression in nail-patella syndrome. *Hum Mol Genet* 2000; 9 (7): 1067-1074.
14. Sato U, Kitanaka S, Sekine T et al. Functional characterization of LMX1B mutations associated with nail-patella syndrome. *Pediatr Res* 2005; 57 (6): 783-788.
15. Cross SH, Macalinao DG, McKie L et al. A dominant-negative mutation of mouse *Lmx1b* causes glaucoma and is semi-lethal via LBD1-mediated dimerisation. *PLoS Genet* 2014; 10 (5): e1004359.
16. Vollrath D, Jaramillo-Babb VL, Clough MV et al. Loss-of-function mutations in the LIM-homeodomain gene, LMX1B, in nail-patella syndrome. *Hum Mol Genet* 1998; 7 (7): 1091-1098.
17. Knoers NV, Bongers EM, van Beersum SE et al. Nail-patella syndrome: identification of mutations in the LMX1B gene in Dutch families. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11 (9): 1762-1766.
18. Pressman CL, Chen H, Johnson RL. LMX1B, a LIM homeodomain class transcription factor, is necessary for normal development of multiple tissues in the anterior segment of the murine eye. *Genesis* 2000; 26 (1): 15-25.
19. Lee BH, Cho TJ, Choi HJ et al. Clinico-genetic study of nail-patella syndrome. *J Korean Med Sci* 2009; 24 Suppl: S82-86.
20. Lin Y, Zhao J, Chen S et al. A novel mutation in LMX1B gene causes nail-patella syndrome in a large Chinese family. *Bone* 2008. 43: 591-595.

21. Milla E, Hernan I, Gamundi MJ et al. Novel LMX1B mutation in familial nail-patella syndrome with variable expression of open angle glaucoma. *Mol Vis* 2007; 13: 639-648.
22. Mimiwati Z, Mackey DA, Craig JE et al. Nail-patella syndrome and its association with glaucoma: a review of eight families. *Br J Ophthalmol* 2006; 90: 1505-1509.
23. Romero P, Sanhueza F, Lopez P et al. c.194 A>C (Q65P) mutation in the LMX1B gene in patients with nail-patella syndrome associated with glaucoma. *Mol Vis* 2011; 17: 1929-1939.

Legends

Figure 1: Schematic representation of *LMX1B* mutations. *LMX1B* is composed of 8 exons. The LIM-A and LIM-B domains are encoded by exons 2 and 3 respectively, the homeodomain is encoded by exons 4 to 6. Mutations are clustered in these functional domains. Truncating mutations are represented above the gene while missense mutations are represented under the gene. Splicing mutations are represented by stars.

Figure 2: Clinical features in NPS patients.

(A) Nail dysplasia. (1) Family 12, nails show more severe dysplasia on the ulnar side. (2-3) Family 45, thumbnail dysplasia and koilonychia of the second digit in the same patient. (4) Family 48, nail dysplasia of the first and second digits. Typical triangular lunula of the third digit. (B) Elbow dysplasia. (1-2) Family 43, limitation of the elbow extension. (3) Elbow X-ray showing dysplastic dislocated radial head and hypoplasia of the capitellum. (C) Patellar dysplasia. (1-2) Family 43, subluxed patella on knee flexion. (3) Family 43, knee X-ray showing lateral and superior displacement of hypoplastic patella. (D) Family 43, pelvis X-ray showing typical iliac horns.

Table 1: Summary of patients' phenotypes and *LMX1B* mutations. NA Not Available, IOH intra ocular hypertension, ED elbow dysplasia, PD patellar dysplasia, IH iliac horns, ND Nail dysplasia, fs frameshift, * NM_002316.2 / NM_002316.3)

Table 2: Prevalence of nail and skeletal dysplasia in NPS patients. Literature patients: Knoers et al., 2000; Lee et al., 2009; Lin et al., 2008; Milla et al., 2007; Mimiwati et al., 2006; Romero et al., 2011.

Supplementary Figure 1: Top: Pedigrees of families 51 to 55, affected with Nail-Patella Syndrome without *LMX1B* alteration. Bottom: Clinical and radiological findings in affected members of these families. A-D: Nail dysplasia in patient IV7-F53 showing koilonychia of thumb (A) and second finger (B), triangular lunulae of third (C) and fourth (D) fingers. E-H: Characteristic nail dysplasia of the thumb predominant at the ulnar side in patients III1-F51 (E,F) and IV1-F51 (G,H). I: Nail dysplasia of the hallux consisting of longitudinal striations in patient IV7-F53. J: Pelvis x-rays in patient IV7-F53 demonstrating no iliac horns. K-N: Knee x-rays showing patella hypoplasia in individuals III1-F51 (K), IV1-F51 (L) and IV7-F53 (M,N).

Supplementary Figure 2: Microsatellite and SNP segregation for family 51 at the 9q34 locus suggests no linkage to *LMX1B*. Intragenic markers are represented in bold. The affected individual III1 does not have allele in common with his affected grand-mother I1.

Supplementary Figure 3: Location of the *LMX1B* variants of uncertain significance identified by whole gene sequencing. Both variants are located in the large intron 2, at long distance from the exonic boundaries and do not lie within inter-species conserved regions. Furthermore, the chr9.hg19g.129,413,679delG variant is located beside a frequent single nucleotide polymorphism (rs4369083, chr9.hg19: 129,413,678G>A which allele frequency is 41%).

Supplementary Table 1: Clinical phenotype of Nail-Patella patients without *LMX1B* anomaly. NA Not Available, IOH intra ocular hypertension, ED elbow dysplasia, PD patellar dysplasia, IH iliac horns, ND Nail dysplasia.

Figure 1

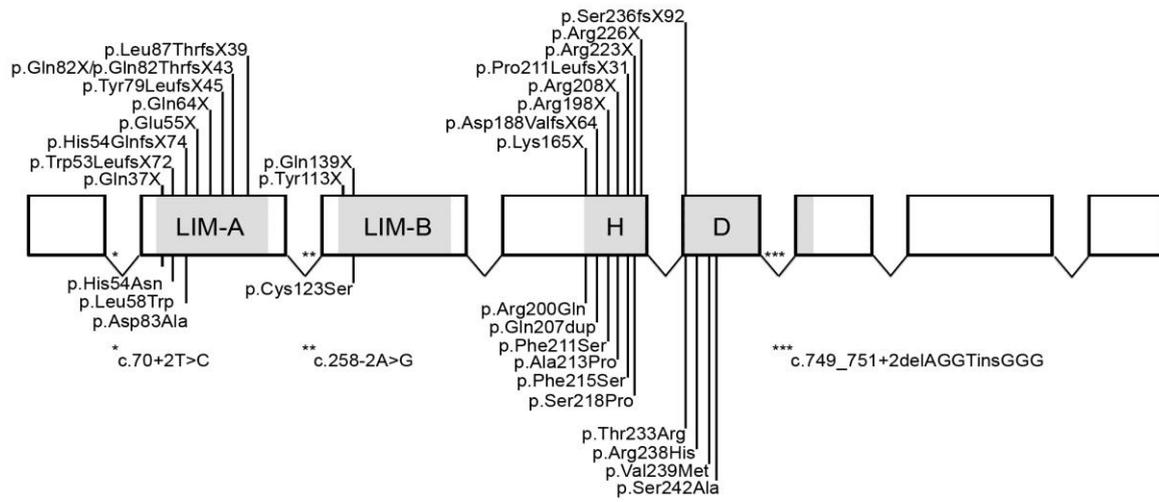
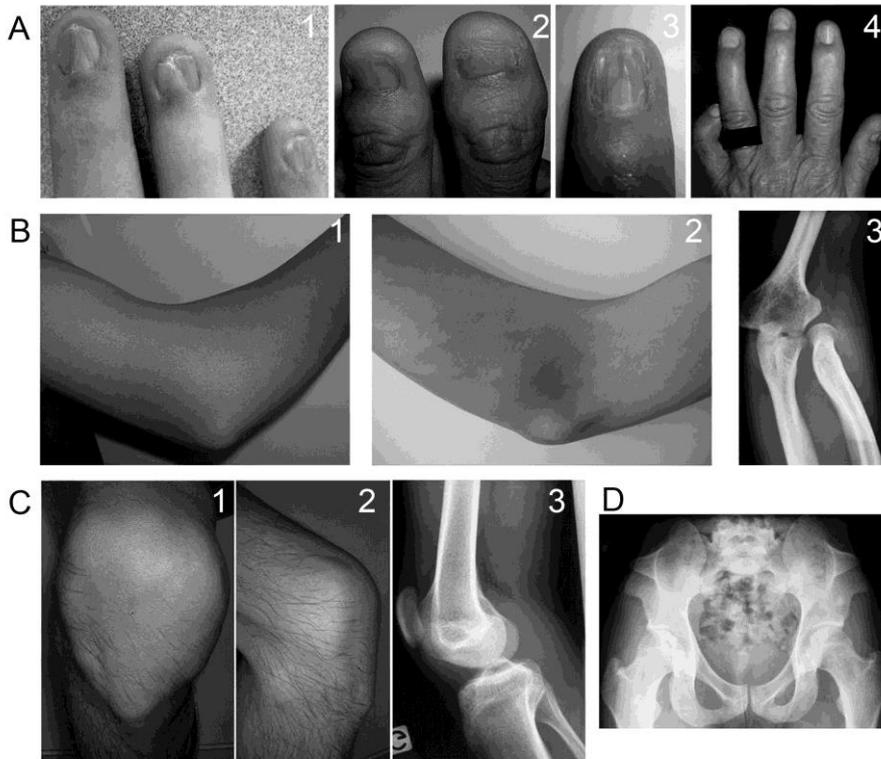


Figure 2



Chapitre III –Polarisation dorso-ventrale

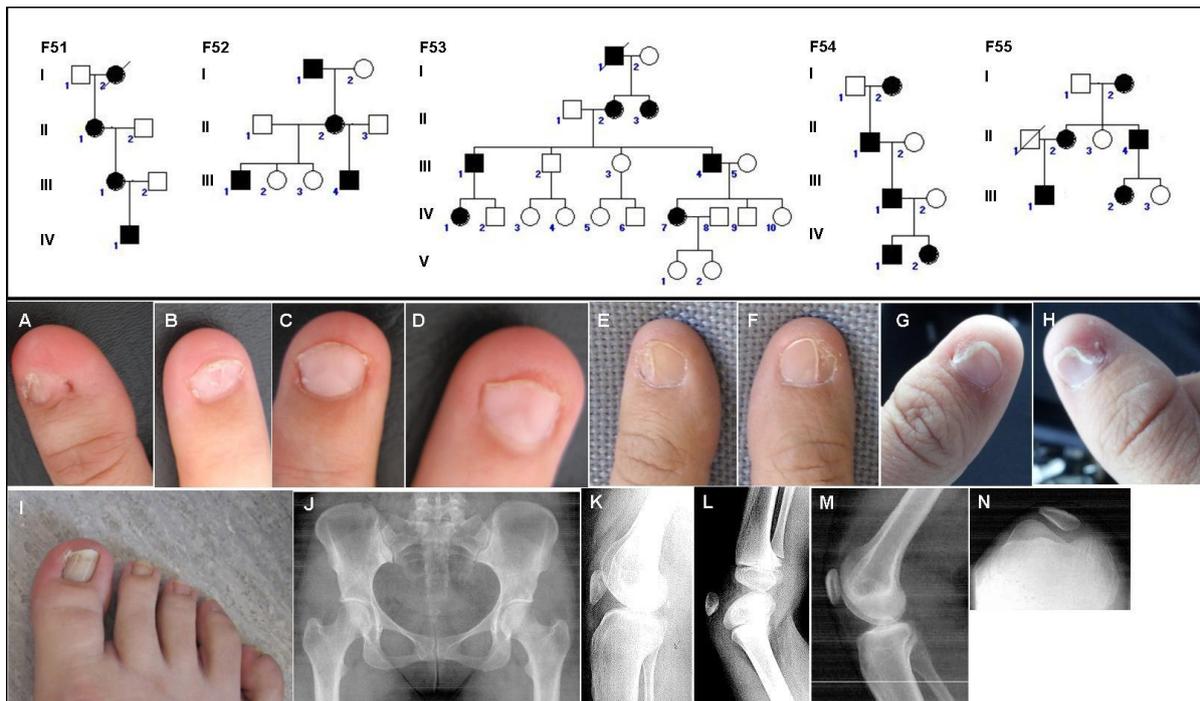
Table 1: Summary of patients' phenotypes and *LMX1B* mutations.

| Family N° | Gender (M/F) | Nephropathy | IOH | ED | PD | IH | ND | DNA change* | Protein effect* | Mutation location | Novel/Reported |
|-----------|--------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---|-------------------------------------|-------------------|-------------------------|
| 1 | 2/1 | 1/3 | 0/2 | 3/3 | 3/3 | NA | 3/3 | c.70>2T>C / c.139>2T>C | p.? | | Novel |
| 2 | 1/0 | 1/1 | NA | 1/1 | 1/1 | NA | 1/1 | c.109C>T / c.178C>T | p.Gln37* / p.Gln60* | LIM-A | Dunston et al., 2004 |
| 3 | 0/2 | 1/2 | NA | 1/2 | 2/2 | 1/1 | 1/2 | c.156dupC / c.225dupC | p.Trp53Leufs*72 / p.Trp76Leufs*72 | LIM-A | Novel |
| 4 | 1/0 | 0/1 | 0/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | c.160C>A / c.229C>A | p.His54Asn / p.His77Asn | LIM-A | Hamlington et al., 2001 |
| 5 | 0/1 | 1/1 | NA | 1/1 | 0/1 | NA | 1/1 | c.161_162insGAGGATGGCA / c.230_231insGAGGATGGCA | p.His54Glnfs*74 / p.His77Glnfs*74 | LIM-A | Novel |
| 6 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 1/1 | 0/1 | 1/1 | c.163G>T / c.232G>T | p.Glu55* / p.Glu78* | LIM-A | Dunston et al., 2004 |
| 7 | 2/3 | 0/5 | 1/5 | 1/2 | 5/5 | NA | 5/5 | c.173T>G / c.242T>G | p.Leu58Trp / p.Leu81Trp | LIM-A | Hamlington et al., 2001 |
| 8 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | c.190C>T / c.259C>T | p.Gln64* / p.Gln87* | LIM-A | Clough et al., 1999 |
| 9 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | c.234_235delGT / c.303_304delGT | p.Tyr79Leufs*45 / p.Tyr102Leufs*45 | LIM-A | Vollrath et al., 1998 |
| 10 | 1/0 | NA | NA | 1/1 | 1/1 | NA | 1/1 | c.234_235delGT / c.303_304delGT | p.Tyr79Leufs*45 / p.Tyr102Leufs*45 | LIM-A | Vollrath et al., 1998 |
| 11 | 1/1 | 0/2 | NA | 1/2 | 2/2 | 2/2 | 1/1 | c.234_235delGT / c.303_304delGT | p.Tyr79Leufs*45 / p.Tyr102Leufs*45 | LIM-A | Vollrath et al., 1998 |
| 12 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 1/1 | 1/1 | NA | 1/1 | c.243_244insA / c.312_313insA | p.Gln82Thrfs*43 / p.Gln105Thrfs*43 | LIM-A | Novel |
| 13 | 1/0 | 0/1 | 0/1 | 1/1 | 1/1 | NA | 1/1 | c.244C>T / c.313C>T | p. Gln82* / p. Gln105* | LIM-A | Novel |
| 14 | 0/1 | 0/1 | NA | 0/1 | 1/1 | NA | 1/1 | c.248A>C / c.317A>C | p.Asp83Ala / p.Asp106Ala | LIM-A | Novel |
| 15 | 1/0 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | c.248A>C / c.317A>C | p.Asp83Ala / p.Asp106Ala | LIM-A | Novel |
| 16 | 1/0 | 0/1 | 0/1 | 1/1 | 1/1 | 0/1 | 0/1 | c.254_257dupAACAA / c.323_326dupAACAA | p.Leu87Thrfs*39 / p.Leu110Thrfs*39 | LIM-A | Novel |
| 17 | 0/1 | 0/1 | NA | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | c.258-2A>G / c.327-2A>G | p.?(Loss of exon 3) | | Clough et al., 1999 |
| 18 | 2/1 | 0/3 | 0/3 | 2/3 | 2/3 | 2/2 | 3/3 | c.339C>A / c.408C>A | p.Tyr113* / Tyr136* | LIM-B | Novel |
| 19 | 1/1 | NA | NA | 0/2 | 0/2 | NA | 1/2 | c.367T>A / c.436T>A | p.Cys123Ser / p.Cys146Ser | LIM-B | Novel |
| 20 | 2/2 | 0/4 | 1/4 | 0/4 | 4/4 | NA | NA | c.415C>T / c.484C>T | p.Gln139* / p.Gln162* | LIM-B | Clough et al., 1999 |
| 21 | 0/1 | 0/1 | NA | 1/1 | 1/1 | NA | 1/1 | c.493A>T / c.562A>T | p.Lys165* / Lys188* | LIM-B | Novel |
| 22 | 1/0 | 0/1 | NA | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | c.563delA / c.632delA | p.Asp188Valfs*64 / p.Asp211Valfs*64 | HD | Novel |
| 23 | 1/0 | NA | NA | 1/1 | 1/1 | NA | 1/1 | c.592C>T / c.661C>T | p.Arg198* / p.Arg221* | HD | Dreyer et al., 1998 |
| 24 | 0/1 | 0/1 | NA | 0/1 | 1/1 | NA | 1/1 | c.592C>T / c.661C>T | p.Arg198* / p.Arg221* | HD | Dreyer et al., 1998 |
| 25 | 0/1 | 0/1 | NA | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | c.592C>T / c.661C>T | p.Arg198* / p.Arg221* | HD | Dreyer et al., 1998 |
| 26 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 1/2 | 1/2 | NA | 2/2 | c.599G>A / c.668G>A | p.Arg200Gln / p.Arg223Gln | HD | McIntosh et al., 1998 |
| 27 | 1/1 | 2/2 | 0/2 | 2/2 | 1/2 | 1/1 | 1/1 | c.599G>A / c.668G>A | p.Arg200Gln / p.Arg223Gln | HD | McIntosh et al., 1998 |
| 28 | 2/0 | 0/2 | 0/1 | 1/2 | 2/2 | NA | 2/2 | c.599G>A / c.668G>A | p.Arg200Gln / p.Arg223Gln | HD | McIntosh et al., 1998 |
| 29 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 1/1 | 1/1 | 0/1 | 1/1 | c.614_615insTCA / c.683_684insTCA | p.Gln207dup / p.Gln230dup | HD | Novel |
| 30 | 1/1 | NA | 1/1 | NA | 1/2 | 1/2 | NA | c.622C>T / c.691C>T | p.Arg208* / p.Arg231* | HD | Vollrath et al., 1998 |
| 31 | 1/0 | 0/1 | 0/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | c.632T>C / c.701T>C | p.Phe211Ser / p.Phe234Ser | HD | Novel |
| 32 | 0/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | NA | 1/1 | c.637G>C / c.706G>C | p.Ala213Pro / p.Ala236Pro | HD | McIntosh et al., 1998 |
| 33 | 0/1 | 0/1 | NA | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | c.637G>C / c.706G>C | p.Ala213Pro / p.Ala236Pro | HD | McIntosh et al., 1998 |
| 34 | 2/4 | 6/6 | 0/1 | 5/6 | 2/6 | NA | 6/6 | c.637G>C / c.706G>C | p.Ala213Pro / p.Ala236Pro | HD | McIntosh et al., 1998 |
| 35 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | c.644T>C / c.713T>C | p.Phe215Ser / p.Phe238Ser | HD | Novel |
| 36 | 1/1 | NA | NA | 2/2 | 2/2 | 2/2 | 2/2 | c.652T>C / c.721T>C | p.Ser218Pro / p.Ser241Pro | HD | McIntosh, 1998 |
| 37 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | c.662delC / c.731delC | p.Pro221Leufs*31 / p.Pro244Leufs*31 | HD | Novel |
| 38 | 0/2 | 0/1 | 0/1 | 2/2 | 1/2 | 0/1 | NA | c.667C>T / c.736C>T | p.Arg223* / p.Arg246* | HD | McIntosh et al., 1998 |
| 39 | 1/1 | 1/2 | NA | 2/2 | 2/2 | NA | 2/2 | c.667C>T / c.736C>T | p.Arg223* / p.Arg246* | HD | McIntosh et al., 1998 |
| 40 | 1/0 | NA | NA | 0/1 | 0/1 | NA | NA | c.676C>T / c.745C>T | p.Arg226* / p.Arg249* | HD | McIntosh et al., 1998 |
| 41 | 1/1 | NA | NA | 1/1 | 2/2 | NA | 2/2 | c.698C>G / c.767C>G | p.Thr233Arg / p.Thr256Arg | HD | Dunston et al., 2004 |
| 42 | 1/0 | 0/1 | NA | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | c.706_707delAG / c.775_776delAG | p.Ser236fs*92 / p.Ser259fs*92 | HD | Seri et al., 1999 |
| 43 | 1/0 | 0/1 | NA | 0/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | c.713G>A / c.782G>A | p.Arg238His / p.Arg261His | HD | Haras et al., 2012 |
| 44 | 1/0 | 0/1 | 0/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | c.715G>A / c.784G>A | p.Val239Met / p.Val262Met | HD | Novel |
| 45 | 0/1 | 1/1 | NA | 1/1 | 1/1 | NA | 1/1 | c.725T>C / c.794T>C | p.Val242Ala / p.Val265Ala | HD | Novel |
| 46 | 1/0 | NA | NA | 0/1 | 0/1 | NA | NA | c.749_751+2delAGGTinsGGG / c.818_820+2delAGGTinsGGG | p.?(loss of exon 5) | | Novel |
| 47 | 0/1 | 1/1 | 0/1 | 0/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | Exons 3-8 deletion | p.? | | Bongers et al., 2008 |
| 48 | 5/1 | 0/6 | 1/6 | 6/6 | 5/6 | 3/6 | 6/6 | Complete deletion | p.0 | | Bongers et al., 2008 |
| 49 | 0/1 | NA | NA | 0/1 | 0/1 | 1/1 | 1/1 | Exons 3-8 deletion | p.? | | Bongers et al., 2008 |
| 50 | 1/0 | 1/1 | NA | 1/1 | 1/1 | NA | 1/1 | Exons 6-8 deletion | p.? | | Novel |
| Total | 39/43 | 25% (17/68) | 12% (5/42) | 71% (54/76) | 80% (66/82) | 76% (28/37) | 96% (69/72) | | | | |

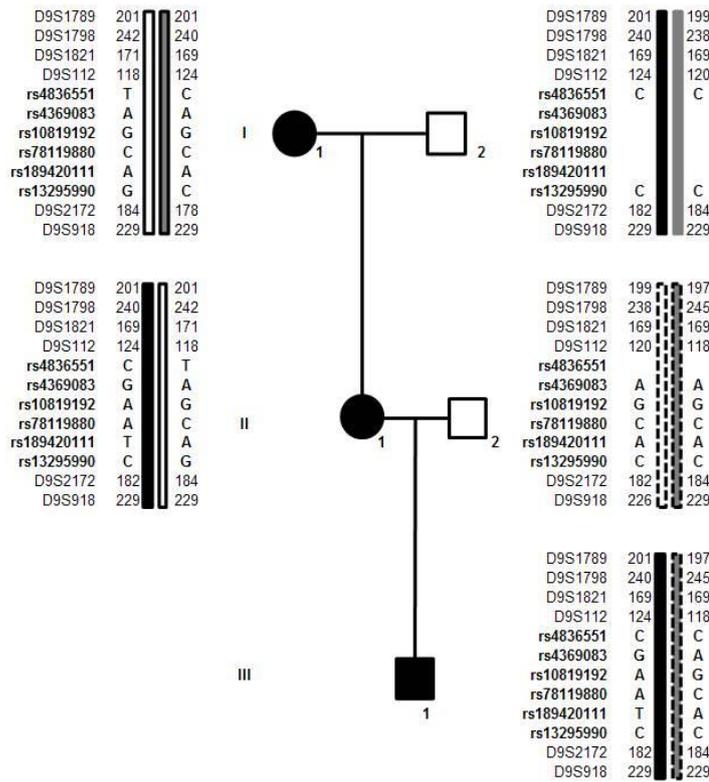
| | Frequency (%) | | |
|---------------------------|---------------|-------------------|---------------|
| | Present study | Reported patients | Total |
| Nail dysplasia | 96% (69/72) | 99% (299/302) | 98% (368/374) |
| Anonychia | 26%(19/72) | | |
| Koilonychia | 50% (36/72) | | |
| Triangular lunulae | 29% (21/72) | | |
| Patellar dysplasia | 80% (66/82) | 90% (229/253) | 88% (295/335) |
| Patellar hypoplasia | 61% (50/82) | | |
| Patellar agenesis | 16% (13/82) | | |
| Patellar dislocation | 32% (26/82) | | |
| Elbow dysplasia | 71% (54/76) | 84% (223/266) | 81% (277/342) |
| Extension limitation | 59% (45/76) | | |
| Radial head anomalies | 47% (36/76) | | |
| Iliac horns | 76% (28/37) | 79% (149/188) | 78% (177/225) |

Literature patients: Knoers et al., 2000; Lee et al., 2009; Lin et al., 2008; Milla et al., 2007; Mimiwati et al., 2006; Romero et al., 2011.

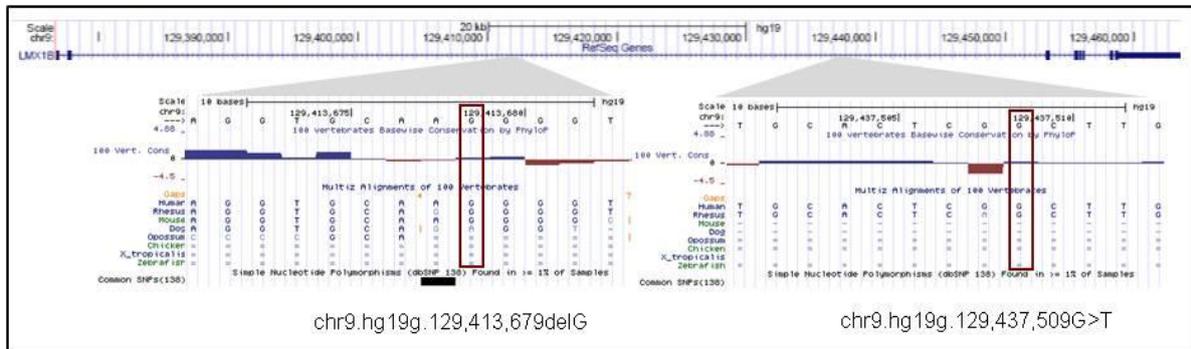
Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3



Supplementary Table 1

| Family N° | Gender (M/F) | Nephropathy | IOH | ED | PD | IH | ND |
|--------------|--------------|------------------|-----------------|-------------------|--------------------|-----------------|--------------------|
| 51 | 1/2 | 1/2 | 0/3 | 0/2 | 3/3 | 0/2 | 2/3 |
| 52 | 2/1 | 0/3 | NA | 3/3 | 3/3 | NA | 3/3 |
| 53 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 1/1 | 1/1 | 0/1 | 1/1 |
| 54 | 1/0 | NA | NA | 1/1 | 1/1 | NA | 1/1 |
| 55 | 2/3 | 2/3 | 0/3 | 4/4 | 3/4 | NA | 4/4 |
| Total | 6/7 | 30% (3/9) | 0% (0/7) | 82% (9/11) | 92% (11/12) | 0% (0/3) | 92% (11/12) |

NA Not Available, IOH intra ocular hypertension, ED elbow dysplasia, PD patellar dysplasia, IH iliac horns, ND Nail dysplasia.

III.4.2 *Analyses complémentaires dans 5 familles de NPS sans anomalie de LMX1B*

Dans 5 familles (Figure 34), l'analyse de la séquence codante du gène *LMX1B* n'a pas permis d'identifier de variant pouvant expliquer la pathologie. Les patients présentant un défaut de polarisation dorso-ventrale des membres tout à fait typique d'un syndrome Nail-Patella, nous avons poursuivi l'analyse du gène par l'étude de régions non codantes (promoteur, introns, 5'UTR et 3'UTR). Aucun variant d'intérêt n'a pu être retenu. Néanmoins, de façon intéressante, la ségrégation familiale des variants polymorphiques identifiés nous a permis de prouver la non-liaison du phénotype à ce locus pour l'une des familles (Famille 51).

L'association des signes cliniques dans le NPS constitue un tableau aisément reconnaissable. Néanmoins, plusieurs affections présentent des signes cliniques chevauchants (Tableau 7)(Sweeney et al., 2003). Ces diagnostics différentiels ont pu être écartés sur des bases cliniques chez ces 5 familles.

Afin de mettre en évidence le ou les gènes potentiellement impliqués, un séquençage de l'exome a été réalisé dans ces familles.

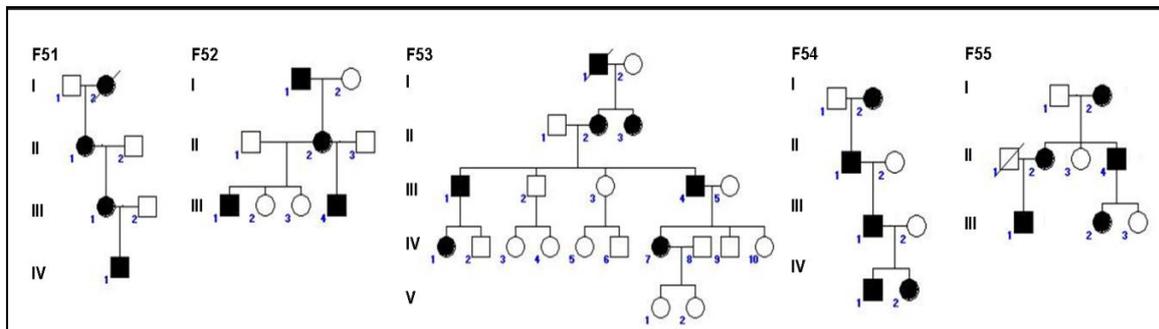


Figure 34 : Arbres généalogiques des familles de syndrome Nail-Patella sans anomalie *LMX1B* identifiée.

| Syndrome | Similitudes | Différences (signes absents dans le NPS) |
|---|---|---|
| Syndrome Small Patella (OMIM147891) | Hypo/aplasie de rotule, luxation rotule, anomalies du bassin | Défaut d'ossification ischio-pubienne |
| Patella aplasia-hypoplasia (OMIM168860) | Hypo/aplasie de rotule | |
| Luxation récidivante familiale de rotule (OMIM169000) | Luxation rotule | |
| Syndrome de Meier-Gorlin (OMIM224690) | Aplasia de rotule, luxation tête radiale | Microtie, petite taille, microcéphalie, déficience intellectuelle, malformations rénales |
| Syndrome Genito-patellaire (OMIM606170) | Aplasia de rotule, atteinte rénale, rétractions des genoux et des hanches, pieds bots | Hypoplasie des ischions et ailes iliaques, anomalies génitales, dysmorphie faciale, déficience intellectuelle, malformations rénales |
| Syndrome DOOR (OMIM220500) | Anomalies des ongles | Pouce triphalangé, hallux long, hypoplasie phalanges distales, ptôsis, uropathie, cataracte, atrophie optique, Dandy-Walker, épilepsie, surdité |
| Trisomie 8 en mosaïque | Hypo/aplasie de rotule, limitation mobilité coude, anomalies des ongles | Difficultés d'apprentissage, camptodactylies, dysmorphie faciale |
| Syndrome de Coffin-Siris (OMIM135900) | Hypo/aplasie de rotule, luxations coude, anomalies des ongles | Dysmorphie faciale, déficience intellectuelle |
| Syndrome RAPADILINO (OMIM266280) | Hypo/aplasie de rotule, luxations, atteinte radiale | Fente palatine, dysmorphie faciale, petite taille, hypoplasie rayon radiale, absence de pouce |
| Syndrome de Senior (OMIM113477) | Hypoplasie ongles | Dysmorphie faciale, petite taille, déficience intellectuelle |

Tableau 7 : Diagnostics différentiels du syndrome Nail-Patella.

D'après Sweeney et al., 2003.

III.4.2.1 Etude de l'hypothèse d'une hétérogénéité génétique par séquençage de l'exome

Dans le but d'identifier un ou plusieurs autre(s) acteur(s) majeur(s) de la voie WNT dans la polarisation dorso-ventrale des membres, un séquençage de l'exome a été effectué dans 4 de ces familles (F51, F52, F53, F54) en collaboration avec la plateforme de génomique structurale de l'IFR 114 (Martin FIGEAC, Lille). La quantité d'ADN disponible était insuffisante pour inclure la dernière famille.

Compte tenu de l'homogénéité clinique de nos familles et dans l'hypothèse d'une hétérogénéité génétique limitée pour le NPS, nous avons choisi d'utiliser une stratégie de chevauchement pour cette analyse (Biesecker and Green, 2014). En effet, il s'agissait de formes familiales de NPS ne nous permettant pas d'utiliser une stratégie par analyse de trios. Pour la famille 51 dont l'absence de liaison à *LMX1B* a pu être montrée précédemment, nous avons étudié deux sujets atteints qui ont été choisis sur la base d'un éloignement maximal sur l'arbre généalogique afin de limiter le nombre de variants en commun (F51-III1, F51-IV1). De plus, un apparenté sain a été étudié afin d'écarter le maximum de variants non liés au

phénotype (F51-III2). Pour les familles 52, 53 et 54, nous n'avons étudié qu'un seul membre (F52-III1, F53-IV7, F54-III1) en raison de l'absence d'autres prélèvements familiaux disponibles ou de qualité suffisante.

Nous avons utilisé le kit de capture Sure Select Agilent® – version 5 (Courtaboeuf, France), à partir de 5 µg d'ADN leucocytaire, et le séquençage a été réalisé par la technologie haut-débit SOLID. Les lectures ont été alignées sur le génome humain hg19 à l'aide du logiciel Shrimp v2 (Paramètres : --half-paired --single-best-mapping --all-contigs ; graines par défaut). Les insertions/délétions ont été réalignées avec le logiciel GATK. Les variants ont été identifiés par le logiciel VarScan puis annotés avec Annovar.

Plusieurs filtres ont été mis au point pour le tri des variants : 1/ Le filtre « Témoins » correspond aux variants identifiés de façon récurrente sur les exomes réalisés par la même technologie sur la plateforme de génomique structurale de l'IFR 114, chez des individus non apparentés à nos familles, considérés comme témoins. Ont également été ajoutés les variants identifiés chez l'apparenté sain de la famille 51. 2/ Le filtre « Variants homozygotes » correspond au tri des variants présents chez nos patients à l'état homozygote, sur la base d'une fréquence des lectures supérieure à 80% ou inférieure à 20%. 3/ Le filtre « SNP fréquence >1% » correspond au tri des variants polymorphiques dont la fréquence dans la population générale est supérieure à 1%, d'après les bases de données dbSNP137 et Exome Variant Server. 4/ Le filtre « Interactome » correspond à la sélection des variants concernant des gènes appartenant à la voie de signalisation ou interagissant avec LMX1B et/ou ses partenaires. Cette liste de 956 gènes a été générée à partir des bases de données BioCarta (requêtes : « SHH signaling », « WNT signaling »), String (requêtes : « SHH », « WNT7A », « LMX1B ») et GeneOntology (requête « Dorso-ventral pattern formation »). 5/ Le filtre « qualité » appliqué à l'aide d'un script « maison » permet de ne sélectionner que les variants satisfaisant les critères suivants : fréquence du variant : supérieure ou égale à 10, qualité moyenne des bases des lectures avec la mutation : supérieure ou égale à 0,4 fois celle des lectures sans la mutation, nombre de lectures sens/anti-sens avec la mutation : supérieur ou égal à 0,01 fois le nombre de lectures sens/anti-sens sans la mutation. On estime que ce filtre qualité a une spécificité de 97% et une sensibilité de 95%.

Le séquençage de l'exome chez les 5 patients étudiés a généré près de 20 000 variants SNP/ InDels par patient. La couverture moyenne était de 76% pour une profondeur de 20 lectures (Figure 35).

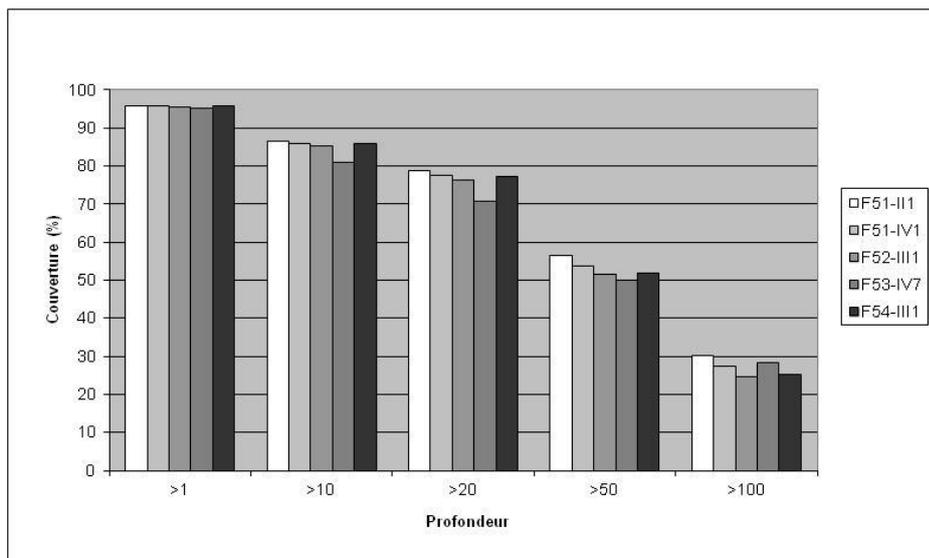


Figure 35 : Contrôle qualité du séquençage de l'exome.

Pourcentage d'exons couverts par rapport au design en fonction de la profondeur de lecture pour chaque patient étudié.

Nous avons tout d'abord appliqué pour tous les patients les filtres « Témoins » et « Variants homozygotes » (Tableau 8). Ces deux filtres ont permis d'écartier environ deux tiers des variants identifiés. Parmi les 28838 variants restant, nous avons sélectionné les variants non-sens, au nombre de 172, compte tenu du caractère *a priori* délétère de la mutation identifiée. Par ailleurs, nous avons d'une part additionné l'ensemble des variants résiduels chez les 5 patients, et d'autre part réalisé l'intersection des variants communs aux deux patients issus de la même famille. Le filtre « SNP fréquence >1% » a été appliqué dans les deux cas, permettant la sélection de 20943 et 401 variants respectivement. Compte tenu du nombre encore élevé de variants résiduels, nous avons d'une part appliqué le filtre « Interactome » et d'autre part réalisé l'intersection des gènes en commun parmi au moins 3 patients.

Le filtre « Interactome » a permis de conserver 198 variants concernant l'un des 956 gènes préalablement sélectionnés pour leur probable implication dans le développement du membre.

L'intersection des gènes en commun a permis d'identifier 1061 gènes en commun parmi 3 à 5 patients. Cette liste a pu être réduite par l'application du filtre qualité, permettant de ne retenir que 78 gènes en commun. Parmi ceux-ci, 19 ont été écartés sur la base de leur fonction ou implication dans des pathologies sans lien avec le développement des membres. De plus, 27 autres gènes présentant des variants identiques chez l'ensemble des patients ont

également été écartés. En effet, en l’absence d’effet fondateur *a priori*, il nous a semblé peu probable que les patients issus de familles non apparentées soient porteurs d’un variant identique. L’hypothèse la plus probable pour ces variants récurrents, de type InDels pour la majorité, est un artéfact du séquençage ou un défaut d’alignement. Au final, parmi les 78 gènes en commun, 32 gènes (porteurs de 103 variants tous patients confondus) ont été conservés pour visualisation manuelle des séquences.

Au total, l’application des combinaisons de filtres successifs a abouti à la sélection de 473 variants, tous patients confondus (Tableau 8). Les faux-positifs par erreur de séquence ou d’alignement ont d’abord été éliminés par la visualisation des lectures montrant le variant et sa séquence environnante (séquences répétées favorisant les défauts d’alignement par exemple). Ceci nous a permis de sélectionner 40 variants qui ont fait l’objet d’une vérification en séquençage Sanger. Au terme de ces analyses, seulement 10 variants ont été confirmés. L’étude de leur ségrégation familiale a permis d’écarter 3 d’entre eux qui ne ségrégeaient pas avec le phénotype. Le nombre de variants restant au décours des filtres successifs est rapporté dans le Tableau 8. Les 7 variants résiduels sont rapportés dans le Tableau 9. Ces variants concernent 6 gènes (2 variants dans le même gène pour le patient F53-IV7), dont aucun n’est commun à plusieurs familles.

| Patients | F51-II.1 | F51-IV.1 | F52-III.1 | F53-IV.7 | F54-III.1 | Total |
|------------------------|---------------------|----------|----------------------------------|------------|------------|-------------------------|
| Filtres : | | | | | | |
| Sans : | | | | | | |
| Sans | 19123 | 17601 | 19081 | 19678 | 17121 | 92604 |
| Témoins | 6392 | 4421 | 7019 | 8328 | 4594 | 30754 |
| Variants homozygotes | 6118 | 4024 | 6721 | 7856 | 4119 | 28838 dont 172 non-sens |
| | Addition | | | | | |
| | Intersection | | | | | |
| SNP freq>1% | 401 | | 20943 | | | |
| Interactome | 4 | | 194 | | | |
| | | | Gènes communs | | | |
| | | | 5 patients | 4 patients | 3 patients | |
| | | | 101 | 291 | 669 | |
| Qualité | | | 1 | 16 | 61 | |
| | | | Total : 78 dont 32 sélectionnés* | | | |
| Sélection : | | | | | | 473 |
| Visualisation séquence | | | | | | 40 |
| Séquençage Sanger | | | | | | 10 |
| Ségrégation familiale | | | | | | 7 |

Tableau 8 : Récapitulatif du nombre de variants identifiés par séquençage de l’exome et des filtres utilisés. Intersection : correspond à la somme des variants communs entre les patients. Addition : correspond à l’addition des variants de plusieurs patients.* Après retrait des gènes communs non candidats et des gènes communs porteurs de variants identiques chez les patients.

| Patient | Gène | Type de mutation | Localisation du variant | Mutation |
|----------|----------------|---------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| F52-III1 | <i>SNX32</i> | Epissage | NM_152760, intron 4 | c.374+1G>A |
| F53-IV7 | <i>MINA</i> | Faux-sens | NM_001042533, exon 2 | c.147C>G / p.I49M |
| F53-IV7 | <i>MINA</i> | Délétion hors-phase | NM_001042533, exon 10 | c.1329_1332del / p.Thr444Glnfs*17 |
| F53-IV7 | <i>TRIM69</i> | Epissage | NM_182985, intron 6 | c.962-2A>G |
| F54-III1 | <i>SFRP4</i> | Faux-sens | NM_003014, exon 3 | c.566C>T / p.T189M |
| F54-III1 | <i>TMEM171</i> | Epissage | NM_173490, intron 2 | c.640+2T>G |
| F54-III1 | <i>TTF1</i> | Faux-sens | NM_007344, exon 2 | c.679A>C / p.S227R |

Tableau 9 : Récapitulatif des mutations identifiées par séquençage de l'exome chez les patients Nail-Patella.

Aucun variant d'intérêt n'a été retenu dans la famille 51 pour laquelle trois membres ont été étudiés en séquençage de l'exome.

Pour la famille 52, nous avons identifié une substitution touchant le site donneur d'épissage de l'intron 4 du gène *SNX32* (*sorting nexin 32*), prédisant un saut d'exon 4 (analyse par logiciel Alamut). Cette mutation ségrège chez les 3 individus atteints pour lesquels un prélèvement était disponible. Très peu de données sont disponibles dans la littérature actuelle concernant ce gène. Certains membres de la famille des protéines SNX jouent un rôle dans l'endocytose (Seet and Hong, 2006).

En ce qui concerne les familles 53 et 54, l'étude de la ségrégation familiale des variants identifiés n'a pu être réalisée en l'absence de prélèvements familiaux disponibles. La fonction des 5 gènes concernés par ces variants est mal connue à l'heure actuelle.

Le gène *MINA* (*MYC induced nuclear antigen*) est une cible de l'oncogène c-Myc et pourrait jouer un rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire (Tsuneoka et al., 2002; Zhang et al., 2005). Deux mutations ont été identifiées chez le patient de la famille 53. La délétion c.1329_1332del identifiée entraîne un décalage du cadre de lecture avec prédiction d'un codon stop prématuré dans le dernier exon du gène, en position 444 de la protéine qui compte 466 résidus. Compte tenu de sa localisation dans le dernier exon du gène, il est peu probable que cette mutation entraîne une haploinsuffisance du gène en l'absence de déclenchement du nonsense-mediated RNA decay. Les logiciels de prédiction protéique donnent des résultats discordants puisque cette mutation est prédite comme bénigne par Polyphen, délétère par SIFT, polymorphique par Mutation Taster et de pathogénicité inconnue d'après Alamut. Par ailleurs, la substitution c.147C>G (Chr3(GRCh37):g.97686291G>C) responsable de la mutation faux-sens p.Ile49Met est prédite comme bénigne par le logiciel Polyphen. Elle concerne en effet un nucléotide

faiblement conservé au cours de l'évolution et un acide aminé modérément conservé. De plus, la différence physico-chimique est faible entre l'isoleucine et la méthionine.

Le gène *TRIM69* (*tripartite motif containing 69*) code une ubiquitine-ligase exprimée spécifiquement dans les cellules germinales au cours de la spermatogenèse (Han et al., 2012). La mutation identifiée dans la famille 53 touche le site accepteur d'épissage de l'intron 6, et un saut d'exon 7 est prédit.

Le gène *SFRP4* (*secreted frizzled-related protein 4*) code un antagoniste de la voie de signalisation WNT jouant un rôle dans la différenciation et l'apoptose des ostéoblastes et des kératinocytes, ce qui en fait un candidat intéressant pour les anomalies du développement (Cho et al., 2008; Maganga et al., 2008). Néanmoins, la substitution c.566C>T (Chr7(GRCh37):g.37953841G>A) responsable de la mutation faux-sens p.Thr189Met identifiée dans la famille 54 est décrite comme un variant rare, de fréquence inférieure à 1% dans les bases de données ESP (Exome Sequencing Project) et dbSNP (correspondant au rs149860855). Elle concerne un nucléotide faiblement conservé mais un acide aminé qui est fortement conservé au cours de l'évolution. En revanche, les différences physico-chimiques entre les deux acides aminés sont faibles. Cette mutation est prédite comme probablement délétère par Polyphen, délétère par SIFT, pathogène par Mutation Taster et de pathogénicité inconnue pour Alamut.

Le gène *TMEM171* (*transmembrane protein 171*) a été identifié récemment par des études d'association comme potentiellement impliqué dans la fonction rénale (Kottgen et al., 2013; Okada et al., 2012). Une mutation du site donneur d'épissage de l'intron 2 prédisant un saut de l'exon 2 a été mise en évidence chez le patient F54-III1. Nous n'avons pour ce patient pas de données concernant une éventuelle atteinte rénale associée aux anomalies du développement des membres.

Le gène *TTF1* (*transcription termination factor, RNA polymerase I*) code un facteur de terminaison de la transcription pour l'ARN polymérase I. Il est localisé dans le nucléole et joue un rôle dans la biogenèse des ARNs ribosomiaux (Lessard et al., 2012). La mutation faux-sens identifiée dans la famille 54 est prédite comme bénigne par Polyphen, polymorphique par Mutation Taster et tolérée par SIFT. Elle concerne un nucléotide et un acide aminé peu conservés au cours de l'évolution et les différences physico-chimiques entre les deux acides aminés sont modérées.

III.4.2.2 Etude de l'hypothèse d'une dérégulation de LMX1B

Devant l'absence d'anomalie de la séquence génomique de *LMX1B* et l'absence d'identification d'un autre gène candidat, nous avons ensuite souhaité tester l'hypothèse d'une dérégulation de *LMX1B* dans ces familles. En effet, les analyses effectuées précédemment ne permettent pas d'écarter l'altération d'un élément régulateur localisé à distance de *LMX1B*. Dans cette hypothèse, nous avons tenté de quantifier le transcrit *LMX1B* chez ces patients par RT-PCR quantitative à partir des tissus disponibles (lymphoblastes, fibroblastes).

L'extraction de l'ARN total a été réalisée à partir de 5.10^6 cellules, à l'aide du kit Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel, Hoerd, France). La reverse-transcription a été effectuée à partir de 1µg d'ARN, à l'aide du kit Vilo cDNA Superscript synthesis (Life technologies, Saint Aubin, France), selon les recommandations du fournisseur.

La qRT-PCR *LMX1B* a été réalisée avec 2 couples d'amorces (amorces du commerce Hs00158750_m1, Life Technologies ; amorces « maison » F-ex4 CCTTCAAGGCCTCCTTCG, R-ex6 AGTTCTGCTGCTCCTGCTG, sonde 5'-(6FAM)TCTCGTCGAAGCCTTGCCGAAAG(TAMRA)-3'). Le gène *GAPDH* est utilisé comme contrôle de la quantification (amorces du commerce Hs03929097_g1, Life Technologies®). La réaction a été réalisée en duplicate dans un volume total de 20µl à l'aide du kit TaqMan® Gene Expression Assay, sur l'analyseur Abiprism 7900 (Life Technologies) selon le protocole suivant : 50°C pendant 2min, 95°C pendant 10min et 40 cycles 95°C 15s/60°C 1min.

L'étude de l'expression de *LMX1B* par qRT-PCR sur lymphoblastes et fibroblastes montre un niveau faible, ne permettant pas une quantification fiable du taux d'expression relatif (Figure 36), aussi bien avec les amorces du commerce qu'avec les amorces « maison ». Ainsi, le taux d'expression de *LMX1B* chez les patients n'a pu être comparé à celui des témoins et ces observations n'ont donc pas été rapportées dans le manuscrit préliminaire.

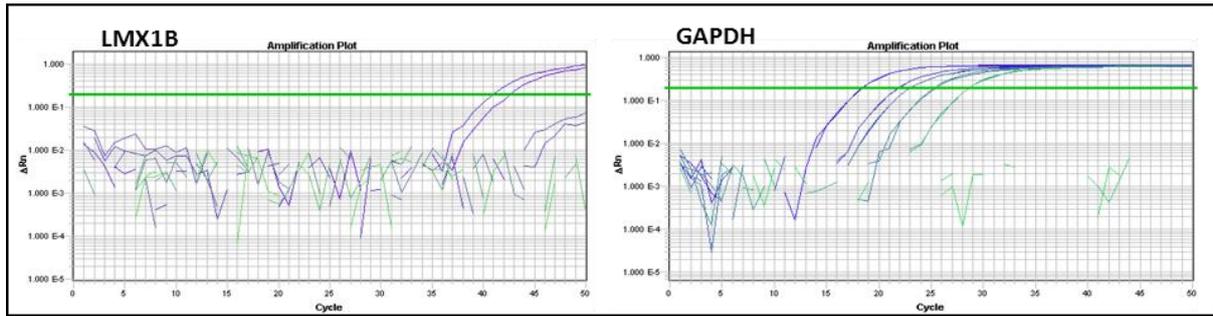


Figure 36 : Quantification du transcrit LMX1B.

qRT-PCR sur fibroblastes pour LMX1B (amorces « maison ») et GAPDH à partir de quantités croissantes d'ADNc (0,1 / 1 / 5 / 10 / 50 ng). L'amplification de LMX1B n'est détectable qu'après 40 cycles PCR à partir de 50 ng d'ADNc.

Discussion

L'établissement de l'asymétrie du membre selon l'axe dorso-ventral est initié précocement au cours du développement embryonnaire, sous le contrôle de la voie de signalisation WNT. Le Syndrome Nail-Patella, correspondant à une anomalie de la dorsalisation des membres, a constitué notre modèle d'étude de cet axe de polarisation. C'est le plus souvent l'haploinsuffisance du facteur de transcription *LMX1B* qui en est responsable. Nous avons étudié une cohorte de 55 familles et mis en évidence une mutation ou un grand réarrangement de *LMX1B* chez 50 d'entre elles. Les nouvelles mutations faux-sens font actuellement l'objet d'études fonctionnelles.

Nous nous sommes intéressés particulièrement aux 5 familles non porteuses d'une anomalie de *LMX1B* suite aux analyses effectuées dans le cadre du diagnostic conventionnel. Dans l'hypothèse de l'altération d'un élément régulateur de *LMX1B*, nous avons mis au point le séquençage haut-débit complet du gène, s'étendant sur 95 kb (Régions 5' et 3'-UTR, promoteur, introns/exons). A l'issue de ces analyses, aucune anomalie génomique considérée comme possiblement pathogène n'a été identifiée.

En raison des limites du séquençage haut-débit dans la détection de grands réarrangements, la réalisation d'une puce ciblée haute-densité pour compléter l'étude de *LMX1B* dans ces familles pourrait être envisagée. En parallèle, nous avons l'intention d'étudier la méthylation du promoteur *LMX1B*, afin de déterminer s'il existe une méthylation différentielle chez nos patients par rapport aux témoins. Cette analyse sera néanmoins limitée par les tissus disponibles, qui ne reflèteront pas nécessairement le profil de méthylation du mésenchyme dorsal au cours du développement des membres.

De façon intéressante, l'étude de la ségrégation des variants polymorphiques identifiés dans l'une des familles a permis de montrer l'absence de liaison au locus *LMX1B*, suggérant l'intervention possible d'un élément régulateur à distance, ou bien que ce gène ne soit pas directement impliqué dans la pathogenèse du défaut de polarisation dorso-ventrale observé. Dans ce contexte, nous avons tenté de rechercher une dérégulation de l'expression de *LMX1B* par l'étude de son transcrite en PCR quantitative. Cependant, la quantification de celui-ci n'a pas été réalisable dans les tissus accessibles (fibroblastes, lymphoblastes) compte tenu d'un niveau d'expression faible.

Ainsi, dans un deuxième temps, nous avons étudié l'hypothèse d'une hétérogénéité génétique dans le Syndrome Nail-Patella. Compte tenu des nombreux candidats potentiels impliqués dans la signalisation de la polarisation dorso-ventrale, nous avons choisi de

poursuivre les investigations par un séquençage haut-débit de l'exome dans ces familles. L'analyse bioinformatique a permis de sélectionner 6 gènes pour lesquels des variants ont été identifiés, peu apparaissent d'emblée comme de bons candidats pour l'implication dans la polarisation dorso-ventrale du membre. Aucun gène candidat commun à ces familles n'a pu être mis en évidence.

On estime actuellement que le séquençage d'exome n'est fructueux que dans environ 25% des cas (Yang et al., 2013). Plusieurs raisons peuvent être avancées devant ces résultats négatifs.

Nous serions tout d'abord tentés de conclure que l'absence d'autre gène candidat pourrait être un argument supplémentaire pour l'hypothèse d'une dérégulation de *LMX1B* en lien avec un événement non détectable par les techniques utilisées, en particulier l'altération d'un élément non codant à activité régulatrice.

Une autre hypothèse, moins avantageuse mais tout aussi probable, est celle de la mise en défaut de notre approche. Tout d'abord, nous ne pouvons exclure une altération de séquence située dans une zone codante non ou mal couverte par le séquençage de l'exome effectué, que ce soit par le design ou par la capture elle-même. En effet, notre couverture moyenne du design n'était que de 76% pour une profondeur supérieure à 20X. De plus, nous ne pouvons écarter un faux-négatif de notre analyse bio-informatique. En particulier, notre base de données « maison » de variants identifiés chez des témoins est encore peu fournie, n'ayant permis de ne filtrer qu'environ un tiers des variants mis en évidence chez les patients. Le nombre important de variants restant après les trois premiers filtres nous a ainsi contraint à sélectionner les gènes appartenant à notre liste « Interactome ». Ce dernier filtre est extrêmement stringent, limitant notre analyse à 956 gènes.

Enfin, il est possible que l'hétérogénéité génétique dans le NPS soit plus importante que suspectée, ce qui limiterait nettement la puissance de la stratégie de chevauchement choisie et l'approche par sélection des gènes en commun. Dans cette hypothèse, nous allons étudier les gènes candidats identifiés au décours de l'analyse dans d'autres familles de NPS sans mutation de *LMX1B*.

En parallèle, nous avons l'intention de reprendre l'analyse bio-informatique des exomes effectués en utilisant de nouvelles combinaisons de filtres. En particulier, il pourrait être intéressant d'ajouter systématiquement un filtre portant sur le score de qualité du variant. En effet, le taux de variants retenus *a priori* suite à la visualisation des séquences n'était que de 8,5% environ (40 variants retenus sur les 473 sélectionnés). De plus, le taux de variants confirmés *a posteriori* suite à la vérification en Sanger était faible : 10 variants confirmés

parmi les 40 sélectionnés, soit seulement 25%. De plus, il sera primordial d'étoffer notre base de variants identifiés chez des témoins, qui constitue l'un des filtres les plus efficaces lors de l'analyse. Néanmoins, nous n'utilisons plus désormais la technologie SOLID pour la réalisation d'exomes, qui risque de rester une limite importante à l'analyse des échantillons traités dans le cadre de ce projet.

Enfin, l'approche de séquençage haut-débit pourrait être idéalement couplée à une analyse de liaison au sein des différentes familles. Ceci devrait permettre de restreindre les loci d'intérêt. Une telle analyse n'a pu être réalisée pour le moment, compte tenu du nombre insuffisant de prélèvements disponibles pour les apparentés sains et atteints des cas index.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

Les anomalies des membres comptent parmi les malformations congénitales les plus fréquentes, avec une incidence estimée entre 1.3‰ et 1.9‰ naissances vivantes. Elles présentent un spectre clinique étendu, allant d'anomalies réductionnelles sévères à des anomalies mineures du nombre ou de la morphologie des doigts. En dehors des causes environnementales comme l'exposition à des tératogènes, les accidents vasculaires ou mécaniques, une partie des malformations des membres est d'origine génétique. L'identification de leur étiologie est importante pour le conseil génétique et la compréhension de leur physiopathologie pourrait l'être à l'avenir pour développer des pistes thérapeutiques. Bien que ces malformations aient fait l'objet d'études dès le début du 19^{ème} siècle, l'identification de leurs causes génétiques s'est avérée complexe, en particulier pour les malformations des membres non syndromiques.

La publication de la séquence complète du génome humain permettant le compte d'environ 20000 gènes seulement (Clamp et al., 2007) a mis en lumière la nécessaire multiplicité de leurs fonctions, en particulier pour les gènes du développement. L'expression des gènes au cours du développement doit bénéficier d'une régulation spatiale et temporelle précise pour que la modélisation des structures puisse avoir lieu.

Dans un souci de simplification, nous avons abordé séparément les trois axes de développement du membre. En réalité, les voies de signalisation impliquées sont fortement intriquées, et leur régulation fine particulièrement complexe. La coordination de ces interactions fait notamment appel aux gènes *HOX* pour la régulation temporo-spatiale et à la voie des BMPs pour la régulation quantitative de l'expression des gènes. Cette régulation joue un rôle crucial dans la modélisation du membre, l'initiation et la terminaison de la croissance du bourgeon. Ces aspects sont abordés plus en détail dans la revue annexée à la fin de cette thèse. De ce fait, il est fortement suspecté qu'une partie des malformations des membres d'origine génétique soit en lien avec des anomalies de régulation génique. La liste actuelle de gènes impliqués dans le développement des membres constitue autant de candidats potentiels dont la dérégulation pourrait entraîner des malformations des membres.

Les différentes pathologies étudiées à travers ce travail nous ont permis d'entrevoir le degré de complexité des voies de signalisation du développement des membres et de leurs interactions, et enfin d'illustrer le rôle majeur des acteurs impliqués dans la régulation des gènes du développement, ceux-ci étant au moins aussi importants que l'intégrité de la

Conclusion et Perspectives

séquence des gènes eux-mêmes. Il est facile d'imaginer qu'une subtile dérégulation de l'un des multiples acteurs puisse être responsable d'anomalies malformatives.

Ainsi, les nombreuses malformations des membres d'origine génétique pour lesquelles le déterminisme génique n'est pas connu pourraient être en lien avec des variations génomiques ponctuelles ou en nombre de copie touchant des éléments régulateurs. Cependant, la régulation génique en pathologie développementale constitue un champ encore mal exploré compte tenu de limites techniques. Bien qu'à l'heure actuelle quelques enhanceurs aient été identifiés, il est tout à fait probable que des silencers ou des insulators puissent également être responsables de malformations des membres comme nous l'avons suggéré suite à l'étude des bases moléculaires de la polydactylie préaxiale avec hypertrichose.

Dans un avenir proche, les évolutions technologiques et en particulier le séquençage haut-débit du génome entier devraient permettre une meilleure détection et caractérisation des éléments régulateurs. En parallèle, il y aura nécessité de mettre au point des tests fonctionnels à haut-débit pour l'étude des variants identifiés. Notamment, des tests fonctionnels quantitatifs seraient nécessaires pour l'étude rigoureuse *in vivo* des éléments régulateurs et en particulier pour les silencers et insulators. De plus, des progrès dans les outils d'étude des interactions chromatiniques et de l'organisation nucléaire devraient faciliter l'identification et la compréhension des mécanismes par lesquels les éléments régulateurs contrôlent l'expression de leurs gènes cibles (van Steensel and Dekker, 2010). Ces avancées combinées amélioreront les connaissances sur la régulation génique et les interactions entre les différentes voies de signalisation impliquées dans le développement des membres, et au-delà la compréhension des mécanismes par lesquels une dérégulation de ces voies provoque des malformations embryonnaires en général.

Une des limites de notre travail utilisant des modèles humains de pathologie est l'absence d'accessibilité aux tissus d'intérêt notamment pour les études d'expression (bourgeon de membre). L'accès à des modèles animaux reste primordial. Le poulet constitue l'un des modèles classiques d'étude du développement embryonnaire. En particulier, c'est principalement à partir d'expériences de greffe dans ce modèle que les différents axes de développement du bourgeon de membre ont pu être caractérisés. L'acquisition de compétences dans les techniques classiques d'embryologie expérimentale animale ainsi que de transgénése combinées aux techniques de biologie moléculaire de nouvelle génération pourra logiquement constituer un projet de post-doctorat.

ANNEXE

Annexe - Article de revue

Publié en ligne dans Encyclopedia of Life Science le 15 janvier 2012

Limb Development Anomalies: Genetics

Sylvie Manouvrier-Hanu, Clinical Genetics Department, University hospital Lille, France and Université Lille Nord de France

Florence Petit, Clinical Genetics Department, University hospital Lille, France and Université Lille Nord de France

Muriel Holder-Espinasse, Clinical Genetics Department, University hospital Lille, France and Université Lille Nord de France

Fabienne Escande-Narducci Molecular Genetics Department, University hospital Lille, France

Abstract

Congenital limb malformations range from reduction defects to subtle digit anomalies (number/length/anatomy). Their prevalence is evaluated from 1,3 to 1,9 ‰ neonates. They can be classified as disruption anomalies and genetic malformations. The later are due to limb development gene function alterations and may be isolated or associated with other malformations.

The genes implicated in the limb bud development are numerous. They work together to trigger limb bud growth (proximo-distal axis), polarization (antero-posterior and dorso-ventral) and patterning. They are often pleiotropic, explaining the frequent association of limb anomalies with other malformations.

Furthermore, limb malformations are often genetically heterogeneous and various anomalies of one single gene can cause different diseases (allelic heterogeneity).

Keywords: congenital limb malformation; molecular dysmorphology; developmental genes; digits; long-range regulators.

Key Concepts:

The limb bud development requires a constant equilibrium between cell mitotic activity and apoptosis. The limb bud growth, its antero-posterior and dorsoventral polarization as well as its patterning are very interlinked and imply precise space and time regulation of the implicated genes' expression.

Regulators / enhancers: Alterations of regulatory elements of key developmental genes play an important role in limb bud development. For example the Zone of polarizing activity Regulatory Sequence (ZRS) is a crucial regulator of SHH expression in the limb bud.

Introduction

In humans, limb malformations occur in approximately one in 1000 neonates, and can be isolated or associated with other developmental fields' anomalies, according to the expression domain of the genes involved, which are often pleiotropic (i.e. expressed in multiple developmental fields).

The limb develops from an embryonic limb bud emerging from the lateral plate mesoderm (LPM). Only a narrow band of LPM has limb-forming capacity. The normal limb formation requires coordination of several processes characterized by a constant equilibrium between cell mitotic activity and apoptosis. Limb bud production and growth (proximodistal axis) are due to rapid cell proliferation in the progress zone (PZ) induced by the overlying apical ectodermal ridge (AER), and closely linked to its polarization along two axes, anteroposterior (under control of the zone of polarizing activity, ZPA) and dorsoventral (DV), as well as to its organization or patterning. **See also:** [Apoptosis in Developmental Processes; Evolution of Vertebrate Limb Development](#).

Limb development involves numerous genes often predominantly implicated in one particular aspect of limb development, but their actions are nevertheless very interlinked and participate in a coordinated network of signals (for example the AER and ZPA are interdependent through a complex network involving Fibroblast growth factor 4 FGF4, Sonic Hedgehog SHH and Bone morphogenetic proteins BMPs). However, for greater clarity, although oversimplifying somewhat, we will consider each gene family or signalling pathway and the related human limb malformations (see Table 1 and Table 2).

Limb Bud Positioning, Initiation, and Identity

Prior to limb bud initiation, a long narrow area of the LPM (extending from the forelimb to the hindlimb-forming regions through the inter-limb flank) acquires limb-forming potential thanks to the combination of *HOX* code and axial cues (Duboc and Logan 2011). Retinoic Acid (RA) plays a critical role during this stage (his other known roles in anterior posterior and proximal distal pathways are more debated). In different animal models, application of inhibitors of RA synthesis prevents limb bud formation (Stratford *et al.* 1996; Gibert *et al.* 2006). Recent studies on zebrafish showed that RA early specifies a cell population to fin-forming progenitors, and later regulates their expansion during the fin bud initiation. Then RA may act as a competence factor conferring limb-forming ability to cells of the LPM (Grandel and Brand, 2010). **See also:** *Hox* Genes: [Embryonic Development; Mammalian Embryo: *Hox* Genes](#).

A DV boundary in the ectoderm is needed for AER formation, so that the limb bud appears at the right DV position. This frontier is likely due to different BMP-signalling between the prospective ventral and dorsal ectoderms. **See also:** [Bone Morphogenetic Proteins and Their Receptors](#).

Annexe

Little is known on factors regulating the axial level of limb bud positioning on the limb-forming region of the LPM. *Pbx* genes, encoding TALE transcription factors, are likely essential for this positioning through their cooperation with *Hox* genes (Capellini *et al.* 2011).

The TBX transcription factors genes: *Tbx5* and *Tbx4* are precisely expressed in the forelimb and hindlimb-forming regions, respectively. Many animal studies have demonstrated their critical (and conserved) role in the initial phase of limb bud initiation in either fore- (*Tbx5*) or hind-limbs (*Tbx4*). They are both required to initiate *Fgf10* expression in limb bud-forming areas. However, in the forelimbs *Tbx5* is solely involved (in *Tbx5* conditional mice mutants all forelimbs elements are absent (Rallis *et al.* 2003)), when *Tbx4* acts in association with unknown factors in the hindlimbs. In humans, heterozygous *TBX5* mutations are associated with Holt-Oram syndrome (HOS, MIM 142900), characterized by the association of a range of radial defects of the upper limbs with various cardiac anomalies. A slight genotype phenotype correlation has been suggested (Basson *et al.* 1999; Brassington *et al.* 2003): mutations introducing a premature stop codon are responsible for the association of both limb and cardiac anomalies. In case of missense mutations, more severe limb or cardiac malformations are observed depending on the location of the mutation (more severe cardiac defects at the 5' end of the T-box and more prominent limb defects at its 3' end). *TBX4* mutations are responsible for Ischiopatellar dysplasia or small patella syndrome (MIM 147891). In mice, it had been demonstrated that *Sall4*, coding a member of the Spalt-family zinc-finger protein, activates *Fgf10* synergistically with *Tbx5* in forelimbs and *Tbx4* in hindlimbs (Koshiba-Takeuchi *et al.* 2006). In humans, *SALL4* mutations are observed in Okhiro (OS or Duane-radial ray, MIM 607323) and oculo-oto-radial (MIM 147750) syndromes (Kohlhase *et al.* 2005), both harbouring upper limbs defects reminiscent to those of HOS. **See also:** [Heart Development: Gene Control](#).

Limb-type identity (fore or hindlimbs) and limb type morphology (depending on the species considered), are established prior to the limb bud initiation. Although, only expressed in fore- and hindlimbs, respectively, *Tbx5* and *Tbx4* are not responsible for the limb bud identity / morphology design. *Pitx1*, coding paired-type homeodomain transcription factor, is expressed in the hindlimb bud and is an upstream regulator of *Tbx4*. Then it may be implicated in hindlimb bud morphology specification. In humans heterozygous *PITX1* mutations result in asymmetric lower limb malformation with very variable expression ranging from isolated clubfoot to absent tibia with first toe duplication and clubfoot (MIM 119800) (Gurnett *et al.* 2008). Recently, multiple independent *cis*-regulatory elements of *Tbx4* expression have been identified, including the hindlimb enhancers A and B (HLEA and HLEB) (Menke *et al.* 2008). Both may be targets of *Pitx1* and other unknown upstream factors. Structural changes of these regulators might be some of the multiple factors responsible for the hind / lower limb morphology specification. However, limb bud identity / morphology determination remains mostly unexplained.

The *TBX5-4* direct target *FGF10*, expressed in the mesenchyme, is one of the key elements of both limb buds initiation and AER induction. In *Fgf10*-deficient-mice, limb bud formation is initiated, but

neither the AER nor the ZPA form, resulting in complete truncation of fore- and hindlimbs, restricted to rudimentary scapulas and pelvis respectively (Xu *et al.* 1998). In humans, no *FGF10* homozygous mutation has been described. However, heterozygous mutations of *FGF10* or of other members of its pathway (*FGFR2*, *FGFR3*) are observed in the autosomal dominant Lacrimo-Auriculo-Dento-Digital syndrome (LADD, MIM 149730) (Rohmann *et al.* 2006).

During limb bud initiation, *Fgf10* interacts in a positive regulatory loop with *Fgf8* (expressed in the ectoderm). In humans, no limb phenotype has been described with *FGF8* mutations. The WNT/ β catenin signalling pathway, especially *Wnt3*, is implicated in this feedback loop, therefore being also crucial for AER induction. In humans, a homozygous *WNT3* mutation causes syndromic tetra-amelia (MIM 273395) (Niemann *et al.* 2004). The interlinked BMP pathway, which is involved in the AER's DV position, negatively modulates *Fgf8* expression and, then, the AER induction and function.

Proximodistal axis: Limb-bud outgrowth and AER maintenance, Limb-bud outgrowth termination and the extinction of AER function.

Limb bud outgrowth largely depends on Fibroblast growth factors (FGFs) signalling. *FGF10* induces *FGF8*, *FGF2* and *FGF4* expression in the AER, responsible for the outgrowth of the limb bud along the proximodistal axis (Xu *et al.* 1998). Mutations of several FGF-receptor genes (*FGFRs*) have been identified in some chondrodysplasias and in few craniosynostoses associated with limb anomalies (Wilkie *et al.* 2002). **See also:** [Fibroblast Growth Factors: Evolution](#).

Numerous other genes are expressed in the AER and cannot be all discussed here. We will focus on some of them:

The interaction between Sonic Hedgehog (Shh), the critical diffusible signalling protein secreted by the ZPA, and the Fgf signalling is essential in the AER maintenance and limb bud outgrowth. It involves a positive feedback loop between *Shh*, *Fgf4* and *Grem1* (*Gremlin 1*) an antagonist of the BMPs (Zuniga *et al.* 1999). Precise ending of this signal is required to stop the AER function and, then, restrict the limb bud size. It implies another, however inhibitory, *Fgf/Grem1* feedback loop, which is dependent on high FGF signalling (Verheyden and Sun 2008). *SHH* mutations will be discussed below (see antero-posterior axis). The mouse limb-deformity (ld) phenotype (absent fibulae, radio-ulnar synostosis, brachy- and syn-dactyly) is due to the loss of *Grem1* function. Interestingly, it can be caused by either homozygous mutations from *Grem1* coding region, or homozygous deletions removing regulatory sequences of *Grem1* within *Fmn1* (*Formin*), lying 350kb away (Zuniga *et al.* 2004). In humans no *GREM1* mutations are known to date. But, recently, two *GREM1/FMNI* locus genomic rearrangement have been identified in patients harbouring either malformations reminiscent of Ld phenotype (homozygous deletion of the first 12 5' exons of *FMNI*), or resembling Cenani-Lenz oligosyndactyly (*de novo* 1.7 Mb duplication encompassing 16 genes including *GREM1* and *FMNI*)

(Dimitrov *et al.* 2011). The autosomal recessive Cenani-Lenz oligosyndactyly is otherwise related to mutations of *LRP4*, which antagonizes the canonical WNT signalling. **See also:** [Mammalian Embryo: Wnt Signalling](#).

Continuous WNT/ β catenin signalling is also required for AER maintenance. Both the secreted protein Rspodin2 (*Rspo2*) and the zinc-finger transcription factor Sp8, are implicated in the Wnt/ β catenin pathway. *Rspo2* is expressed in the AER. *Rspo2* and *Wnt3* may act together or independently to activate β catenin signalling. *Rspo2* mutant mice exhibit abnormal distal phalanges and absent nail in forelimbs, and more severe variable hindlimb anomalies (ranging from absent fibula with single digit to split foot or brachydactyly) (Aoki *et al.* 2008). Sp8 is required to maintain Wnt/ β catenin dependent of Fgf signalling and to regulate *Fgf8* expression. In *Sp8*-null mice, the AER precursor cells are induced but the progression to a mature AER fails, resulting in severe truncation of fore- and hindlimbs, associated with neural tube defects (Bell *et al.* 2003). Neither *RSPO2* nor *SP8* mutations have been described in humans.

The Tumor protein P63 (TP63) or Tumor Protein p73-Like (TP73L) gene is located at 3q27 and contains 16 exons. *TP63* generates at least 10 isoforms, either containing the N-terminal transactivation domain (TA $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$) or not (ΔN $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$) \square . All 10 isoforms contain both a deoxyribonucleic acid (DNA)-binding and an oligomerisation domain. Only the α \square isoforms have a C-terminal sterile alpha motif (SAM) domain, involved in protein protein interaction, and a transactivation inhibitory domain (TID). P63 is an important regulator of stem cell maintenance in stratified epithelial tissues and an essential transcription factor in the mesenchymal-ectodermal signalling of the AER. Furthermore, its nontransactivating isotype product induces apoptosis (Vanbokhoven *et al.* 2011). **See also:** [Evolution of the p53 and p63/p73 Gene Families](#).

TP63 mutations have been identified in several human disorders with clear genotype-phenotype correlation, even if variable clinical expressivity is observed within families: The Ectrodactyly-Ectodermal dysplasia-Cleft syndrome type 3 (EEC3, MIM 604292) is due to missense mutations in the DNA-binding domain. In contrast, missense mutations responsible for Hay Wells or Ankyloblepharon-Ectodermal dysplasia-Cleft syndrome (AEC, MIM 106260) without limb malformation are principally located in the SAM domain ; the Acro-dermato-ungual-lacrimal-tooth (ADULT, MIM 103285) syndrome is related to a specific gain of function mutation R298Q/G in exon 8, affecting the DNA-binding domain. Type 4 Split Hand-Split Foot Malformation (SHFM4, MIM 605289) is linked to *P63* mutations that are of various types and dispersed among the gene. Finally, both Limb Mammary syndrome (LMS, MIM 603543), very similar to ADULT and EEC syndromes, and Rapp-Hodgkin Syndrome (RHS, MIM 129400) resembling AEC are also due to *TP63* mutations. SHFM has been located to at least 6 other chromosomal regions.

SHFM1 (MIM 183600) is frequently associated with deafness and/or slight dysmorphic features. SHFM1 is due to deletions of the chromosome 7q21.2-q21.3 region encompassing either both *DLX5* and *DLX6* or one *DLX5/6* cis-regulatory element (SHSF1-BS1) situated more than 250kb from

DLX5/6, or disrupting this regulator from *DLX5/6* (Kouwenhoven *et al.* 2010). Both *DLX5* and *DLX6* are expressed in the AER and play essential redundant functions to maintain the central part of the AER. Interestingly both are likely activated by direct TP63 binding to their promoters, and through the SHSFM1-BS1 enhancer which appears to harbour a TP63-binding site (Kouwenhoven *et al.* 2010).

The more frequent SHFM3 (MIM 246560) is located at chromosome 10q24, in a region syntenic to that of the murine dactylaplasia locus (*Dac*). The *Dactylin* gene encodes a member of the F-box/WD40 protein, involved in cell cycle regulation. In mice heterozygous *Dac* mutations are associated with central ray defects resembling SHFM. In humans, SHFM3 is not due to *DAC* mutations but to a tandem genomic duplication of chromosome 10q24.31–10q24.32 (de Mollerat *et al.* 2003). The tetramelic monodactyly is often due to the same anomaly.

Homozygous *WNT10b* mutations at chromosome 12q13, are responsible for the autosomal recessive SHFM6 (MIM 225300) (Blattner *et al.* 2010).

The genetic cause has not been yet identified for SHFM2 (MIM 313350) and SHFM5 (MIM 606708), which map to Xq26 and 2q31, respectively.

Other SHFM loci have been suggested (19p13.11, 17p13, etc.).

Anteroposterior axis: The ZPA and the sonic hedgehog signalling pathway

As already stated the anterior-posterior (pre post-axial) polarity of the limb bud depends on the ZPA, which is located at the post-axial side of the limb bud. It has been demonstrated that SHH is the critical ZPA secreted protein responsible for establishing antero-posterior polarity and specifying digit pattern. The hedgehog genes encode secreted diffusible proteins (morphogens) involved in cell-to-cell signalling. *SHH* has a pleiotropic expression pattern and is involved in multiple developmental processes. *SHH* heterozygous mutations have been identified in some human holoprosencephalies, but limb anomalies are rarely associated. In mice, only homozygous *Shh* mutations lead to limb malformation (loss of all digits in the forelimbs and digits II to V in the hindlimbs).

In the limb bud, *SHH* expression is confined to the ZPA and numerous trials in animals have demonstrated that the limb bud is able to tightly regulate the amount of Shh production (Harfe 2011). Shh diffuses from the anterior to the posterior margin of the bud. Both temporal and spatial regulation are likely important for its action. Digits V to II are specified according either to time spent in the presence of Shh, or to Shh long-range diffusion. Digit I identity is independent of Shh information, as it is the solely digit which forms in its absence, and is likely due to Gli3R action.

Indeed GLI-Kruppel family member Gli3 is one fundamental actor of the Shh regulation and signalling pathway (Biesecker 2006). *Gli3* products a full-length activator form (Gli3A), involved in Shh signal transduction, and a processed short repressor form (Gli3R). In the presence of Shh, the processing is inhibited, leading to Gli3R level being low at the anterior border and high at the posterior side of the limb bud. As stated above, Gli3R is likely responsible for anterior (thumb) identity. The

Annexe

mouse homozygous mutant extra toes (semidominant mutation inactivating *Gli3*) exhibits hemimelia, polysyndactyly of up to eight digits and loss of digit identity related to the ectopic expression of *Shh* and *Ptc* in the anterior part of the bud and anterior deregulation of target genes expression. In humans, *GLI3* mutations are implicated in different syndromes (Biesecker 2006). These autosomal-dominant “GLI3 morphopathies” are mainly characterized by their pleiotropy and the variability of their expression, even within the same family. They include Greig cephalo-polysyndactyly syndrome (GCPS, MIM 175700), Pallister–Hall syndrome (PHS, MIM 146510), postaxial polydactyly type A or A/B (MIM 174200) and preaxial polydactyly type IV (MIM 174700). A certain genotype phenotype correlation has been described: mutations causing GCPS being mainly inactivating and those leading to PHS being at least truncation mutations in the middle third of *GLI3* (Johnston *et al.* 2005; Biesecker, 2006).

It has been recently demonstrated that *SHH* expression in the ZPA is strongly regulated by a long-range enhancer named ZPA Regulatory sequence (ZRS) situated within intron 5 of *LMBR1* (Limb Region 1 mouse homolog), situated 1Mb far from *SHH*. This *cis*-acting regulator is highly conserved from fish to mammals (Lettice *et al.* 2003). It is separated from *SHH* by large highly conserved non-coding region (gene desert) containing other *SHH* regulatory elements likely specific to its central nervous system expression (Jeong *et al.* 2006). In the ZPA *Shh* transcription probably depends from chromosomal conformation dynamics at the *Shh* locus. Indeed, the ZRS is likely looping out of its initially close vicinity to *Shh*, only in the anterior mesenchyme (Amano *et al.* 2009). **See also:** [Enhancers](#).

In the limbs, the ZRS is both needed and sufficient to direct *SHH* expression in the ZPA. In the absence of ZRS activity the phenotype is similar to that observed in *Shh* KO animals. In humans as well as in animals, various ZRS mutations are able to create an ectopic ZPA (and ectopic *Shh* expression) at the anterior border of the limb bud. Depending on the level of this additional expression, the following phenotypes are: Preaxial Polydactyly type II (PPD type II) Triphalangeal thumb (TPT) or Triphalangeal Thumb-PolySyndactyly (TPTPS) (MIM 174500), as well as syndactyly type IV (MIM 186300). Furthermore a homozygous deletion introducing a premature stop codon downstream of *LMBR1* exon 3 has been identified in acheiropody (MIM200500) (Ianakiev *et al.* 2001).

Numerous factors interact to regulate the ZRS. *Hand2*, a basic helix–loop–helix transcription factor is one of the most important. *Hand2* proceeds directly with the ZRS, probably through the formation of a transcriptional complex with *Hoxd13* proteins, which is antagonized by *Gli3R* (Galli *et al.* 2010). No mutation of *HAND2* has been yet identified in human limb malformation. *HOXD13* has, at its 5' end, a repeated sequence coding for 15 alanines. Expansion of this polyalanine tract to 22-29 alanines, which are stable through generations, are mainly associated with synpolydactyly type I (SPD1, MIM 186000) (Malik and Grzeschik, 2008). Both penetrance and severity increase progressively with increasing expansion size. This expansion likely has a dominant-negative effect. Recently polyalanine tract

Annexe

contractions (from 4 to 7 alanines) have been described with either SPD like phenotype or VACTERL association (MIM 192350), which is otherwise mainly sporadic. Finally, *HOXD13* mutations in the homeodomain are responsible for diverse phenotypes remaining either SPD or brachydactylies type D (MIM 113200) or type E (MIM 113300)], or brachydactyly syndactyly (MIM 61071)], or syndactyly type V (MIM 186300). Note that SPD is genetically heterogeneous and that SPD2 (MIM 608180) is due to a translocation disrupting the fibulin-1 gene and that SPD3 (MIM 610234) has been located to 14q11.2 q12

Other proteins acting upstream the ZRS probably cooperate with the Hand2–Hoxd13 complex as Tbx2 and Tbx3 do. In humans, *TBX3* mutations are responsible for Schinzel or Ulnar-Mammary syndrome (UMS, MIM 601621). It is noteworthy that *TBX3* and 5 are neighbours on chromosome 12q24.21, and can be both deleted in a contiguous gene deletion syndrome responsible for the association of features of HOS and UMS.

The gene regulatory network downstream *Shh* is complex and only partially known (Bangs *et al.* 2010). Numerous molecules are involved in the SHH signalling pathway, so the following list is not exhaustive. **See also:** [Hedgehog Signalling](#).

SHH becomes covalently linked to cholesterol in its maturation process. The cholesterol level drops in Smith Lemli Opitz syndrome (SLO (MIM 270400).

The SHH receptor patched (PTC) interacts with the transmembrane protein smoothed (SMO). *PTCH* mutations result in Gorlin syndrome (MIM 109400).

Furthermore it is known that cilia play a key role in many cell signalling pathways, including the hedgehog signal (Wong and Reiter 2008). Numerous ciliopathies are associated with limb anomalies (Bisgrove and Yost 2006), mainly polydactylies, as in Meckel-Gruber syndromes (MIM 249000 and others), Oro-facio-digital syndrome type 1 (MIM 311200), Bardet-Biedl syndromes (MIM 209900), Ellis Van Creveld (MIM 225500), Mc Kusik Kaufmann (MIM 236700). **See also:** [Cilia and Flagella](#).

DV axis

Multiple transcription factors are believed to be involved in the signalling pathway determining the DV axis of the limb bud in humans. Most of them, in particular those acting in the regulation of proximal DV polarization, are so far unknown. In mice, a number of transcription factors are involved in distal DV patterning. A double dorsal phenotype is observed if *Engrailed* (*En1*) is mutated, and a double ventral phenotype in case of *Wingless-related MMTV integration site 7A* (*Wnt7A*) or *LIM homeobox transcription factor-1* (*Lmx1b*) mutation.

The dorsal ectoderm of the limb bud produces the secreted molecule Wnt7a, whereas *Wnt7a* expression is repressed in the ventral ectoderm by *En1*. The ventral expression of *En1* itself is regulated by BMP signaling. Wnt7a induces *Lmx1b* expression in the subjacent dorsal mesenchyme.

Then, *Lmx1b* triggers the development of dorsal structures through its numerous target genes (Gu and Kania, 2010).

In humans, *WNT7A* mutations are responsible for Fuhrmann syndrome (fibular aplasia or hypoplasia, femoral bowing, and poly, syn-, and oligo-dactyly, MIM 228930) or Al-Awadi/Raas-Rothschild/Schinzel phocomelia (absence of ulna and fibula with severe limb deficiency, MIM 276820). In these latter autosomal recessive syndromes the nails are absent.

Numerous mutations of *LMX1B*, probably leading to haploinsufficiency, have been identified in the Nail-Patella syndrome (NPS, MIM 161200), with absent or slight genotype phenotype correlation (Sweeney *et al.* 1993; Marini *et al.* 2010).

Further Patterning

Apart from its growth and polarization, limb bud patterning includes numerous events necessary for the determination of limb morphogenesis. Multiple genes, most of which remain unknown, are involved in these events. Some of these genes have been implicated in human limb malformations, the architectural homeobox-containing transcription factor (*HOX*) genes and several genes implicated in chondrogenesis.

Architectural homeobox genes

In humans, the homeobox transcription factors (*HOX*) genes are organised in four clusters A, B, C and D located on chromosomes 7p15, 17q21, 12q13 and 2q31, respectively. Neither HoxB nor HoxC clusters are likely involved in the limb patterning, since their deletions in animal models do not result in any limb phenotype. On the contrary, both HoxA and HoxD are important actors of the limb bud patterning. As for the main body axis, both expression patterns undergo a collinear regulation in time and space, with the 3' located genes expressed early in the anterior and proximal regions, and the 5' located genes expressed later in the posterior and distal regions of the embryo. This expression evolves in two waves: both HoxA and D are initially activated in the posterior region of the bud, thereafter HoxA expression is observed in the distal bud region without polarization, whereas HoxD expression remains polarized in the posterior part of the distal bud. **See also:** [Hox Genes: Embryonic Development; Mammalian Embryo: Hox Genes.](#)

HoxA and D clusters genes play important roles in the AER formation as well as in the ZPA regulation (see above interactions between *Hand2* and *HoxD13*). Apart from the SPD and other phenotypes associated with *HOXD13* mutations (Cf. above) numerous human limb malformations are due to *HOX* genes mutations.

Severe developmental defects of all four limbs and genitalia were observed in patients heterozygous for a deletion that eliminates at least eight (*HOXD3-HOXD13*) genes in the HOXD cluster, thus leading to haploinsufficiency of HOXD cluster genes (Del Campo *et al.* 1999).

HOXA13 mutations ranging from polyalanine tract expansion (likely dominant-negative) to point or nonsense mutations (probably responsible for loss of function) lead to Hand Foot Genital syndrome (HFGS, MIM 140000), or Guttmacher syndrome (MIM 176305).

HOXA10 and *HOXA11* are involved in forearm morphogenesis. In addition, *HOXA10* is expressed in hematopoietic precursor cells. A missense *HOXA11* mutation has been identified in a family with radioulnar synostosis and amegakaryocytic thrombocytopenia (RSAT, (MIM605432) (Thompson and Nguyen 2000). This is different from Thrombocytopenia–Absent Radius syndrome (TAR, MIM274000) which is related to a necessary but not sufficient 1p21.1 deletion. A second event is necessary for the phenotype to appear, but it remains unknown (Klopocki *et al.* 2007).

Recently two microduplications on chromosome 2q31.1–q31.2 were identified in patients harbouring Mesomelic dysplasia type Kantaputra (MDK, MIM 156232). Both likely modify the topography of *HOXD* locus and deregulate the *HOXD* gene cluster expression (Kantaputra *et al.* 2010). This hypothesis is reinforced by the observation of deregulation of at least *HOXD10*, *12* and *13* due to a 2q31.1–q31.2 duplication responsible for syndactyly (Ghoumid *et al.* 2011).

Chondrogenesis

Proper regulation of chondrocyte differentiation is necessary for the morphogenesis of skeletal elements. BMP and cartilage-derived morphogenetic proteins (CDMP) belong to the transforming growth factor- β (TGF β) family. These secreted signalling molecules elicit their effect on target cells through their specific serine/threonine kinase cell-surface receptors, and the SMAD proteins, which relay the signal from the cell surface to the nucleus.

As stated above, BMP signalling has a dynamic task. It is required early for the AER formation, and later to stop the *FGF* expression. BMPs are targets of the Hedgehog pathway and key regulators of the antero-posterior limb axis and *HOX* expression. BMPs play pivotal roles in the initiation of chondrogenesis, cartilage differentiation and apoptosis, in particular in interdigital spaces through the modulation of AER–FGFs signals. **See also:** [Bone Morphogenetic Proteins and Their Receptors](#).

No mutations of BMP genes have yet been described in human limb malformations. However, a microduplication of about 5.5 kb of chromosome 20p12.3 in a noncoding sequence downstream *BMP2* was recently detected in brachydactyly type A2 (BDA2, MIM 112600), which otherwise can be due to mutations in the BMP receptor 1B (*BMPR1B*) gene or in its ligand Growth and differentiation factor 5 (*GDF5*). The duplicated region likely contains a limb-specific enhancer of *BMP2* (Dathe *et al.* 2009).

GDF5, or Cartilage-derived morphogenetic protein 1 (CDMP1), acts in chondrogenesis and positioning of joints. Mice with disruption or homozygous mutations of *Gdf5* (brachypodism) have an abnormal length and number of distal limb bones. In humans, *GDF5* mutations can, by different mechanisms, be responsible for limb malformations of variable transmission mode and severity:

Annexe

Hunter-Thompson Acromesomelic dysplasia (MIM 201250), Grebe Chondrodysplasia, (MIM 200700), Fibular hypoplasia and complex brachydactyly (MIM 228900), Brachydactyly type C (MIM 113100). However, the *GDF5* mutation phenotype spectrum has been recently enlarged to brachydactyly type A2 (MIM 112600), as well as multiple synostosis (SYN2, MIM 610017) and proximal Symphalangism (SYM1, MIM 185800). Furthermore, a SNP in the 5-prime untranslated region (UTR) of *GDF5* is associated with osteoarthritis (MIM 612400) in Asian populations (Miyamoto *et al.* 2007).

The secreted polypeptide Noggin antagonizes BMP signals by competing for their serine threonine kinase receptors. In homozygous transgenic mice in which *Nog* has been deleted, the bud cartilage becomes hyperplastic and joints fail to appear. In humans, the NOG-related symphalangism spectrum disorders (NOG-SSD) (Potti *et al.* 2011) encompasses: proximal symphalangism (SYM1, MIM 185800), multiple synostosis (SYN1, MIM 186500), tarsal-carpal coalition (TCC, MIM 186570), stapes ankylosis with broad thumbs and toes (MIM 184460), and brachydactyly type B2 (MIM 611377) syndromes. Interestingly, SYN is genetically heterogeneous, and can also be due to either *GDF5* (SYN2) or *FGF9* (SYN3, MIM 612961) mutations.

Indian hedgehog (IHH) has properties similar to those of SHH, including the ability to regulate the PTC, GLI and BMP pathways *via* a negative feedback loop regulation of parathyroid hormone-related protein (PTHrP). IHH is implicated in the initial condensation and subsequent growth and differentiation of cartilage. Heterozygous mutations of *IHH* have been identified in type A1 (Farabee) brachydactyly (BDA1, MIM 112500), (Byrnes *et al.* 2009), whereas homozygous *IHH* mutations lead to Acrocapitofemoral dysplasia (ACFD, MIM 607778) (Hellemans *et al.* 2003).

Another gene, whose product plays a pivotal role in chondrogenesis, is the *receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 (ROR2)*. Ror2 is a receptor for Wnt5a and acts to inhibit canonical Wnt signaling. *Ror2* is selectively expressed in the chondrocytes of cartilage anlagen, and is thus probably important in their initial growth and patterning. In humans, homozygous *ROR2* mutations have been implicated in the autosomal recessive form of Robinow syndrome (or COVESDEM syndrome) (MIM 268310), whereas heterozygous *ROR2* mutations lead to type B brachydactyly (MIM 113000) (Afzal and Jeffery 2003). Interestingly *WNT5A* heterozygous mutations have been recently identified in the autosomal dominant form of Robinow syndrome (MIM 180700) (Person *et al.* 2010).

Other genes

In this short review we were unable to cite all genes implicated in limb development or phenotypes. Some of them are listed in Table 1.

Conclusion

The key genes involved in limb development have been identified and their interactions recognized. Helped by these discoveries, geneticists have been able to identify, or at least localize, numerous genes responsible for limb anomalies. According to their genetic aetiology, connexions have also been established between lesions that are clinically dissimilar, and limb anomalies constitute excellent examples of both clinical and genetic heterogeneity. Furthermore, recent studies have enlightened the role of regulatory elements in the developmental processes, and limb development can be considered a paradigm of this phenomenon.

References

- Afzal, A. R. and S. Jeffery (2003). "One gene, two phenotypes: ROR2 mutations in autosomal recessive Robinow syndrome and autosomal dominant brachydactyly type B." Hum Mutat **22**(1): 1-11.
- Amano, T., T. Sagai, et al. (2009). "Chromosomal dynamics at the Shh locus: limb bud-specific differential regulation of competence and active transcription." Dev Cell **16**(1): 47-57.
- Aoki, M., H. Kiyonari, et al. (2008). "R-spondin2 expression in the apical ectodermal ridge is essential for outgrowth and patterning in mouse limb development." Dev Growth Differ **50**(2): 85-95.
- Bangs, F., M. Welten, et al. (2010). "Identification of genes downstream of the Shh signalling in the developing chick wing and syn-expressed with Hoxd13 using microarray and 3D computational analysis." Mech Dev **127**(9-12): 428-41.
- Basson, C. T., T. Huang, et al. (1999). "Different TBX5 interactions in heart and limb defined by Holt-Oram syndrome mutations." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(6): 2919-24.
- Bell, S. M., C. M. Schreiner, et al. (2003). "Sp8 is crucial for limb outgrowth and neuropore closure." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(21): 12195-200.
- Biesecker, L. G. (2006). "What you can learn from one gene: GLI3." J Med Genet **43**(6): 465-9.
- Bisgrove, B. W. and H. J. Yost (2006). "The roles of cilia in developmental disorders and disease." Development **133**(21): 4131-43.
- Blattner, A., A. R. Huber, et al. (2010). "Homozygous nonsense mutation in WNT10B and sporadic split-hand/foot malformation (SHFM) with autosomal recessive inheritance." Am J Med Genet A **152A**(8): 2053-6.
- Brassington, A. M., S. S. Sung, et al. (2003). "Expressivity of Holt-Oram syndrome is not predicted by TBX5 genotype." Am J Hum Genet **73**(1): 74-85.
- Byrnes, A. M., L. Racacho, et al. (2009). "Brachydactyly A-1 mutations restricted to the central region of the N-terminal active fragment of Indian Hedgehog." Eur J Hum Genet **17**(9): 1112-20.
- Capellini, T. D., V. Zappavigna, et al. (2011). "Pbx homeodomain proteins: TALEnted regulators of limb patterning and outgrowth." Dev Dyn **240**(5): 1063-86.

Annexe

- Dathe, K., K. W. Kjaer, et al. (2009). "Duplications involving a conserved regulatory element downstream of BMP2 are associated with brachydactyly type A2." Am J Hum Genet **84**(4): 483-92.
- Del Campo, M., M. C. Jones, et al. (1999). "Monodactylous limbs and abnormal genitalia are associated with hemizyosity for the human 2q31 region that includes the HOXD cluster." Am J Hum Genet **65**(1): 104-10.
- Dimitrov, B. I., T. Voet, et al. (2011). "Genomic rearrangements of the GREM1-FMN1 locus cause oligosyndactyly, radio-ulnar synostosis, hearing loss, renal defects syndrome and Cenani--Lenz-like non-syndromic oligosyndactyly." J Med Genet **47**(8): 569-74.
- Galli, A., D. Robay, et al. (2010). "Distinct roles of Hand2 in initiating polarity and posterior Shh expression during the onset of mouse limb bud development." PLoS Genet **6**(4): e1000901.
- Ghoulid, J., J. Andrieux, et al. (2011). "Duplication at chromosome 2q31.1-q31.2 in a family presenting syndactyly and nystagmus." Eur J Hum Genet.
- Gibert, Y., A. Gajewski, et al. (2006). "Induction and pre patterning of the zebrafish pectoral fin bud requires axial retinoic acid signaling." Development **133**(14): 2649-59.
- Grandel, H. and M. Brand (2010). "Zebrafish limb development is triggered by a retinoic acid signal during gastrulation." Dev Dyn **240**(5): 1116-26.
- Gu, W. X. and A. Kania (2010). "Identification of genes controlled by LMX1B in E13.5 mouse limbs." Dev Dyn **239**(8): 2246-55.
- Gurnett, C. A., F. Alaei, et al. (2008). "Asymmetric lower-limb malformations in individuals with homeobox PITX1 gene mutation." Am J Hum Genet **83**(5): 616-22.
- Harfe, B. D. (2011). "Keeping up with the zone of polarizing activity: New roles for an old signaling center." Dev Dyn **240**(5): 915-9.
- Hellems, J., P. J. Coucke, et al. (2003). "Homozygous mutations in IHH cause acrocapitofemoral dysplasia, an autosomal recessive disorder with cone-shaped epiphyses in hands and hips." Am J Hum Genet **72**(4): 1040-6.
- Ianakev, P., M. J. van Baren, et al. (2001). "Acheiropodia is caused by a genomic deletion in C7orf2, the human orthologue of the Lmbr1 gene." Am J Hum Genet **68**(1): 38-45.
- Jeong, Y., K. El-Jaick, et al. (2006). "A functional screen for sonic hedgehog regulatory elements across a 1 Mb interval identifies long-range ventral forebrain enhancers." Development **133**(4): 761-72.
- Johnston, J. J., I. Olivos-Glander, et al. (2005). "Molecular and clinical analyses of Greig cephalopolysyndactyly and Pallister-Hall syndromes: robust phenotype prediction from the type and position of GLI3 mutations." Am J Hum Genet **76**(4): 609-22.
- Kantaputra, P. N., E. Klopocki, et al. (2010). "Mesomelic dysplasia Kantaputra type is associated with duplications of the HOXD locus on chromosome 2q." Eur J Hum Genet **18**(12): 1310-4.

Annexe

- Klopocki, E., H. Schulze, et al. (2007). "Complex inheritance pattern resembling autosomal recessive inheritance involving a microdeletion in thrombocytopenia-absent radius syndrome." Am J Hum Genet **80**(2): 232-40.
- Kohlhase, J., D. Chitayat, et al. (2005). "SALL4 mutations in Okihiro syndrome (Duane-radial ray syndrome), acro-renal-ocular syndrome, and related disorders." Hum Mutat **26**(3): 176-83.
- Koshiba-Takeuchi, K., J. K. Takeuchi, et al. (2006). "Cooperative and antagonistic interactions between Sall4 and Tbx5 pattern the mouse limb and heart." Nat Genet **38**(2): 175-83.
- Kouwenhoven, E. N., S. J. van Heeringen, et al. (2010). "Genome-wide profiling of p63 DNA-binding sites identifies an element that regulates gene expression during limb development in the 7q21 SHFM1 locus." PLoS Genet **6**(8): e1001065.
- Lettice, L. A., S. J. Heaney, et al. (2003). "A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly." Hum Mol Genet **12**(14): 1725-35.
- Malik, S. and K. H. Grzeschik (2008). "Synpolydactyly: clinical and molecular advances." Clin Genet **73**(2): 113-20.
- Marini, M., R. Bocciardi, et al. (2010). "A spectrum of LMX1B mutations in Nail-Patella syndrome: new point mutations, deletion, and evidence of mosaicism in unaffected parents." Genet Med **12**(7): 431-9.
- Menke, D. B., C. Guenther, et al. (2008). "Dual hindlimb control elements in the Tbx4 gene and region-specific control of bone size in vertebrate limbs." Development **135**(15): 2543-53.
- Miyamoto, Y., A. Mabuchi, et al. (2007). "A functional polymorphism in the 5' UTR of GDF5 is associated with susceptibility to osteoarthritis." Nat Genet **39**(4): 529-33.
- de Mollerat, X. J., F. Gurrieri, et al. (2003). "A genomic rearrangement resulting in a tandem duplication is associated with split hand-split foot malformation 3 (SHFM3) at 10q24." Hum Mol Genet **12**(16): 1959-71.
- Niemann, S., C. Zhao, et al. (2004). "Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family." Am J Hum Genet **74**(3): 558-63.
- Person, A. D., S. Beiraghi, et al. (2010). "WNT5A mutations in patients with autosomal dominant Robinow syndrome." Dev Dyn **239**(1): 327-37.
- Potti, T. A., E. M. Petty, et al. (2011). "A comprehensive review of reported heritable noggin-associated syndromes and proposed clinical utility of one broadly inclusive diagnostic term: NOG-related-symphalangism spectrum disorder (NOG-SSD)." Hum Mutat **32**(8): 877-86.
- Rallis, C., B. G. Bruneau, et al. (2003). "Tbx5 is required for forelimb bud formation and continued outgrowth." Development **130**(12): 2741-51.
- Rohmann, E., H. G. Brunner, et al. (2006). "Mutations in different components of FGF signaling in LADD syndrome." Nat Genet **38**(4): 414-7.

Annexe

- Stratford, T., C. Horton, et al. (1996). "Retinoic acid is required for the initiation of outgrowth in the chick limb bud." Curr Biol **6**(9): 1124-33.
- Sweeney, E., J. E. Hoover-Fong, and McIntosh I. (1993 (updated 2009)). "Nail-Patella Syndrome". In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR and Stephens K (eds) *Source Gene Reviews (Internet)* Seattle, WA: University of Washington
- Thompson, A. A. and L. T. Nguyen (2000). "Amegakaryocytic thrombocytopenia and radio-ulnar synostosis are associated with HOXA11 mutation." Nat Genet **26**(4): 397-8.
- Vanbokhoven, H., G. Melino, et al. (2011). "p63, a story of mice and men." J Invest Dermatol **131**(6): 1196-207.
- Verheyden, J. M. and X. Sun (2008). "An Fgf/Gremlin inhibitory feedback loop triggers termination of limb bud outgrowth." Nature **454**(7204): 638-41.
- Wilkie, A. O., S. J. Patey, et al. (2002). "FGFs, their receptors, and human limb malformations: clinical and molecular correlations." Am J Med Genet **112**(3): 266-78.
- Wong, S. Y. and J. F. Reiter (2008). "The primary cilium at the crossroads of mammalian hedgehog signaling." Curr Top Dev Biol **85**: 225-60.
- Xu, X., M. Weinstein, et al. (1998). "Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction." Development **125**(4): 753-65.
- Zuniga, A., A. P. Haramis, et al. (1999). "Signal relay by BMP antagonism controls the SHH/FGF4 feedback loop in vertebrate limb buds." Nature **401**(6753): 598-602.
- Zuniga, A., O. Michos, et al. (2004). "Mouse limb deformity mutations disrupt a global control region within the large regulatory landscape required for Gremlin expression." Genes Dev **18**(13): 1553-64.

Further Reading

- Brison, N., P. Tylzanowski, et al. (2011). "Limb skeletal malformations - What the HOX is going on?" Eur J Med Genet. (Epub ahead of print)
- Chiang, C., Y. Litingtung, et al. (2001). "Manifestation of the limb prepattern: limb development in the absence of sonic hedgehog function." Dev Biol **236**(2): 421-35.
- Duboc, V. and M. P. Logan (2011). "Regulation of limb bud initiation and limb-type morphology." Dev Dyn **240**(5): 1017-27.
- Fernandez-Teran, M. and M. A. Ros (2008). "The Apical Ectodermal Ridge: morphological aspects and signaling pathways." Int J Dev Biol **52**(7): 857-71.
- Goodman, F. R. (2002). "Limb malformations and the human HOX genes." Am J Med Genet **112**(3): 256-65.

Annexe

- Hill, R. E. (2007). "How to make a zone of polarizing activity: insights into limb development via the abnormality preaxial polydactyly." Dev Growth Differ **49**(6): 439-48.
- Naruse, I., E. Ueta, et al. (2010). "Birth defects caused by mutations in human GLI3 and mouse Gli3 genes." Congenit Anom (Kyoto) **50**(1): 1-7.
- Rinne, T., H. G. Brunner, et al. (2007). "p63-associated disorders." Cell Cycle **6**(3): 262-8.
- Temtamy, S. A. and M. S. Aglan (2008). "Brachydactyly." Orphanet J Rare Dis **3**: 15.
- Zakany, J. and D. Duboule (2007). "The role of Hox genes during vertebrate limb development." Curr Opin Genet Dev **17**(4): 359-66.

Annexe

Table 1: Some syndromes with limb malformation and associated genes (identified or localised)

| Syndrome | Inheritance | Location | Genetic anomaly | Limb malformation | Other malformations |
|---|-------------|---|--|---|---|
| Holt–Oram [MIM 142900] | AD with PV | 12q24.1 | <i>TBX5</i> | Upper limbs: radial ray anomalies (hypoplastic, absent, triphalangeal thumb, radial agenesis/hypoplasia rare phocomelia) Rare less typical cases | Cardiac malformations |
| Okhiro [MIM 607323] | AD with PV | 20q13.2 20q13.2 | <i>SALL4</i> <i>SALL4</i> | Radial ray anomalies | Duane anomaly, various kidney, vertebral, ear, cardiac and choanal malformations |
| Oculo-oto-radial (IVIC) [MIM 147750] | AD with PV | 20q13.2 | <i>SALL4</i> | Radial ray anomalies | Strabismus, anal, genital, vertebral malformations, thrombopenia |
| Ischiopatellar dysplasia [MIM 147891] | AD with PV | 17q21–q22 | <i>TBX4</i> | Abnormal ischiopubic junction ossification, absent/hypoplastic patella | Micrognathia, Cleft palate |
| Congenital clubfoot [MIM 119800] | AD with PV | 5q31.1 | <i>PITX1</i> | Asymmetric lower limb anomalies Clubfoot Absent tibia | |
| LADD [MIM 602115] [MIM 134934] [MIM 176943] | AD with PV | 5p12 4p16.3 10q26.13 | <i>FGF10</i> <i>FGFR3</i> <i>FGFR2</i> | Various radial anomalies Broad halluces, II–III, III–IV toe syndactyly | Ear anomalies, hearing loss, lacrimal and dental anomalies, renal agenesis |
| Tetra-amelia [MIM 273395] | AR | 17q21.31 | <i>WNT3</i> | Tetra-amelia | Multiple cardiac, renal gastro-intestinal and pulmonary anomalies, dysmorphia |
| Atypical SHFM | S | 15q13.3 | <i>FMN1</i> deletion | Oligodactyly Radioulnar synostosis | Unilateral renal aplasia |
| Atypical Cenani-Lenz oligosyndactyly | S | 15q13.3 | <i>FMN1-GREM1</i> duplication | Oligosyndactyly | Hearing loss |
| Cenani-Lenz oligosyndactyly [MIM 604270] | AR | 11p12–p11.2 | <i>LRP4</i> | Oligosyndactyly. Short and fused radius and ulna | |
| EEC 1 [MIM 129900] | AD with PV | 7q11.2–21.3 3q27 | <i>TP63</i> | Split hands and feet | Ectodermal dysplasia (skin, nails, hair, teeth and lacrimal duct defects). Cleft lip/palate |
| 3[MIM 604292] ADULT [MIM 103285] | AD | 3q27 | <i>TP63</i> | Ectro/syndactyly | Ectodermal dysplasia. Hypoplastic breasts and nipples. Freckling |
| Limb-mammary [MIM 603543] | AD | 3q27 | <i>TP63</i> | Ectro/syndactyly/split feet | Lacrimal duct defects, nail dysplasia. Hypoplastic breasts and nipples, hypodontia |
| AEC [MIM 106260] | AD with PV | 3q27 | <i>TP63</i> | | Ectodermal dysplasia. Ankyloblepharon. Cleft lip/palate |
| Greig [MIM 175700] | AD | 7p14.1 | <i>GLI3</i> | Hands and feet: syndactyly. Feet: pre-axial polydactyly. Hands: rare postminimus | Macrocephaly, frontal bossing, hypertelorism |
| Pallister–Hall [MIM 146510] | AD or S | 7p14.1 | <i>GLI3</i> | Central, or more rarely, post-axial polydactyly and syndactyly | Hypothalamic hamartoma. Multiple malformations |
| Acheiropody [MIM 200500] | AR | 7q36.3 | <i>ZRS LMBR1</i> | Amputations of the distal upper and lower extremities | |
| Schinz Ulnar-mammary [MIM 601621] | AD with PV | 12q24.1 | <i>TBX3</i> | Ulnar ray malformation, Vth finger agenesis or duplication, IVth/Vth toe hypoplasia | Mammary/sweat gland hypoplasia. Dental, urogenital, cardiac anomalies. Obesity, hypogonadism in boys |
| SLO [MIM 270400] | AR | 11q12–q13 | <i>DHCR7</i> | Syndactyly of toes II–III. Post-axial polydactyly | Growth/mental retardation. Multiple malformations. Dysmorphia. Sexual ambiguity in boys |
| Gorlin [MIM 109400] | AD with PV | 9q22.32 | <i>PTCH</i> | Brachydactyly, Short IVth metacarpals, Pre- or post-axial polydactyly, II–III Syndactyly of toes | Nevoid basal cell carcinoma. Frontal bossing, broad face, rib, vertebral anomalies |
| Meckel Gruber 1 [MIM 249000] 2 [MIM 603194] 3 [MIM 607361] 4 [MIM 611134] 5 [MIM 611561] 6 [MIM 612284] 7 [MIM 267010] 8 [MIM 613885] 9 [MIM 614209] 10 [MIM 614175] OFDI | AR | 17q22 11q13 8q21 12q21.3 16q12.2 4p15 3q22 12q24 17p11 19p13 Xp22.2 | <i>MKS1</i> <i>TMEM216</i> <i>TMEM67</i> <i>CEP290</i> <i>RPGRIP1L</i> <i>CC2D2A</i> <i>NPHP3</i> <i>TCTN2</i> <i>B9D1</i> <i>B9D2</i> <i>CXORF5</i> | Post-axial polydactyly | Posterior encephalocele, polycystic kidneys |
| Bardet–Biedl | AR | 1: 11q13.2 | <i>BBS1</i> | Syndactyly. Clinodactyly. Brachydactyly. Rare post-axial polydactyly | Mental retardation. Abnormal oral frenula, tongue and upper lip, adult onset polycystic kidney Mental retardation. Pigmentary retinopathy. Obesity |

Annexe

| Syndrome | Inheritance | Location | Genetic anomaly | Limb malformation | Other malformations |
|---|-------------|--|---|--|--|
| [MIM 209900] See also: Bardet-Biedl Syndrome, an Oligo-genic Disease | Digenic | 2: 16q12.2 3: 3q11.2 4: 15q24.1 5: 2q31.1 6: 20p12.2 7: 4q27 8: 14q31.3 9: 7p14.3 10: 12q21.2 11: 9q33.1 12: 4q27 13: 17q22 14: 12q21.32 15: 2p15 | <i>BBS2</i> <i>ARL6</i> <i>BBS4</i> <i>BBS5</i> <i>MKKS</i> <i>BBS7</i> <i>TTC8</i> <i>PTHB1</i> <i>BBS10</i> <i>TRIM32</i> <i>BBS12</i> <i>MKSI</i> <i>C2orf86</i> | | Hypogonadism ... |
| Ellis-van Creveld [MIM 225500] | AR | 4p16.2 4p16.2 | <i>EVC</i> <i>EVC2</i> | Short limbs, post-axial polydactyly Capitate and hamate fusion Genu valgum | Cardiac defects. Short ribs. Dysplastic nails and teeth, alveolar ridge defect, genital anomalies in boys |
| McKusick-Kaufman [MIM 236700] | AR | 20p12.2 | <i>MKKS</i> | Post-axial polydactyly | Cardiac defects. Hydrometrocolpos |
| Weyers Acrofacial dysostosis [MIM 193530] | AD | 4p16.2 | <i>EVC</i> | Short hands, post-axial polydactyly | Dysplastic teeth, multiple frenula |
| Fuhrmann [MIM 228930] | AR | 3p25.1 | <i>WNT7A</i> | Dysplastic nails Absent/hypoplastic fibula. Absent nails | Amenorrhea |
| Al-Awadi/Raas-Rothschild Schinzel phocomelia [MIM 276820] | AR | 3p25.1 | <i>WNT7A</i> | Hands: post-axial polydactyly, syndactyly Feet: oligo/syndactyly Phocomelia, oligodactyl. Absent nails | Dysmorphia, genital anomalies, occipital meningocele |
| Nail-Patella [MIM 161200] | AD with PV | 9q34.1 | <i>LMX1B</i> | Abnormal fingernails, patella and elbows | Open-angle glaucoma. Renal failure due to glomerular basal membrane anomalies |
| HOXD cluster deletion | S | 7p15-p14.2 | <i>HOXD3-HOXD13 deletion</i> | Only one mesomelic bone. Mono/oligodactyly | Penoscrotal hypoplasia |
| Hand Foot Genital [MIM 140000] | AD with PV | 7p15.2 | <i>HOXA13</i> | Short first rays (metacarpal/tarsal and distal phalanges). Short Vth finger middle phalanx. Carpal fusion/retarded maturation | Urogenital malformations |
| Guttmacher [MIM 176305] | AD with PV | 7p15.2 | <i>HOXA13</i> | Pre-axial anomalies Post-axial polydactyly of hands Short second toes | Hypospadias |
| RSAT [MIM 605432] | AD with PV | 7p15-p14.2 | <i>HOXA11</i> | Proximal radioulnar synostosis | Amegakaryocytic thrombocytopenia |
| TAR [MIM 274000] Kantaputra Mesomelic dysplasia [MIM 156232] | Complex AD | 1q21.1 2q31.1-q31.2 | 1q21.1 deletion 2q31.1-q31.2 duplication | Absent or hypoplastic radius, present thumbs Mesomelic limb shortening Tibial-fibula, carpal and tarsal synostoses | Thrombocytopenia |
| Hunter-Thompson acromesomelic dysplasia | AR | 20q11.22 | <i>GDF5 (CDMP1)</i> | Short limbs (especially lower) middle and distal segments more affected than proximal | |
| Grebe | AR | 20q11.22 | <i>GDF5 (CDMP1)</i> | Severe limb shortening. Carpal/tarsal synostosis. Agenesis of several metacarpal/tarsal bones and proximal/middle phalanges. Post-axial polydactyly | |
| Du Pan [MIM 228900] | AR | 20q11.22 | <i>GDF5 (CDMP1)</i> | Absent fibula, brachydactyly Talipes | |
| SYM1 [MIM 185800] | AD with PV | 20q11.22 17q22 | <i>GDF5 NOG</i> | Proximal interphalangeal joint ankylosis. Carpal/tarsal fusion Proximal symphalangism | Conductive deafness |
| SYNS [MIM 186500] 2[MIM 610017] 3[MIM 612961] | AD | 17q22 20q11.22 13q12.11 | <i>NOG</i> <i>GDF5</i> <i>FGF9</i> | Progressive joint fusion. Brachydactyly | Otosclerotic deafness. Board tubular-shaped nose |
| Carpal Tarsal Coalition [MIM 186570] | AD | 17q22 | <i>NOG</i> | Carpal/tarsal/phalanges fusion. Humeroradial fusion. Short I st metacarpals | |
| Acro-Capito-Femoral Dysplasia (ACFD) [MIM 607778] | AR | 2q35 | <i>IHHH</i> | Short limbs, cone-shaped epiphyses, brachydactyly | Abnormal spine, pelvis and ribs |
| Townes-Brocks | AD with PV | 16q12.1 | <i>SALL1</i> | Pre-axial polydactyly. Triphalangeal thumb | Anal imperforation. Ear and urogenital anomalies |
| Robinow AR (COVESDEM) [MIM 268310] | AR | 9q22.31 | <i>ROR2</i> | Mesomelic and acromelic brachymelia. Thick, abnormally modelled radius and ulna | Rib/vertebral anomalies. Typical dysmorphism. Orofacial abnormalities. |
| Robinow AD [MIM 180700] | AD | 3p14.3 | <i>WNT5A</i> | Mesomelia, small hands, broad thumbs and hallux, bifid terminal phalanges | Hypoplastic genitalia Typical dysmorphism, gingival hyperplasia, renal and genital anomalies |

Annexe

| Syndrome | Inheritance | Location | Genetic anomaly | Limb malformation | Other malformations |
|--|-------------|----------|-----------------|---|--|
| RAPADILINO [MIM 266280] | AR | 8q24.3 | <i>RECQL4</i> | Absent or hypoplastic radii and patella, absent thumb | Diarrhea, growth retardation. Long slender nose |
| Baller Gerold [MIM 218600] | AR | 8q24.3 | <i>RECQL4</i> | Absent or hypoplastic radii and thumbs | Craniosynostosis, renal, anal and cardiac malformations |
| Rothmund Thompson [MIM 268400] | AR | 8q24.3 | <i>RECQL4</i> | Hypoplastic thumbs | Various eye anomalies, poikiloderma, telangiectasia, sun sensitivity, alopecia |
| Nager acrofacial dysostosis [MIM 154400] | AD ? | 9q32 | | Various radial anomalies | Typical face, ear anomalies, cardiac defects |
| Roberts [MIM 268300] | AR | 8p21.1 | <i>ESCO2</i> | Phocomelia | Cleft lip/palate, microcephaly, cardiac, ocular, renal and genital defects, mental retardation |
| SC phocomelia [MIM 269000] | AR | 8p21.1 | <i>ESCO2</i> | Absent radii and ulnae, small thumbs | Microcephaly, dysmorphia, mental retardation |
| Laurin-Sandrow [MIM 135750] | AD | 14q13 | | Ulna/fibula duplication. Absent Radius/tibia. Mirror hands and feet | Cleft nares Grooved columella |

The syndromes are listed as they appear in the text. At the end of the table some syndromes, not described in the text, have been added.

Syndrome abbreviations: EEC, ectrodactyly-ectodermal dysplasia-cleft syndrome; ADULT, acro-dermato-ungual-lacrimal-tooth syndrome; AEC, ankyloblepharon-ectodermal dysplasia-clefting syndrome; SLO, Smith-Lemli-Optiz syndrome; OFD1, oral-facial-digital syndrome 1; RSAT, radioulnar synostosis and amegakaryocytic thrombocytopenia; TAR, Thrombopenia-Absent Radius syndrome; SYMI, proximal symphalangism; SYNS1, multiple synostosis.

Inheritance abbreviations: AD, autosomal dominant; AR, autosomal recessive; XLR, X-linked recessive; XLD, X-linked dominant; PV, phenotypic variability; IP, incomplete penetrance; S, sporadic (frequent neomutation).

Full names of genes cited in this table can be found on Genew: Human Gene Nomenclature Database (see Web Links).

Table 2: Isolated hand and foot malformations and actual genetic knowledge

| Anomaly | Type | Inheritance | Location | Genetic anomaly | Hand and foot malformation |
|--|---|----------------|--------------|------------------|--|
| SHFM (split hands and feet malformation) | 1[MIM 183600] | AD with PV | 7q21.2–21.3 | Dup10q24 | Typically median ray absent/hypoplasia in hands and feet, but monodactyly can be observed |
| | 3[MIM 246560] | | 10q24 | <i>TP63</i> | |
| | 4[MIM 605289] | | 3q27 | | |
| | 5[MIM 606708] | | 2q31 | | |
| | 6[MIM 225300] | AR | 12q13 | <i>WNT10B</i> | |
| Postaxial polydactyly | 2[MIM 313350] | XLR | Xq26 | | |
| | A1 [MIM 174200] | AD | 7p14.1 | <i>GLI3</i> | Well-formed extra digit articulating with the Vth or an extra metacarpal |
| | A2 [MIM 602085] | | 13q21–q32 | | |
| Pre-axial polydactyly | A3 [MIM 607324] | | 19p13.2–13.1 | | |
| | B [MIM 174200] | AD | 7p14.1 | <i>GLI3</i> | Pedunculated postminimus: not well extra digit or skin tag |
| | I [MIM 174400] | AD | | | Thumb polydactyly: complete or partial duplication of a biphalangeal thumb |
| | II [MIM 174500] | AD | 7q36.3 | ZRS | Polydactyly of triphalangeal thumb. Sometimes associated with post-axial poly/syndactyly |
| Syndactyly | III [MIM 174600] | AD | | | Polydactyly of index finger: finger-like extra digit |
| | IV [MIM 165240] | AD | 7p14.1 | <i>GLI3</i> | Polysyndactyly: pre-axial polydactyly and syndactyly |
| | I [MIM 185900] | AD | 2q34–q36 | | Syndactyly of fingers III/IV and toes II/III |
| | II see infra Synpolydactyly | | | | |
| | III [MIM 186100] | AD | 6q22.31 | <i>GJA1</i> | Syndactyly of fingers IV/V. Normal feet |
| Synpolydactyly | IV [MIM 186200] | AD | 7q36.3 | ZRS | I–V finger complete syndactyly, pre and/or postaxial polydactyly. Feet almost normal |
| | V [MIM 186300] | AD | 2q31.1 | <i>HOXD13</i> | Fusion of metacarpal / tarsal IV/V or III/IV. Syndactyly of fingers III/IV and toes II/III |
| | With foot anomalies (SPD 1) [MIM 186000] | ASD with PV/IP | 2q31.1 | <i>HOXD13</i> | Heterozygous: mesoaxial poly/syndactyly, post-axial polydactyly Homozygous: numerous carpal, metacarpal and phalanges abnormalities |
| Brachydactyly | SPD2 [MIM 608180] | Chrom | 22q13 | <i>Fibulin-1</i> | Resembling SPD1 |
| | SPD3 [MIM 610234] | AD | 14q11.2–q12 | | Resembling SPD1 |
| Brachydactyly | Type A | | | | Short middle phalanges of fingers |

Annexe

| Anomaly | Type | Inheritance | Location | Genetic anomaly | Hand and foot malformation |
|---------|----------------------------|-------------|--------------|-----------------|--|
| | A1 (Farabee) [MIM 112500] | AD | 2q35–q36 | <i>IHH</i> | II–V plus short first phalanx of I |
| | A2 [MIM 112600] | AD | 5p13.3–p13.2 | <i>BMPRI1B</i> | II |
| | A3 [MIM 112700] | AD | 4q22.3 | <i>GDF5</i> | V |
| | A4 (Temtamy) [MIM 112800] | AD | 20q11.22 | 5.5 kb dup | II and V |
| | A5 [MIM 112900] | AD | 20p12.3 | | II–V plus nail dysplasia and duplication of distal phalanx of the thumb |
| | Type B | | | | |
| | B1 [MIM 113000] | AD | 9q22.31 | <i>ROR2</i> | Absent or hypoplasia of distal part of fingers and toes, absent finger and toe nails, occasionally bifid thumb |
| | B2 [MIM 611377] | | 17q22 | <i>NOG</i> | Plus symphalangism and carpal synostosis |
| | Type C [MIM 113100] | AD | 20q11.22 | <i>GDF5</i> | Short middle phalanx fingers II, III and V, short 1st metacarpal, hyperphalangy, symphalangism |
| | Type D [MIM 113200] | AD | 2q31.1 | <i>HOXD13</i> | Short, broad terminal phalanges of thumbs and big toes |
| | Type E | | | | |
| | E1 [MIM 113300] | AD | 2q31.1 | <i>HOXD13</i> | Short metacarpals and tarsals |
| | E2 [MIM 613382] | AD | 12p11.22 | <i>PTHLH</i> | |
| | Type Sugarman [MIM 272150] | AR | | | Hypoplastic first phalanges of fingers, non articulating abnormal great toes |

Syndrome abbreviations, SHFM, split hands and feet malformation.

Références bibliographiques

- Adams KA, Maida JM, Golden JA, Riddle RD. 2000. The transcription factor *Lmx1b* maintains *Wnt1* expression within the isthmus organizer. *Development* 127:1857-67.
- Agarwal P, Wylie JN, Galceran J, Arkhitko O, Li C, Deng C, Grosschedl R, Bruneau BG. 2003. *Tbx5* is essential for forelimb bud initiation following patterning of the limb field in the mouse embryo. *Development* 130:623-33.
- Ahmad M, Abbas H, Haque S, Flatz G. 1987. X-chromosomally inherited split-hand/split-foot anomaly in a Pakistani kindred. *Hum Genet* 75:169-73.
- Ahn K, Mishina Y, Hanks MC, Behringer RR, Crenshaw EB, 3rd. 2001. BMPR-IA signaling is required for the formation of the apical ectodermal ridge and dorsal-ventral patterning of the limb. *Development* 128:4449-61.
- Al-Qattan MM, Al Abdulkareem I, Al Haidan Y, Al Balwi M. 2012. A novel mutation in the SHH long-range regulator (ZRS) is associated with preaxial polydactyly, triphalangeal thumb, and severe radial ray deficiency. *Am J Med Genet A* 158A:2610-5.
- Albuisson J, Isidor B, Giraud M, Pichon O, Marsaud T, David A, Le Caignec C, Bezieau S. 2011. Identification of two novel mutations in *Shh* long-range regulator associated with familial preaxial polydactyly. *Clin Genet* 79:371-7.
- Amano T, Sagai T, Tanabe H, Mizushima Y, Nakazawa H, Shiroishi T. 2009. Chromosomal dynamics at the *Shh* locus: limb bud-specific differential regulation of competence and active transcription. *Dev Cell* 16:47-57.
- Armour CM, Bulman DE, Jarinova O, Rogers RC, Clarkson KB, DuPont BR, Dwivedi A, Bartel FO, McDonnell L, Schwartz CE, Boycott KM, Everman DB et al. 2011. 17p13.3 microduplications are associated with split-hand/foot malformation and long-bone deficiency (SHFLD). *Eur J Hum Genet* 19:1144-51.
- Asbreuk CH, Vogelaar CF, Hellemons A, Smidt MP, Burbach JP. 2002. CNS expression pattern of *Lmx1b* and coexpression with *ptx* genes suggest functional cooperativity in the development of forebrain motor control systems. *Mol Cell Neurosci* 21:410-20.
- Attisano L, Wrana JL. 1996. Signal transduction by members of the transforming growth factor-beta superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 7:327-39.
- Aziz A, Irfanullah, Khan S, Zimri FK, Muhammad N, Rashid S, Ahmad W. 2014. Novel homozygous mutations in the *WNT10B* gene underlying autosomal recessive split hand/foot malformation in three consanguineous families. *Gene* 534:265-71.
- Bai CB, Auerbach W, Lee JS, Stephen D, Joyner AL. 2002. *Gli2*, but not *Gli1*, is required for initial *Shh* signaling and ectopic activation of the *Shh* pathway. *Development* 129:4753-61.
- Balemans W, Van Hul W. 2002. Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Dev Biol* 250:231-50.
- Banerjee-Basu S, Baxevanis AD. 2001. Molecular evolution of the homeodomain family of transcription factors. *Nucleic Acids Res* 29:3258-69.
- Baraitser M, Winter RM, Brett EM. 1983. Greig cephalopolysyndactyly: report of 13 affected individuals in three families. *Clin Genet* 24:257-65.
- Bell SM, Schreiner CM, Scott WJ. 1998. The loss of ventral ectoderm identity correlates with the inability to form an AER in the legless hindlimb bud. *Mech Dev* 74:41-50.
- Benazet JD, Bischofberger M, Tiecke E, Goncalves A, Martin JF, Zuniga A, Naef F, Zeller R. 2009. A self-regulatory system of interlinked signaling feedback loops controls mouse limb patterning. *Science* 323:1050-3.
- Bennett WM, Musgrave JE, Campbell RA, Elliot D, Cox R, Brooks RE, Lovrien EW, Beals RK, Porter GA. 1973. The nephropathy of the nail-patella syndrome. Clinicopathologic analysis of 11 kindred. *Am J Med* 54:304-19.
- Benson K, Gordon M, Wassman ER, Tsi C. 1986. Interstitial deletion of the long arm of chromosome 2 in a malformed infant with karyotype 46,XX,del(2)(q31q33). *Am J Med Genet* 25:405-11.

- Bernier FP, Caluseriu O, Ng S, Schwartzenruber J, Buckingham KJ, Innes AM, Jabs EW, Innis JW, Schuette JL, Gorski JL, Byers PH, Andelfinger G et al. 2012. Haploinsufficiency of SF3B4, a component of the pre-mRNA spliceosomal complex, causes Nager syndrome. *Am J Hum Genet* 90:925-33.
- Biesecker LG, Green RC. 2014. Diagnostic clinical genome and exome sequencing. *N Engl J Med* 370:2418-25.
- Biesecker LG, Johnston J. 2005. Syndromic and non-syndromic GLI3 phenotypes. *Clin Genet* 68:284; author reply 285.
- Birnbaum RY, Everman DB, Murphy KK, Gurrieri F, Schwartz CE, Ahituv N. 2012. Functional characterization of tissue-specific enhancers in the DLX5/6 locus. *Hum Mol Genet* 21:4930-8.
- Blanc I, Bach A, Robert B. 2002. Unusual pattern of Sonic hedgehog expression in the polydactylous mouse mutant Hemimelic extra-toes. *Int J Dev Biol* 46:969-74.
- Blattner A, Huber AR, Rothlisberger B. 2010. Homozygous nonsense mutation in WNT10B and sporadic split-hand/foot malformation (SHFM) with autosomal recessive inheritance. *Am J Med Genet A* 152A:2053-6.
- Boles RG, Pober BR, Gibson LH, Willis CR, McGrath J, Roberts DJ, Yang-Feng TL. 1995. Deletion of chromosome 2q24-q31 causes characteristic digital anomalies: case report and review. *Am J Med Genet* 55:155-60.
- Bongers EM, de Wijs IJ, Marcelis C, Hoefsloot LH, Knoers NV. 2008. Identification of entire LMX1B gene deletions in nail patella syndrome: evidence for haploinsufficiency as the main pathogenic mechanism underlying dominant inheritance in man. *Eur J Hum Genet* 16:1240-4.
- Bongers EM, Gubler MC, Knoers NV. 2002. Nail-patella syndrome. Overview on clinical and molecular findings. *Pediatr Nephrol* 17:703-12.
- Bongers EM, Huysmans FT, Levtchenko E, de Rooy JW, Blickman JG, Admiraal RJ, Huygen PL, Cruysberg JR, Toolens PA, Prins JB, Krabbe PF, Borm GF et al. 2005. Genotype-phenotype studies in nail-patella syndrome show that LMX1B mutation location is involved in the risk of developing nephropathy. *Eur J Hum Genet* 13:935-46.
- Boyer O, Woerner S, Yang F, Oakeley EJ, Linghu B, Gribouval O, Tete MJ, Duca JS, Klickstein L, Damask AJ, Szustakowski JD, Heibel F et al. 2013. LMX1B mutations cause hereditary FSGS without extrarenal involvement. *J Am Soc Nephrol* 24:1216-22.
- Brunet LJ, McMahan JA, McMahan AP, Harland RM. 1998. Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science* 280:1455-7.
- Burghardt T, Kastner J, Suleiman H, Rivera-Milla E, Stepanova N, Lottaz C, Kubitza M, Boger CA, Schmidt S, Gorski M, de Vries U, Schmidt H et al. 2013. LMX1B is essential for the maintenance of differentiated podocytes in adult kidneys. *J Am Soc Nephrol* 24:1830-48.
- Butterfield NC, McGlenn E, Wicking C. 2010. The molecular regulation of vertebrate limb patterning. *Curr Top Dev Biol* 90:319-41.
- Capellini TD, Di Giacomo G, Salsi V, Brendolan A, Ferretti E, Srivastava D, Zappavigna V, Selleri L. 2006. Pbx1/Pbx2 requirement for distal limb patterning is mediated by the hierarchical control of Hox gene spatial distribution and Shh expression. *Development* 133:2263-73.
- Castilla E, Paz J, Mutchinick O, Munoz E, Giorgiutti E, Gelman Z. 1973. Polydactyly: a genetic study in South America. *Am J Hum Genet* 25:405-12.
- Celli J, Duijf P, Hamel BC, Bamshad M, Kramer B, Smits AP, Newbury-Ecob R, Hennekam RC, Van Buggenhout G, van Haeringen A, Woods CG, van Essen AJ et al. 1999. Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. *Cell* 99:143-53.
- Chai CK. 1981. Dactylaplasia in mice a two-locus model for development anomalies. *J Hered* 72:234-7.
- Chakarova CF, Hims MM, Bolz H, Abu-Safieh L, Patel RJ, Papaioannou MG, Inglehearn CF, Keen TJ, Willis C, Moore AT, Rosenberg T, Webster AR et al. 2002. Mutations in HPRP3, a third member of pre-mRNA splicing factor genes, implicated in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet* 11:87-92.
- Champion-Arnaud P, Reed R. 1994. The prespliceosome components SAP 49 and SAP 145 interact in a complex implicated in tethering U2 snRNP to the branch site. *Genes Dev* 8:1974-83.
- Chan DC, Laufer E, Tabin C, Leder P. 1995. Polydactylous limbs in Strong's Luxoid mice result from ectopic polarizing activity. *Development* 121:1971-8.

- Chang DT, Lopez A, von Kessler DP, Chiang C, Simandl BK, Zhao R, Seldin MF, Fallon JF, Beachy PA. 1994. Products, genetic linkage and limb patterning activity of a murine hedgehog gene. *Development* 120:3339-53.
- Chen H, Johnson RL. 2002. Interactions between dorsal-ventral patterning genes *lmx1b*, *engrailed-1* and *wnt-7a* in the vertebrate limb. *Int J Dev Biol* 46:937-41.
- Chen H, Lun Y, Ovchinnikov D, Kokubo H, Oberg KC, Pepicelli CV, Gan L, Lee B, Johnson RL. 1998a. Limb and kidney defects in *Lmx1b* mutant mice suggest an involvement of LMX1B in human nail patella syndrome. *Nat Genet* 19:51-5.
- Chen H, Ovchinnikov D, Pressman CL, Aulehla A, Lun Y, Johnson RL. 1998b. Multiple calvarial defects in *lmx1b* mutant mice. *Dev Genet* 22:314-20.
- Chen L, Adar R, Yang X, Monsonogo EO, Li C, Hauschka PV, Yayon A, Deng CX. 1999. Gly369Cys mutation in mouse *FGFR3* causes achondroplasia by affecting both chondrogenesis and osteogenesis. *J Clin Invest* 104:1517-25.
- Chen Y, Bates DL, Dey R, Chen PH, Machado AC, Laird-Offringa IA, Rohs R, Chen L. 2012. DNA binding by GATA transcription factor suggests mechanisms of DNA looping and long-range gene regulation. *Cell Rep* 2:1197-206.
- Chen Y, Knezevic V, Ervin V, Hutson R, Ward Y, Mackem S. 2004. Direct interaction with *Hoxd* proteins reverses *Gli3*-repressor function to promote digit formation downstream of *Shh*. *Development* 131:2339-47.
- Cheng L, Chen CL, Luo P, Tan M, Qiu M, Johnson R, Ma Q. 2003. *Lmx1b*, *Pet-1*, and *Nkx2.2* coordinately specify serotonergic neurotransmitter phenotype. *J Neurosci* 23:9961-7.
- Chiang C, Litingtung Y, Harris MP, Simandl BK, Li Y, Beachy PA, Fallon JF. 2001. Manifestation of the limb prepattern: limb development in the absence of sonic hedgehog function. *Dev Biol* 236:421-35.
- Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA. 1996. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383:407-13.
- Chiang C, Swan RZ, Grachtchouk M, Bolinger M, Litingtung Y, Robertson EK, Cooper MK, Gaffield W, Westphal H, Beachy PA, Dlugosz AA. 1999. Essential role for Sonic hedgehog during hair follicle morphogenesis. *Dev Biol* 205:1-9.
- Cho SW, Her SJ, Sun HJ, Choi OK, Yang JY, Kim SW, Kim SY, Shin CS. 2008. Differential effects of secreted frizzled-related proteins (sFRPs) on osteoblastic differentiation of mouse mesenchymal cells and apoptosis of osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 367:399-405.
- Cho TJ, Baek GH, Lee HR, Moon HJ, Yoo WJ, Choi IH. 2013. Tibial hemimelia-polydactyly-five-fingered hand syndrome associated with a 404 G>A mutation in a distant sonic hedgehog cis-regulator (ZRS): a case report. *J Pediatr Orthop B* 22:219-21.
- Chuang TH, Xu X, Kaartinen V, Heisterkamp N, Groffen J, Bokoch GM. 1995. *Abr* and *Bcr* are multifunctional regulators of the Rho GTP-binding protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:10282-6.
- Clamp M, Fry B, Kamal M, Xie X, Cuff J, Lin MF, Kellis M, Lindblad-Toh K, Lander ES. 2007. Distinguishing protein-coding and noncoding genes in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:19428-33.
- Clark RM, Marker PC, Kingsley DM. 2000. A novel candidate gene for mouse and human preaxial polydactyly with altered expression in limbs of Hemimelic extra-toes mutant mice. *Genomics* 67:19-27.
- Clough MV, Hamlington JD, McIntosh I. 1999. Restricted distribution of loss-of-function mutations within the LMX1B genes of nail-patella syndrome patients. *Hum Mutat* 14:459-65.
- Colvin JS, Bohne BA, Harding GW, McEwen DG, Ornitz DM. 1996. Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* 12:390-7.
- Constam DB, Robertson EJ. 1999. Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases. *J Cell Biol* 144:139-49.
- Crackower MA, Motoyama J, Tsui LC. 1998. Defect in the maintenance of the apical ectodermal ridge in the Dactylaplasia mouse. *Dev Biol* 201:78-89.
- Crackower MA, Scherer SW, Rommens JM, Hui CC, Poorkaj P, Soder S, Cobben JM, Hudgins L, Evans JP, Tsui LC. 1996. Characterization of the split hand/split foot malformation locus

- SHFM1 at 7q21.3-q22.1 and analysis of a candidate gene for its expression during limb development. *Hum Mol Genet* 5:571-9.
- Cross SH, Macalinao DG, McKie L, Rose L, Kearney AL, Rainger J, Thaug C, Keighren M, Jadeja S, West K, Kneeland SC, Smith RS et al. 2014. A dominant-negative mutation of mouse *Lmx1b* causes glaucoma and is semi-lethal via *LBD1*-mediated dimerisation. *PLoS Genet* 10:e1004359.
- Crossley PH, Martin GR. 1995. The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development* 121:439-51.
- Cunnick JM, Schmidhuber S, Chen G, Yu M, Yi SJ, Cho YJ, Kaartinen V, Minoo P, Warburton D, Groffen J, Heisterkamp N. 2009. *Bcr* and *Abr* cooperate in negatively regulating acute inflammatory responses. *Mol Cell Biol* 29:5742-50.
- Curtiss J, Heilig JS. 1998. DeLIMiting development. *Bioessays* 20:58-69.
- Cygan JA, Johnson RL, McMahon AP. 1997. Novel regulatory interactions revealed by studies of murine limb pattern in *Wnt-7a* and *En-1* mutants. *Development* 124:5021-32.
- Czeizel AE, Vitez M, Kodaj I, Lenz W. 1993. An epidemiological study of isolated split hand/foot in Hungary, 1975-1984. *J Med Genet* 30:593-6.
- Dai YS, Cserjesi P, Markham BE, Molkentin JD. 2002. The transcription factors *GATA4* and *dHAND* physically interact to synergistically activate cardiac gene expression through a p300-dependent mechanism. *J Biol Chem* 277:24390-8.
- Dailey L, Laplantine E, Priore R, Basilico C. 2003. A network of transcriptional and signaling events is activated by FGF to induce chondrocyte growth arrest and differentiation. *J Cell Biol* 161:1053-66.
- Davidsson J, Collin A, Olsson ME, Lundgren J, Soller M. 2008. Deletion of the *SCN* gene cluster on 2q24.4 is associated with severe epilepsy: an array-based genotype-phenotype correlation and a comprehensive review of previously published cases. *Epilepsy Res* 81:69-79.
- Davis AP, Witte DP, Hsieh-Li HM, Potter SS, Capecchi MR. 1995. Absence of radius and ulna in mice lacking *hoxa-11* and *hoxd-11*. *Nature* 375:791-5.
- Davis CA, Holmyard DP, Millen KJ, Joyner AL. 1991. Examining pattern formation in mouse, chicken and frog embryos with an *En*-specific antiserum. *Development* 111:287-98.
- Dawid IB, Toyama R, Taira M. 1995. LIM domain proteins. *C R Acad Sci III* 318:295-306.
- de Mollerat XJ, Gurrieri F, Morgan CT, Sangiorgi E, Everman DB, Gaspari P, Amiel J, Bamshad MJ, Lyle R, Blouin JL, Allanson JE, Le Marec B et al. 2003. A genomic rearrangement resulting in a tandem duplication is associated with split hand-split foot malformation 3 (SHFM3) at 10q24. *Hum Mol Genet* 12:1959-71.
- Dealy CN, Roth A, Ferrari D, Brown AM, Kosher RA. 1993. *Wnt-5a* and *Wnt-7a* are expressed in the developing chick limb bud in a manner suggesting roles in pattern formation along the proximodistal and dorsoventral axes. *Mech Dev* 43:175-86.
- Del Campo M, Jones MC, Veraksa AN, Curry CJ, Jones KL, Mascarello JT, Ali-Kahn-Catts Z, Drumheller T, McGinnis W. 1999. Monodactylous limbs and abnormal genitalia are associated with hemizyosity for the human 2q31 region that includes the *HOXD* cluster. *Am J Hum Genet* 65:104-10.
- Deng C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, Kuo A, Leder P. 1996. Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* 84:911-21.
- Ding YQ, Marklund U, Yuan W, Yin J, Wegman L, Ericson J, Deneris E, Johnson RL, Chen ZF. 2003. *Lmx1b* is essential for the development of serotonergic neurons. *Nat Neurosci* 6:933-8.
- Ding YQ, Yin J, Kania A, Zhao ZQ, Johnson RL, Chen ZF. 2004. *Lmx1b* controls the differentiation and migration of the superficial dorsal horn neurons of the spinal cord. *Development* 131:3693-703.
- Dorshorst B, Okimoto R, Ashwell C. 2010. Genomic regions associated with dermal hyperpigmentation, polydactyly and other morphological traits in the Silkie chicken. *J Hered* 101:339-50.
- Dreyer SD, Morello R, German MS, Zabel B, Winterpacht A, Lunstrum GP, Horton WA, Oberg KC, Lee B. 2000. *LMX1B* transactivation and expression in nail-patella syndrome. *Hum Mol Genet* 9:1067-74.

- Dreyer SD, Naruse T, Morello R, Zabel B, Winterpacht A, Johnson RL, Lee B, Oberg KC. 2004. *Lmx1b* expression during joint and tendon formation: localization and evaluation of potential downstream targets. *Gene Expr Patterns* 4:397-405.
- Dreyer SD, Zhou G, Baldini A, Winterpacht A, Zabel B, Cole W, Johnson RL, Lee B. 1998. Mutations in *LMX1B* cause abnormal skeletal patterning and renal dysplasia in nail patella syndrome. *Nat Genet* 19:47-50.
- Duijf PH, van Bokhoven H, Brunner HG. 2003. Pathogenesis of split-hand/split-foot malformation. *Hum Mol Genet* 12 Spec No 1:R51-60.
- Dunston JA, Hamlington JD, Zaveri J, Sweeney E, Sibbring J, Tran C, Malbroux M, O'Neill JP, Mountford R, McIntosh I. 2004. The human *LMX1B* gene: transcription unit, promoter, and pathogenic mutations. *Genomics* 84:565-76.
- Dunston JA, Reimschisel T, Ding YQ, Sweeney E, Johnson RL, Chen ZF, McIntosh I. 2005. A neurological phenotype in nail patella syndrome (NPS) patients illuminated by studies of murine *Lmx1b* expression. *Eur J Hum Genet* 13:330-5.
- Ederly P, Marcaillou C, Sahbatou M, Labalme A, Chastang J, Touraine R, Tubacher E, Senni F, Bober MB, Nampoothiri S, Jouk PS, Steichen E et al. 2011. Association of TALS developmental disorder with defect in minor splicing component U4atac snRNA. *Science* 332:240-3.
- Ellis T, Smyth I, Riley E, Bowles J, Adolphe C, Rothnagel JA, Wicking C, Wainwright BJ. 2003. Overexpression of Sonic Hedgehog suppresses embryonic hair follicle morphogenesis. *Dev Biol* 263:203-15.
- Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. 2005. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:139-49.
- Faiyaz-Ul-Haque M, Zaidi SH, King LM, Haque S, Patel M, Ahmad M, Siddique T, Ahmad W, Tsui LC, Cohn DH. 2005. Fine mapping of the X-linked split-hand/split-foot malformation (SHFM2) locus to a 5.1-Mb region on Xq26.3 and analysis of candidate genes. *Clin Genet* 67:93-7.
- Faiyaz ul Haque M, Uhlhaas S, Knapp M, Schuler H, Friedl W, Ahmad M, Propping P. 1993. Mapping of the gene for X-chromosomal split-hand/split-foot anomaly to Xq26-q26.1. *Hum Genet* 91:17-9.
- Fallon JF, Lopez A, Ros MA, Savage MP, Olwin BB, Simandl BK. 1994. FGF-2: apical ectodermal ridge growth signal for chick limb development. *Science* 264:104-7.
- Farooq M, Troelsen JT, Boyd M, Eiberg H, Hansen L, Hussain MS, Rehman S, Azhar A, Ali A, Bakhtiar SM, Tommerup N, Baig SM et al. 2010. Preaxial polydactyly/triphalangeal thumb is associated with changed transcription factor-binding affinity in a family with a novel point mutation in the long-range cis-regulatory element ZRS. *Eur J Hum Genet* 18:733-6.
- Feenstra JM, Kanaya K, Pira CU, Hoffman SE, Eppey RJ, Oberg KC. 2012. Detection of genes regulated by *Lmx1b* during limb dorsalization. *Dev Growth Differ* 54:451-62.
- Fernandez-Teran M, Ros MA. 2008. The Apical Ectodermal Ridge: morphological aspects and signaling pathways. *Int J Dev Biol* 52:857-71.
- Firulli BA, Krawchuk D, Centonze VE, Vargesson N, Virshup DM, Conway SJ, Cserjesi P, Laufer E, Firulli AB. 2005. Altered *Twist1* and *Hand2* dimerization is associated with Saethre-Chotzen syndrome and limb abnormalities. *Nat Genet* 37:373-81.
- Freyd G, Kim SK, Horvitz HR. 1990. Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-11*. *Nature* 344:876-9.
- Fromental-Ramain C, Warot X, Lakkaraju S, Favier B, Haack H, Birling C, Dierich A, Doll e P, Chambon P. 1996a. Specific and redundant functions of the paralogous *Hoxa-9* and *Hoxd-9* genes in forelimb and axial skeleton patterning. *Development* 122:461-72.
- Fromental-Ramain C, Warot X, Messadecq N, LeMeur M, Dolle P, Chambon P. 1996b. *Hoxa-13* and *Hoxd-13* play a crucial role in the patterning of the limb autopod. *Development* 122:2997-3011.
- Fujioka H, Ariga T, Horiuchi K, Otsu M, Igawa H, Kawashima K, Yamamoto Y, Sugihara T, Sakiyama Y. 2005. Molecular analysis of non-syndromic preaxial polydactyly: preaxial polydactyly type-IV and preaxial polydactyly type-I. *Clin Genet* 67:429-33.

- Furniss D, Kan SH, Taylor IB, Johnson D, Critchley PS, Giele HP, Wilkie AO. 2009. Genetic screening of 202 individuals with congenital limb malformations and requiring reconstructive surgery. *J Med Genet* 46:730-5.
- Furniss D, Lettice LA, Taylor IB, Critchley PS, Giele H, Hill RE, Wilkie AO. 2008. A variant in the sonic hedgehog regulatory sequence (ZRS) is associated with triphalangeal thumb and deregulates expression in the developing limb. *Hum Mol Genet* 17:2417-23.
- Galli A, Robay D, Osterwalder M, Bao X, Benazet JD, Tariq M, Paro R, Mackem S, Zeller R. 2010. Distinct roles of Hand2 in initiating polarity and posterior Shh expression during the onset of mouse limb bud development. *PLoS Genet* 6:e1000901.
- Gardner CA, Barald KF. 1992. Expression patterns of engrailed-like proteins in the chick embryo. *Dev Dyn* 193:370-88.
- Geduspan JS, MacCabe JA. 1989. Transfer of dorsoventral information from mesoderm to ectoderm at the onset of limb development. *Anat Rec* 224:79-87.
- Gerdes JM, Davis EE, Katsanis N. 2009. The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease. *Cell* 137:32-45.
- German MS, Wang J, Chadwick RB, Rutter WJ. 1992. Synergistic activation of the insulin gene by a LIM-homeo domain protein and a basic helix-loop-helix protein: building a functional insulin minienhancer complex. *Genes Dev* 6:2165-76.
- Gong Y, Krakow D, Marcelino J, Wilkin D, Chitayat D, Babul-Hirji R, Hudgins L, Cremers CW, Cremers FP, Brunner HG, Reinker K, Rimoin DL et al. 1999. Heterozygous mutations in the gene encoding noggin affect human joint morphogenesis. *Nat Genet* 21:302-4.
- Goodman FR, Majewski F, Collins AL, Scambler PJ. 2002. A 117-kb microdeletion removing HOXD9-HOXD13 and EVX2 causes synpolydactyly. *Am J Hum Genet* 70:547-55.
- Goodman FR, Scambler PJ. 2001. Human HOX gene mutations. *Clin Genet* 59:1-11.
- Goodman RM. 1965. A Family with Polysyndactyly and Other Anomalies. *J Hered* 56:37-8.
- Granata A, Nori G, Ravazzolo R, Marini M, Castellino S, Sicurezza E, Fiore CE, Mignani R. 2008. Nail-patella syndrome and renal involvement. Description of three cases and literature review. *Clin Nephrol* 69:377-82.
- Gubler MC, Levy M, Naizot C, Habib R. 1980. Glomerular basement membrane changes in hereditary glomerular diseases. *Ren Physiol* 3:405-13.
- Guerrini L, Costanzo A, Merlo GR. 2011. A symphony of regulations centered on p63 to control development of ectoderm-derived structures. *J Biomed Biotechnol* 2011:864904.
- Guha U, Gomes WA, Kobayashi T, Pestell RG, Kessler JA. 2002. In vivo evidence that BMP signaling is necessary for apoptosis in the mouse limb. *Dev Biol* 249:108-20.
- Gul D, Oktenli C. 2002. Evidence for autosomal recessive inheritance of split hand/split foot malformation: a report of nine cases. *Clin Dysmorphol* 11:183-6.
- Guo C, Qiu HY, Huang Y, Chen H, Yang RQ, Chen SD, Johnson RL, Chen ZF, Ding YQ. 2007. Lmx1b is essential for Fgf8 and Wnt1 expression in the isthmic organizer during tectum and cerebellum development in mice. *Development* 134:317-25.
- Guo Q, Loomis C, Joyner AL. 2003. Fate map of mouse ventral limb ectoderm and the apical ectodermal ridge. *Dev Biol* 264:166-78.
- Gurnett CA, Bowcock AM, Dietz FR, Morcuende JA, Murray JC, Dobbs MB. 2007. Two novel point mutations in the long-range SHH enhancer in three families with triphalangeal thumb and preaxial polydactyly. *Am J Med Genet A* 143:27-32.
- Gurrieri F, Everman DB. 2013. Clinical, genetic, and molecular aspects of split-hand/foot malformation: an update. *Am J Med Genet A* 161A:2860-72.
- Gurrieri F, Kjaer KW, Sangiorgi E, Neri G. 2002. Limb anomalies: Developmental and evolutionary aspects. *Am J Med Genet* 115:231-44.
- Gurrieri F, Prinos P, Tackels D, Kilpatrick MW, Allanson J, Genuardi M, Vuckov A, Nanni L, Sangiorgi E, Garofalo G, Nunes ME, Neri G et al. 1996. A split hand-split foot (SHFM3) gene is located at 10q24-->25. *Am J Med Genet* 62:427-36.
- Hamlington JD, Jones C, McIntosh I. 2001. Twenty-two novel LMX1B mutations identified in nail patella syndrome (NPS) patients. *Hum Mutat* 18:458.

- Han Y, Li R, Gao J, Miao S, Wang L. 2012. Characterisation of human RING finger protein TRIM69, a novel testis E3 ubiquitin ligase and its subcellular localisation. *Biochem Biophys Res Commun* 429:6-11.
- Harfe BD, Scherz PJ, Nissim S, Tian H, McMahon AP, Tabin CJ. 2004. Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell* 118:517-28.
- Haro E, Delgado I, Junco M, Yamada Y, Mansouri A, Oberg KC, Ros MA. 2014. Sp6 and Sp8 Transcription Factors Control AER Formation and Dorsal-Ventral Patterning in Limb Development. *PLoS Genet* 10:e1004468.
- He H, Liyanarachchi S, Akagi K, Nagy R, Li J, Dietrich RC, Li W, Sebastian N, Wen B, Xin B, Singh J, Yan P et al. 2011. Mutations in U4atac snRNA, a component of the minor spliceosome, in the developmental disorder MOPD I. *Science* 332:238-40.
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. 1997. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390:465-71.
- Heus HC, Hing A, van Baren MJ, Joosse M, Breedveld GJ, Wang JC, Burgess A, Donnis-Keller H, Berglund C, Zguricas J, Scherer SW, Rommens JM et al. 1999. A physical and transcriptional map of the preaxial polydactyly locus on chromosome 7q36. *Genomics* 57:342-51.
- Heus HC, Luijsterburg AJ, van Baren MJ, Breedveld GJ, Joosse MN, Nieuwenhuizen IM, Vermeij-Keers C, Oostra BA, Heutink P. 2001. Hemimelic extra toes and Hammer toe are distinct mutations that show a genetic interaction. *Mamm Genome* 12:77-9.
- Heutink P, Zguricas J, van Oosterhout L, Breedveld GJ, Testers L, Sandkuijl LA, Snijders PJ, Weissenbach J, Lindhout D, Hovius SE, et al. 1994. The gene for triphalangeal thumb maps to the subtelomeric region of chromosome 7q. *Nat Genet* 6:287-92.
- Hing AV, Helms C, Slauch R, Burgess A, Wang JC, Herman T, Downton SB, Donis-Keller H. 1995. Linkage of preaxial polydactyly type 2 to 7q36. *Am J Med Genet* 58:128-35.
- Hsu DR, Economides AN, Wang X, Eimon PM, Harland RM. 1998. The *Xenopus* dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Mol Cell* 1:673-83.
- Hui CC, Joyner AL. 1993. A mouse model of greig cephalopolysyndactyly syndrome: the extra-toesJ mutation contains an intragenic deletion of the *Gli3* gene. *Nat Genet* 3:241-6.
- Ianakev P, Kilpatrick MW, Toudjarska I, Basel D, Beighton P, Tsipouras P. 2000. Split-hand/split-foot malformation is caused by mutations in the *p63* gene on 3q27. *Am J Hum Genet* 67:59-66.
- Ianakev P, van Baren MJ, Daly MJ, Toledo SP, Cavalcanti MG, Neto JC, Silveira EL, Freire-Maia A, Heutink P, Kilpatrick MW, Tsipouras P. 2001. Acheiropodia is caused by a genomic deletion in *C7orf2*, the human orthologue of the *Lmbr1* gene. *Am J Hum Genet* 68:38-45.
- Iannotti CA, Inoue H, Bernal E, Aoki M, Liu L, Donis-Keller H, German MS, Permutt MA. 1997. Identification of a human *LMX1* (*LMX1.1*)-related gene, *LMX1.2*: tissue-specific expression and linkage mapping on chromosome 9. *Genomics* 46:520-4.
- Iwata T, Chen L, Li C, Ovchinnikov DA, Behringer RR, Francomano CA, Deng CX. 2000. A neonatal lethal mutation in *FGFR3* uncouples proliferation and differentiation of growth plate chondrocytes in embryos. *Hum Mol Genet* 9:1603-13.
- Iwata T, Li CL, Deng CX, Francomano CA. 2001. Highly activated *Fgfr3* with the K644M mutation causes prolonged survival in severe dwarf mice. *Hum Mol Genet* 10:1255-64.
- Johnson KR, Lane PW, Ward-Bailey P, Davisson MT. 1995. Mapping the mouse dactylaplasia mutation, *Dac*, and a gene that controls its expression, *mdac*. *Genomics* 29:457-64.
- Johnston JJ, Olivos-Glander I, Killoran C, Elson E, Turner JT, Peters KF, Abbott MH, Aughton DJ, Aylsworth AS, Bamshad MJ, Booth C, Curry CJ et al. 2005. Molecular and clinical analyses of Greig cephalopolysyndactyly and Pallister-Hall syndromes: robust phenotype prediction from the type and position of *GLI3* mutations. *Am J Hum Genet* 76:609-22.
- Kaartinen V, Nagy A, Gonzalez-Gomez I, Groffen J, Heisterkamp N. 2002. Vestibular dysgenesis in mice lacking *Abr* and *Bcr* *Cdc42/RacGAPs*. *Dev Dyn* 223:517-25.
- Kalsotra A, Cooper TA. 2011. Functional consequences of developmentally regulated alternative splicing. *Nat Rev Genet* 12:715-29.

- Kang S, Allen J, Graham JM, Jr., Grebe T, Clericuzio C, Patronas N, Ondrey F, Green E, Schaffer A, Abbott M, Biesecker LG. 1997a. Linkage mapping and phenotypic analysis of autosomal dominant Pallister-Hall syndrome. *J Med Genet* 34:441-6.
- Kang S, Graham JM, Jr., Olney AH, Biesecker LG. 1997b. GLI3 frameshift mutations cause autosomal dominant Pallister-Hall syndrome. *Nat Genet* 15:266-8.
- Kania A, Jessell TM. 2003. Topographic motor projections in the limb imposed by LIM homeodomain protein regulation of ephrin-A:EphA interactions. *Neuron* 38:581-96.
- Kania A, Johnson RL, Jessell TM. 2000. Coordinate roles for LIM homeobox genes in directing the dorsoventral trajectory of motor axons in the vertebrate limb. *Cell* 102:161-73.
- Kantaputra PN, Hamada T, Kumchai T, McGrath JA. 2003. Heterozygous mutation in the SAM domain of p63 underlies Rapp-Hodgkin ectodermal dysplasia. *J Dent Res* 82:433-7.
- Karamboulas K, Dranse HJ, Underhill TM. 2010. Regulation of BMP-dependent chondrogenesis in early limb mesenchyme by TGFbeta signals. *J Cell Sci* 123:2068-76.
- Kaufman CK, Zhou P, Pasolli HA, Rendl M, Bolotin D, Lim KC, Dai X, Alegre ML, Fuchs E. 2003. GATA-3: an unexpected regulator of cell lineage determination in skin. *Genes Dev* 17:2108-22.
- Kawakami Y, Capdevila J, Buscher D, Itoh T, Rodriguez Esteban C, Izpisua Belmonte JC. 2001. WNT signals control FGF-dependent limb initiation and AER induction in the chick embryo. *Cell* 104:891-900.
- Kelly TE, Cooke RJ, Kester RW. 1977. Acrofacial dysostosis with growth and mental retardation in three males, one with simultaneous Hermansky-Pudlak syndrome. *Birth Defects Orig Artic Ser* 13:45-52.
- Kengaku M, Capdevila J, Rodriguez-Esteban C, De La Pena J, Johnson RL, Izpisua Belmonte JC, Tabin CJ. 1998. Distinct WNT pathways regulating AER formation and dorsoventral polarity in the chick limb bud. *Science* 280:1274-7.
- Kennedy SJ, Teebi AS. 2004. Newly recognized autosomal recessive acrofacial dysostosis syndrome resembling Nager syndrome. *Am J Med Genet A* 129A:73-6.
- Khan S, Basit S, Zimri FK, Ali N, Ali G, Ansar M, Ahmad W. 2012. A novel homozygous missense mutation in WNT10B in familial split-hand/foot malformation. *Clin Genet* 82:48-55.
- Khokha MK, Hsu D, Brunet LJ, Dionne MS, Harland RM. 2003. Gremlin is the BMP antagonist required for maintenance of Shh and Fgf signals during limb patterning. *Nat Genet* 34:303-7.
- Klingensmith J, Matsui M, Yang YP, Anderson RM. 2010. Roles of bone morphogenetic protein signaling and its antagonism in holoprosencephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 154C:43-51.
- Klopocki E, Lohan S, Doelken SC, Stricker S, Ockeloen CW, Soares Thiele de Aguiar R, Lezirovitz K, Mingroni Netto RC, Jamsheer A, Shah H, Kurth I, Habenicht R et al. 2012. Duplications of BHLHA9 are associated with ectrodactyly and tibia hemimelia inherited in non-Mendelian fashion. *J Med Genet* 49:119-25.
- Kmita M, Tarchini B, Zakany J, Logan M, Tabin CJ, Duboule D. 2005. Early developmental arrest of mammalian limbs lacking HoxA/HoxD gene function. *Nature* 435:1113-6.
- Knoers NV, Bongers EM, van Beersum SE, Lommen EJ, van Bokhoven H, Hol FA. 2000. Nail-patella syndrome: identification of mutations in the LMX1B gene in Dutch families. *J Am Soc Nephrol* 11:1762-6.
- Kottgen A, Albrecht E, Teumer A, Vitart V, Krumsiek J, Hundertmark C, Pistis G, Ruggiero D, O'Seaghdha CM, Haller T, Yang Q, Tanaka T et al. 2013. Genome-wide association analyses identify 18 new loci associated with serum urate concentrations. *Nat Genet* 45:145-54.
- Kozhemyakina E, Ionescu A, Lassar AB. 2014. GATA6 is a crucial regulator of Shh in the limb bud. *PLoS Genet* 10:e1004072.
- Krawchuk D, Kania A. 2008. Identification of genes controlled by LMX1B in the developing mouse limb bud. *Dev Dyn* 237:1183-92.
- Krawchuk D, Weiner SJ, Chen YT, Lu BC, Costantini F, Behringer RR, Laufer E. 2010. Twist1 activity thresholds define multiple functions in limb development. *Dev Biol* 347:133-46.
- Kuijper S, Feitsma H, Sheth R, Korving J, Reijnen M, Meijlink F. 2005. Function and regulation of Alx4 in limb development: complex genetic interactions with Gli3 and Shh. *Dev Biol* 285:533-44.

- Lessard F, Stefanovsky V, Tremblay MG, Moss T. 2012. The cellular abundance of the essential transcription termination factor TTF-I regulates ribosome biogenesis and is determined by MDM2 ubiquitinylation. *Nucleic Acids Res* 40:5357-67.
- Lettice LA, Heaney SJ, Purdie LA, Li L, de Beer P, Oostra BA, Goode D, Elgar G, Hill RE, de Graaff E. 2003. A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. *Hum Mol Genet* 12:1725-35.
- Lettice LA, Hill AE, Devenney PS, Hill RE. 2008. Point mutations in a distant sonic hedgehog cis-regulator generate a variable regulatory output responsible for preaxial polydactyly. *Hum Mol Genet* 17:978-85.
- Lettice LA, Horikoshi T, Heaney SJ, van Baren MJ, van der Linde HC, Breedveld GJ, Joosse M, Akarsu N, Oostra BA, Endo N, Shibata M, Suzuki M et al. 2002. Disruption of a long-range cis-acting regulator for Shh causes preaxial polydactyly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7548-53.
- Lettice LA, Williamson I, Devenney PS, Kilanowski F, Dorin J, Hill RE. 2014. Development of five digits is controlled by a bipartite long-range cis-regulator. *Development* 141:1715-25.
- Lettice LA, Williamson I, Wiltshire JH, Peluso S, Devenney PS, Hill AE, Essafi A, Hagman J, Mort R, Grimes G, DeAngelis CL, Hill RE. 2012. Opposing functions of the ETS factor family define Shh spatial expression in limb buds and underlie polydactyly. *Dev Cell* 22:459-67.
- Lezirovitz K, Maestrelli SR, Cotrim NH, Otto PA, Pearson PL, Mingroni-Netto RC. 2008. A novel locus for split-hand/foot malformation associated with tibial hemimelia (SHFLD syndrome) maps to chromosome region 17p13.1-17p13.3. *Hum Genet* 123:625-31.
- Li H, Wang CY, Wang JX, Wu GS, Yu P, Yan XY, Chen YG, Zhao LH, Zhang YP. 2009. Mutation analysis of a large Chinese pedigree with congenital preaxial polydactyly. *Eur J Hum Genet* 17:604-10.
- Lichter PR, Richards JE, Downs CA, Stringham HM, Boehnke M, Farley FA. 1997. Cosegregation of open-angle glaucoma and the nail-patella syndrome. *Am J Ophthalmol* 124:506-15.
- Lines MA, Huang L, Schwartzenuber J, Douglas SL, Lynch DC, Beaulieu C, Guion-Almeida ML, Zechi-Ceide RM, Gener B, Gillessen-Kaesbach G, Nava C, Baujat G et al. 2012. Haploinsufficiency of a spliceosomal GTPase encoded by EFTUD2 causes mandibulofacial dysostosis with microcephaly. *Am J Hum Genet* 90:369-77.
- Lo Iacono N, Mantero S, Chiarelli A, Garcia E, Mills AA, Morasso MI, Costanzo A, Levi G, Guerrini L, Merlo GR. 2008. Regulation of Dlx5 and Dlx6 gene expression by p63 is involved in EEC and SHFM congenital limb defects. *Development* 135:1377-88.
- Logan C, Hornbruch A, Campbell I, Lumsden A. 1997. The role of Engrailed in establishing the dorsoventral axis of the chick limb. *Development* 124:2317-24.
- Logan CY, Nusse R. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:781-810.
- Logan M. 2003. Finger or toe: the molecular basis of limb identity. *Development* 130:6401-10.
- Lohan S, Spielmann M, Doelken SC, Flottmann R, Muhammad F, Baig SM, Wajid M, Hulsemann W, Habenicht R, Kjaer KW, Patil SJ, Girisha KM et al. 2014. Microduplications encompassing the Sonic hedgehog limb enhancer ZRS are associated with Haas-type polysyndactyly and Laurin-Sandrow syndrome. *Clin Genet*.
- Loomis CA, Kimmel RA, Tong CX, Michaud J, Joyner AL. 1998. Analysis of the genetic pathway leading to formation of ectopic apical ectodermal ridges in mouse Engrailed-1 mutant limbs. *Development* 125:1137-48.
- Lopez-Arvizu C, Sparrow EP, Strube MJ, Slavin C, DeOleo C, James J, Hoover-Fong J, McIntosh I, Tierney E. 2011. Increased symptoms of attention deficit hyperactivity disorder and major depressive disorder symptoms in Nail-patella syndrome: potential association with LMX1B loss-of-function. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 156B:59-66.
- Lopez-Martinez A, Chang DT, Chiang C, Porter JA, Ros MA, Simandl BK, Beachy PA, Fallon JF. 1995. Limb-patterning activity and restricted posterior localization of the amino-terminal product of Sonic hedgehog cleavage. *Curr Biol* 5:791-6.
- Maas SA, Fallon JF. 2004. Isolation of the chicken Lmbr1 coding sequence and characterization of its role during chick limb development. *Dev Dyn* 229:520-8.

- MacCabe JA, Errick J, Saunders JW, Jr. 1974. Ectodermal control of the dorsoventral axis in the leg bud of the chick embryo. *Dev Biol* 39:69-82.
- Maganga R, Giles N, Adcroft K, Unni A, Keeney D, Wood F, Fear M, Dharmarajan A. 2008. Secreted Frizzled related protein-4 (sFRP4) promotes epidermal differentiation and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 377:606-11.
- Malik S. 2014. Polydactyly: phenotypes, genetics and classification. *Clin Genet* 85:203-12.
- Malik S, Percin FE, Ahmad W, Percin S, Akarsu NA, Koch MC, Grzeschik KH. 2005. Autosomal recessive mesoaxial synostotic syndactyly with phalangeal reduction maps to chromosome 17p13.3. *Am J Med Genet A* 134:404-8.
- Malik S, Ullah S, Afzal M, Lal K, Haque S. 2014. Clinical and descriptive genetic study of polydactyly: a Pakistani experience of 313 cases. *Clin Genet* 85:482-6.
- Manouvrier S, Petit F, Holder-Espinasse M, Escande F. 2012. *Limb Development Anomalies: Genetics*. eLS.
- Marini M, Bongers EM, Cusano R, Di Duca M, Seri M, Knoers NV, Ravazzolo R. 2003. Confirmation of CLIM2/LMX1B interaction by yeast two-hybrid screening and analysis of its involvement in nail-patella syndrome. *Int J Mol Med* 12:79-82.
- Marinic M, Aktas T, Ruf S, Spitz F. 2013. An integrated holo-enhancer unit defines tissue and gene specificity of the Fgf8 regulatory landscape. *Dev Cell* 24:530-42.
- Martin GR. 1998. The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes Dev* 12:1571-86.
- Massague J, Seoane J, Wotton D. 2005. Smad transcription factors. *Genes Dev* 19:2783-810.
- Masuya H, Sagai T, Wakana S, Moriwaki K, Shiroishi T. 1995. A duplicated zone of polarizing activity in polydactylous mouse mutants. *Genes Dev* 9:1645-53.
- Matera AG, Wang Z. 2014. A day in the life of the spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:108-21.
- Matsunaga E, Katahira T, Nakamura H. 2002. Role of Lmx1b and Wnt1 in mesencephalon and metencephalon development. *Development* 129:5269-77.
- McDonald MT, Gorski JL. 1993. Nager acrofacial dysostosis. *J Med Genet* 30:779-82.
- McGlenn E, Tabin CJ. 2006. Mechanistic insight into how Shh patterns the vertebrate limb. *Curr Opin Genet Dev* 16:426-32.
- McGrath JA, Duijf PH, Doetsch V, Irvine AD, de Waal R, Vanmolkot KR, Wessagowit V, Kelly A, Atherton DJ, Griffiths WA, Orlow SJ, van Haeringen A et al. 2001. Hay-Wells syndrome is caused by heterozygous missense mutations in the SAM domain of p63. *Hum Mol Genet* 10:221-9.
- McIntosh I, Dreyer SD, Clough MV, Dunston JA, Eyaid W, Roig CM, Montgomery T, Ala-Mello S, Kaitila I, Winterpacht A, Zabel B, Frydman M et al. 1998. Mutation analysis of LMX1B gene in nail-patella syndrome patients. *Am J Hum Genet* 63:1651-8.
- McIntosh I, Dunston JA, Liu L, Hoover-Fong JE, Sweeney E. 2005. Nail patella syndrome revisited: 50 years after linkage. *Ann Hum Genet* 69:349-63.
- McKie AB, McHale JC, Keen TJ, Tarttelin EE, Goliath R, van Lith-Verhoeven JJ, Greenberg J, Ramesar RS, Hoyng CB, Cremers FP, Mackey DA, Bhattacharya SS et al. 2001. Mutations in the pre-mRNA splicing factor gene PRPC8 in autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP13). *Hum Mol Genet* 10:1555-62.
- Medina-Martinez O, Bradley A, Ramirez-Solis R. 2000. A large targeted deletion of Hoxb1-Hoxb9 produces a series of single-segment anterior homeotic transformations. *Dev Biol* 222:71-83.
- Mellin G. 1963. *The frequency of birth defects*. Philadelphia: PA: Lippincott JB.
- Mercader N, Leonardo E, Azpiazu N, Serrano A, Morata G, Martinez C, Torres M. 1999. Conserved regulation of proximodistal limb axis development by Meis1/Hth. *Nature* 402:425-9.
- Mercader N, Leonardo E, Piedra ME, Martinez AC, Ros MA, Torres M. 2000. Opposing RA and FGF signals control proximodistal vertebrate limb development through regulation of Meis genes. *Development* 127:3961-70.
- Merino R, Rodriguez-Leon J, Macias D, Ganan Y, Economides AN, Hurler JM. 1999. The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb. *Development* 126:5515-22.
- Michelsen JW, Schmeichel KL, Beckerle MC, Winge DR. 1993. The LIM motif defines a specific zinc-binding protein domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:4404-8.

- Michos O, Panman L, Vintersten K, Beier K, Zeller R, Zuniga A. 2004. Gremlin-mediated BMP antagonism induces the epithelial-mesenchymal feedback signaling controlling metanephric kidney and limb organogenesis. *Development* 131:3401-10.
- Min H, Danilenko DM, Scully SA, Bolon B, Ring BD, Tarpley JE, DeRose M, Simonet WS. 1998. Fgf-10 is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarity to *Drosophila* branchless. *Genes Dev* 12:3156-61.
- Miner JH, Morello R, Andrews KL, Li C, Antignac C, Shaw AS, Lee B. 2002. Transcriptional induction of slit diaphragm genes by *Lmx1b* is required in podocyte differentiation. *J Clin Invest* 109:1065-72.
- Minguillon C, Del Buono J, Logan MP. 2005. *Tbx5* and *Tbx4* are not sufficient to determine limb-specific morphologies but have common roles in initiating limb outgrowth. *Dev Cell* 8:75-84.
- Minina E, Kreschel C, Naski MC, Ornitz DM, Vortkamp A. 2002. Interaction of FGF, *Ihh*/*Pthlh*, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Dev Cell* 3:439-49.
- Mitter D, Chiaie BD, Ludecke HJ, Gillissen-Kaesbach G, Bohring A, Kohlhase J, Caliebe A, Siebert R, Roepke A, Ramos-Arroyo MA, Nieva B, Menten B et al. 2010. Genotype-phenotype correlation in eight new patients with a deletion encompassing 2q31.1. *Am J Med Genet A* 152A:1213-24.
- Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. 2010. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem* 147:35-51.
- Miyazono K, Maeda S, Imamura T. 2005. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:251-63.
- Mo R, Freer AM, Zinyk DL, Crackower MA, Michaud J, Heng HH, Chik KW, Shi XM, Tsui LC, Cheng SH, Joyner AL, Hui C. 1997. Specific and redundant functions of *Gli2* and *Gli3* zinc finger genes in skeletal patterning and development. *Development* 124:113-23.
- Montavon T, Soshnikova N, Mascrez B, Joye E, Thevenet L, Splinter E, de Laat W, Spitz F, Duboule D. 2011. A regulatory archipelago controls *Hox* genes transcription in digits. *Cell* 147:1132-45.
- Morello R, Zhou G, Dreyer SD, Harvey SJ, Ninomiya Y, Thorner PS, Miner JH, Cole W, Winterpacht A, Zabel B, Oberg KC, Lee B. 2001. Regulation of glomerular basement membrane collagen expression by *LMX1B* contributes to renal disease in nail patella syndrome. *Nat Genet* 27:205-8.
- Nager F, DeReynier J. 1948. Das Gehörorgan bei den angeborenen Kopfmissbildungen. *Pract Otorhinolaryngol* 10:1-128.
- Naski MC, Ornitz DM. 1998. FGF signaling in skeletal development. *Front Biosci* 3:d781-94.
- Naveed M, Nath SK, Gaines M, Al-Ali MT, Al-Khaja N, Hutchings D, Golla J, Deutsch S, Bottani A, Antonarakis SE, Ratnamala U, Radhakrishna U. 2007. Genomewide linkage scan for split-hand/foot malformation with long-bone deficiency in a large Arab family identifies two novel susceptibility loci on chromosomes 1q42.2-q43 and 6q14.1. *Am J Hum Genet* 80:105-11.
- Niswander L, Tickle C, Vogel A, Booth I, Martin GR. 1993. FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb. *Cell* 75:579-87.
- Nixon J, Oldridge M, Wilkie AO, Smith K. 1997. Interstitial deletion of 2q associated with craniosynostosis, ocular coloboma, and limb abnormalities: cytogenetic and molecular investigation. *Am J Med Genet* 70:324-7.
- Nunes ME, Schutt G, Kapur RP, Luthardt F, Kukulich M, Byers P, Evans JP. 1995. A second autosomal split hand/split foot locus maps to chromosome 10q24-q25. *Hum Mol Genet* 4:2165-70.
- O'Hara FP, Beck E, Barr LK, Wong LL, Kessler DS, Riddle RD. 2005. Zebrafish *Lmx1b.1* and *Lmx1b.2* are required for maintenance of the isthmus organizer. *Development* 132:3163-73.
- Ohuchi H, Takeuchi J, Yoshioka H, Ishimaru Y, Ogura K, Takahashi N, Ogura T, Noji S. 1998. Correlation of wing-leg identity in ectopic FGF-induced chimeric limbs with the differential expression of chick *Tbx5* and *Tbx4*. *Development* 125:51-60.
- Okada Y, Sim X, Go MJ, Wu JY, Gu D, Takeuchi F, Takahashi A, Maeda S, Tsunoda T, Chen P, Lim SC, Wong TY et al. 2012. Meta-analysis identifies multiple loci associated with kidney function-related traits in east Asian populations. *Nat Genet* 44:904-9.

- Ornitz DM, Itoh N. 2001. Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2:REVIEWS3005.
- Ornitz DM, Marie PJ. 2002. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev* 16:1446-65.
- Ostendorff HP, Peirano RI, Peters MA, Schluter A, Bossenz M, Scheffner M, Bach I. 2002. Ubiquitination-dependent cofactor exchange on LIM homeodomain transcription factors. *Nature* 416:99-103.
- Ovcharenko I, Stubbs L, Loots GG. 2004. Interpreting mammalian evolution using Fugu genome comparisons. *Genomics* 84:890-5.
- Ozen RS, Baysal BE, Devlin B, Farr JE, Gorry M, Ehrlich GD, Richard CW. 1999. Fine mapping of the split-hand/split-foot locus (SHFM3) at 10q24: evidence for anticipation and segregation distortion. *Am J Hum Genet* 64:1646-54.
- Pajni-Underwood S, Wilson CP, Elder C, Mishina Y, Lewandoski M. 2007. BMP signals control limb bud interdigital programmed cell death by regulating FGF signaling. *Development* 134:2359-68.
- Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ. 2008. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet* 40:1413-5.
- Panman L, Drenth T, Tewelscher P, Zuniga A, Zeller R. 2005. Genetic interaction of Gli3 and Alx4 during limb development. *Int J Dev Biol* 49:443-8.
- Park HL, Bai C, Platt KA, Matise MP, Beeghly A, Hui CC, Nakashima M, Joyner AL. 2000. Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation. *Development* 127:1593-605.
- Park K, Kang J, Subedi KP, Ha JH, Park C. 2008. Canine polydactyl mutations with heterogeneous origin in the conserved intronic sequence of LMBR1. *Genetics* 179:2163-72.
- Parr BA, McMahon AP. 1995. Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature* 374:350-3.
- Parr BA, Shea MJ, Vassileva G, McMahon AP. 1993. Mouse Wnt genes exhibit discrete domains of expression in the early embryonic CNS and limb buds. *Development* 119:247-61.
- Percin EF, Percin S, Egilmez H, Sezgin I, Ozbas F, Akarsu AN. 1998. Mesoaxial complete syndactyly and synostosis with hypoplastic thumbs: an unusual combination or homozygous expression of syndactyly type I? *J Med Genet* 35:868-74.
- Pescucci C, Caselli R, Grosso S, Mencarelli MA, Mari F, Farnetani MA, Piccini B, Artuso R, Bruttini M, Priolo M, Zuffardi O, Gimelli S et al. 2007. 2q24-q31 deletion: report of a case and review of the literature. *Eur J Med Genet* 50:21-32.
- Petit F, Andrieux J, Demeer B, Collet LM, Copin H, Boudry-Labis E, Escande F, Manouvrier-Hanu S, Mathieu-Dramard M. 2013a. Split-hand/foot malformation with long-bone deficiency and BHLHA9 duplication: two cases and expansion of the phenotype to radial agenesis. *Eur J Med Genet* 56:88-92.
- Petit F, Escande F, Jourdain AS, Porchet N, Amiel J, Doray B, Delrue MA, Flori E, Kim CA, Marlin S, Robertson SP, Manouvrier-Hanu S et al. 2014. Nager syndrome: confirmation of SF3B4 haploinsufficiency as the major cause. *Clin Genet* 86:246-51.
- Petit F, Jourdain AS, Andrieux J, Baujat G, Baumann C, Beneteau C, David A, Faivre L, Gaillard D, Gilbert-Dussardier B, Jouk PS, Le Caignec C et al. 2013b. Split hand/foot malformation with long-bone deficiency and BHLHA9 duplication: report of 13 new families. *Clin Genet* 85:464-9.
- Pizette S, Abate-Shen C, Niswander L. 2001. BMP controls proximodistal outgrowth, via induction of the apical ectodermal ridge, and dorsoventral patterning in the vertebrate limb. *Development* 128:4463-74.
- Pizette S, Niswander L. 1999. BMPs negatively regulate structure and function of the limb apical ectodermal ridge. *Development* 126:883-94.
- Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. 2000. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer* 7:165-97.
- Pressman CL, Chen H, Johnson RL. 2000. LMX1B, a LIM homeodomain class transcription factor, is necessary for normal development of multiple tissues in the anterior segment of the murine eye. *Genesis* 26:15-25.

- Qu S, Tucker SC, Ehrlich JS, Levorse JM, Flaherty LA, Wisdom R, Vogt TF. 1998. Mutations in mouse *Aristaless-like4* cause Strong's luxoid polydactyly. *Development* 125:2711-21.
- Raas-Rothschild A, Manouvrier S, Gonzales M, Farriaux JP, Lyonnet S, Munnich A. 1996. Refined mapping of a gene for split hand-split foot malformation (SHFM3) on chromosome 10q25. *J Med Genet* 33:996-1001.
- Radhakrishna U, Bornholdt D, Scott HS, Patel UC, Rossier C, Engel H, Bottani A, Chandal D, Blouin JL, Solanki JV, Grzeschik KH, Antonarakis SE. 1999. The phenotypic spectrum of *GLI3* morphopathies includes autosomal dominant preaxial polydactyly type-IV and postaxial polydactyly type-A/B; No phenotype prediction from the position of *GLI3* mutations. *Am J Hum Genet* 65:645-55.
- Rallis C, Bruneau BG, Del Buono J, Seidman CE, Seidman JG, Nissim S, Tabin CJ, Logan MP. 2003. *Tbx5* is required for forelimb bud formation and continued outgrowth. *Development* 130:2741-51.
- Ramer JC, Mowrey PN, Robins DB, Ligato S, Towfighi J, Ladda RL. 1990. Five children with del (2)(q31q33) and one individual with dup (2)(q31q33) from a single family: review of brain, cardiac, and limb malformations. *Am J Med Genet* 37:392-400.
- Re'em-Kalma Y, Lamb T, Frank D. 1995. Competition between *noggin* and bone morphogenetic protein 4 activities may regulate dorsalization during *Xenopus* development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:12141-5.
- Reynolds JF, Sommer A, Kelly TE. 1984. Preaxial polydactyly type 4: variability in a large kindred. *Clin Genet* 25:267-72.
- Reynolds JF, Webb MJ, Opitz JM. 1986. A new autosomal dominant acrofacial dysostosis syndrome. *Am J Med Genet Suppl* 2:143-50.
- Richieri-Costa A, Brunoni D, Laredo Filho J, Kasinski S. 1987. Tibial aplasia-ectrodactyly as variant expression of the Gollop-Wolfgang complex: report of a Brazilian family. *Am J Med Genet* 28:971-80.
- Riddle RD, Ensini M, Nelson C, Tsuchida T, Jessell TM, Tabin C. 1995. Induction of the LIM homeobox gene *Lmx1* by *WNT7a* establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb. *Cell* 83:631-40.
- Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C. 1993. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75:1401-16.
- Robert B. 2007. Bone morphogenetic protein signaling in limb outgrowth and patterning. *Dev Growth Differ* 49:455-68.
- Robledo RF, Rajan L, Li X, Lufkin T. 2002. The *Dlx5* and *Dlx6* homeobox genes are essential for craniofacial, axial, and appendicular skeletal development. *Genes Dev* 16:1089-101.
- Roelfsema NM, Cobben JM. 1996. The EEC syndrome: a literature study. *Clin Dysmorphol* 5:115-27.
- Rohr C, Prestel J, Heidet L, Hosser H, Kriz W, Johnson RL, Antignac C, Witzgall R. 2002. The LIM-homeodomain transcription factor *Lmx1b* plays a crucial role in podocytes. *J Clin Invest* 109:1073-82.
- Rowe DA, Cairns JM, Fallon JF. 1982. Spatial and temporal patterns of cell death in limb bud mesoderm after apical ectodermal ridge removal. *Dev Biol* 93:83-91.
- Ruiz-Lozano P, Doevendans P, Brown A, Gruber PJ, Chien KR. 1997. Developmental expression of the murine spliceosome-associated protein *mSAP49*. *Dev Dyn* 208:482-90.
- Sagai T, Masuya H, Tamura M, Shimizu K, Yada Y, Wakana S, Gondo Y, Noda T, Shiroishi T. 2004. Phylogenetic conservation of a limb-specific, cis-acting regulator of Sonic hedgehog (*Shh*). *Mamm Genome* 15:23-34.
- Sato U, Kitanaka S, Sekine T, Takahashi S, Ashida A, Igarashi T. 2005. Functional characterization of *LMX1B* mutations associated with nail-patella syndrome. *Pediatr Res* 57:783-8.
- Saunders JW, Jr. 1948. The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. *J Exp Zool* 108:363-403.
- Saunders JW, Jr., Gasseling MT, Errick JE. 1976. Inductive activity and enduring cellular constitution of a supernumerary apical ectodermal ridge grafted to the limb bud of the chick embryo. *Dev Biol* 50:16-25.
- Schatz O, Langer E, Ben-Arie N. 2014. Gene dosage of the transcription factor *Fingerin* (*bHLHA9*) affects digit development and links syndactyly to ectrodactyly. *Hum Mol Genet*.

- Scherer SW, Poorkaj P, Allen T, Kim J, Geshuri D, Nunes M, Soder S, Stephens K, Pagon RA, Patton MA, et al. 1994. Fine mapping of the autosomal dominant split hand/split foot locus on chromosome 7, band q21.3-q22.1. *Am J Hum Genet* 55:12-20.
- Schweizer H, Johnson RL, Brand-Saber B. 2004. Characterization of migration behavior of myogenic precursor cells in the limb bud with respect to *Lmx1b* expression. *Anat Embryol (Berl)* 208:7-18.
- Seet LF, Hong W. 2006. The Phox (PX) domain proteins and membrane traffic. *Biochim Biophys Acta* 1761:878-96.
- Sekine K, Ohuchi H, Fujiwara M, Yamasaki M, Yoshizawa T, Sato T, Yagishita N, Matsui D, Koga Y, Itoh N, Kato S. 1999. *Fgf10* is essential for limb and lung formation. *Nat Genet* 21:138-41.
- Seri M, Melchionda S, Dreyer S, Marini M, Carella M, Cusano R, Piemontese MR, Caroli F, Silengo M, Zelante L, Romeo G, Ravazzolo R et al. 1999. Identification of *LMX1B* gene point mutations in Italian patients affected with Nail-Patella syndrome. *Int J Mol Med* 4:285-90.
- Shamseldin HE, Faden MA, Alashram W, Alkuraya FS. 2012. Identification of a novel *DLX5* mutation in a family with autosomal recessive split hand and foot malformation. *J Med Genet* 49:16-20.
- Sharma RP, Chopra VL. 1976. Effect of the Wingless (*wg1*) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 48:461-5.
- Sharpe J, Lettice L, Hecksher-Sorensen J, Fox M, Hill R, Krumlauf R. 1999. Identification of sonic hedgehog as a candidate gene responsible for the polydactylous mouse mutant Sasquatch. *Curr Biol* 9:97-100.
- Sidow A, Bulotsky MS, Kerrebrock AW, Birren BW, Altshuler D, Jaenisch R, Johnson KR, Lander ES. 1999. A novel member of the F-box/WD40 gene family, encoding dactylin, is disrupted in the mouse dactylaplasia mutant. *Nat Genet* 23:104-7.
- Smidt MP, Asbreuk CH, Cox JJ, Chen H, Johnson RL, Burbach JP. 2000. A second independent pathway for development of mesencephalic dopaminergic neurons requires *Lmx1b*. *Nat Neurosci* 3:337-41.
- Sowinska-Seidler A, Badura-Stronka M, Latos-Bielenska A, Stronka M, Jamsheer A. 2014. Heterozygous *DLX5* nonsense mutation associated with isolated split-hand/foot malformation with reduced penetrance and variable expressivity in two unrelated families. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*.
- Spitz F, Gonzalez F, Duboule D. 2003. A global control region defines a chromosomal regulatory landscape containing the *HoxD* cluster. *Cell* 113:405-17.
- Su N, Du X, Chen L. 2008. FGF signaling: its role in bone development and human skeleton diseases. *Front Biosci* 13:2842-65.
- Suemori H, Noguchi S. 2000. *Hox C* cluster genes are dispensable for overall body plan of mouse embryonic development. *Dev Biol* 220:333-42.
- Suleiman H, Heudobler D, Raschta AS, Zhao Y, Zhao Q, Hertting I, Vitzthum H, Moeller MJ, Holzman LB, Rachel R, Johnson R, Westphal H et al. 2007. The podocyte-specific inactivation of *Lmx1b*, *Ldb1* and *E2a* yields new insight into a transcriptional network in podocytes. *Dev Biol* 304:701-12.
- Sulik KK, Dehart DB. 1988. Retinoic-acid-induced limb malformations resulting from apical ectodermal ridge cell death. *Teratology* 37:527-37.
- Summerbell D. 1974. A quantitative analysis of the effect of excision of the AER from the chick limb-bud. *J Embryol Exp Morphol* 32:651-60.
- Summerbell D, Lewis JH, Wolpert L. 1973. Positional information in chick limb morphogenesis. *Nature* 244:492-6.
- Sun M, Ma F, Zeng X, Liu Q, Zhao XL, Wu FX, Wu GP, Zhang ZF, Gu B, Zhao YF, Tian SH, Lin B et al. 2008. Triphalangeal thumb-polysyndactyly syndrome and syndactyly type IV are caused by genomic duplications involving the long range, limb-specific *SHH* enhancer. *J Med Genet* 45:589-95.
- Sun X, Lewandoski M, Meyers EN, Liu YH, Maxson RE, Jr., Martin GR. 2000. Conditional inactivation of *Fgf4* reveals complexity of signalling during limb bud development. *Nat Genet* 25:83-6.

- Sun X, Mariani FV, Martin GR. 2002. Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature* 418:501-8.
- Svensson AM, Curry CJ, South ST, Whitby H, Maxwell TM, Aston E, Fisher J, Carmack CE, Scheffer A, Abu-Shamsieh A, Brothman AR. 2007. Detection of a de novo interstitial 2q microdeletion by CGH microarray analysis in a patient with limb malformations, microcephaly and mental retardation. *Am J Med Genet A* 143A:1348-53.
- Sweeney E, Fryer A, Mountford R, Green A, McIntosh I. 2003. Nail patella syndrome: a review of the phenotype aided by developmental biology. *J Med Genet* 40:153-62.
- Szeto DP, Rodriguez-Esteban C, Ryan AK, O'Connell SM, Liu F, Kioussi C, Gleiberman AS, Izpisua-Belmonte JC, Rosenfeld MG. 1999. Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. *Genes Dev* 13:484-94.
- Tabin C, Wolpert L. 2007. Rethinking the proximodistal axis of the vertebrate limb in the molecular era. *Genes Dev* 21:1433-42.
- Tabin CJ, McMahon AP. 2008. Developmental biology. Grasping limb patterning. *Science* 321:350-2.
- Tackels-Horne D, Toburen A, Sangiorgi E, Gurrieri F, de Mollerat X, Fischetto R, Causio F, Clarkson K, Stevenson RE, Schwartz CE. 2001. Split hand/split foot malformation with hearing loss: first report of families linked to the SHFM1 locus in 7q21. *Clin Genet* 59:28-36.
- Takahashi M, Tamura K, Buscher D, Masuya H, Yonei-Tamura S, Matsumoto K, Naitoh-Matsuo M, Takeuchi J, Ogura K, Shiroishi T, Ogura T, Izpisua Belmonte JC. 1998. The role of Alx-4 in the establishment of anteroposterior polarity during vertebrate limb development. *Development* 125:4417-25.
- Tarchini B, Duboule D, Kmita M. 2006. Regulatory constraints in the evolution of the tetrapod limb anterior-posterior polarity. *Nature* 443:985-8.
- te Welscher P, Fernandez-Teran M, Ros MA, Zeller R. 2002. Mutual genetic antagonism involving GLI3 and dHAND prepatterns the vertebrate limb bud mesenchyme prior to SHH signaling. *Genes Dev* 16:421-6.
- Temtamy S, McKusick V. 1978. Polydactyly. New York: NY: Alan R Liss.
- Theisen A, Rosenfeld JA, Shane K, McBride KL, Atkin JF, Gaba C, Hoo J, Kurczynski TW, Schnur RE, Coffey LB, Zackai EH, Schimmenti L et al. 2011. Refinement of the Region for Split Hand/Foot Malformation 5 on 2q31.1. *Mol Syndromol* 1:262-271.
- Tickle C, Munsterberg A. 2001. Vertebrate limb development--the early stages in chick and mouse. *Curr Opin Genet Dev* 11:476-81.
- Todt WL, Fallon JF. 1987. Posterior apical ectodermal ridge removal in the chick wing bud triggers a series of events resulting in defective anterior pattern formation. *Development* 101:501-15.
- Tsai LP, Liao HM, Chen YJ, Fang JS, Chen CH. 2009. A novel microdeletion at chromosome 2q31.1-31.2 in a three-generation family presenting duplication of great toes with clinodactyly. *Clin Genet* 75:449-56.
- Tsukurov O, Boehmer A, Flynn J, Nicolai JP, Hamel BC, Traill S, Zaleske D, Mankin HJ, Yeon H, Ho C, et al. 1994. A complex bilateral polysyndactyly disease locus maps to chromosome 7q36. *Nat Genet* 6:282-6.
- Tsuneoka M, Koda Y, Soejima M, Teye K, Kimura H. 2002. A novel myc target gene, mina53, that is involved in cell proliferation. *J Biol Chem* 277:35450-9.
- Turner N, Grose R. 2010. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* 10:116-29.
- Ugur SA, Tolun A. 2008. Homozygous WNT10b mutation and complex inheritance in Split-Hand/Foot Malformation. *Hum Mol Genet* 17:2644-53.
- Valverde-Franco G, Liu H, Davidson D, Chai S, Valderrama-Carvajal H, Goltzman D, Ornitz DM, Henderson JE. 2004. Defective bone mineralization and osteopenia in young adult FGFR3^{-/-} mice. *Hum Mol Genet* 13:271-84.
- van Bokhoven H, Hamel BC, Bamshad M, Sangiorgi E, Gurrieri F, Duijf PH, Vanmolkot KR, van Beusekom E, van Beersum SE, Celli J, Merkx GF, Tenconi R et al. 2001. p63 Gene mutations in eec syndrome, limb-mammary syndrome, and isolated split hand-split foot malformation suggest a genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet* 69:481-92.
- van Steensel B, Dekker J. 2010. Genomics tools for unraveling chromosome architecture. *Nat Biotechnol* 28:1089-1095.

- VanderMeer JE, Ahituv N. 2011. cis-regulatory mutations are a genetic cause of human limb malformations. *Dev Dyn* 240:920-30.
- Vanlerberghe C, Olivier-Faivre L, Petit F, Fruchart O, Jourdain AS, Clavier F, Gay S, Manouvrier S, Escande F. 2014. Intrafamilial variability of ZRS-Associated syndrome: characterization of a mosaic ZRS mutation by pyrosequencing. *Clinical Genetics* sous presse.
- Velinov M, Ahmad A, Brown-Kipphut B, Shafiq M, Blau J, Cooma R, Roth P, Iqbal MA. 2012. A 0.7 Mb de novo duplication at 7q21.3 including the genes DLX5 and DLX6 in a patient with split-hand/split-foot malformation. *Am J Med Genet A* 158A:3201-6.
- Vithana EN, Abu-Safieh L, Allen MJ, Carey A, Papaioannou M, Chakarova C, Al-Maghtheh M, Ebenezer ND, Willis C, Moore AT, Bird AC, Hunt DM et al. 2001. A human homolog of yeast pre-mRNA splicing gene, PRP31, underlies autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 19q13.4 (RP11). *Mol Cell* 8:375-81.
- Vogel A, Rodriguez C, Warnken W, Izpisua Belmonte JC. 1995. Dorsal cell fate specified by chick *Lmx1* during vertebrate limb development. *Nature* 378:716-20.
- Vollrath D, Jaramillo-Babb VL, Clough MV, McIntosh I, Scott KM, Lichter PR, Richards JE. 1998. Loss-of-function mutations in the LIM-homeodomain gene, *LMX1B*, in nail-patella syndrome. *Hum Mol Genet* 7:1091-8.
- Vortkamp A, Gessler M, Grzeschik KH. 1991. *GLI3* zinc-finger gene interrupted by translocations in Greig syndrome families. *Nature* 352:539-40.
- Waggoner DJ, Ciske DJ, Downton SB, Watson MS. 1999. Deletion of 1q in a patient with acrofacial dysostosis. *Am J Med Genet* 82:301-4.
- Wanek N, Muneoka K, Holler-Dinsmore G, Burton R, Bryant SV. 1989. A staging system for mouse limb development. *J Exp Zool* 249:41-9.
- Wang LC, Liu ZY, Gambardella L, Delacour A, Shapiro R, Yang J, Sizing I, Rayhorn P, Garber EA, Benjamin CD, Williams KP, Taylor FR et al. 2000. Regular articles: conditional disruption of hedgehog signaling pathway defines its critical role in hair development and regeneration. *J Invest Dermatol* 114:901-8.
- Wang X, Xin Q, Li L, Li J, Zhang C, Qiu R, Qian C, Zhao H, Liu Y, Shan S, Dang J, Bian X et al. 2014. Exome sequencing reveals a heterozygous *DLX5* mutation in a Chinese family with autosomal-dominant split-hand/foot malformation. *Eur J Hum Genet* 22:1105-10.
- Watanabe H, Shionyu M, Kimura T, Kimata K, Watanabe H. 2007. Splicing factor 3b subunit 4 binds *BMP-1A* and inhibits osteochondral cell differentiation. *J Biol Chem* 282:20728-38.
- Wellik DM, Capecchi MR. 2003. *Hox10* and *Hox11* genes are required to globally pattern the mammalian skeleton. *Science* 301:363-7.
- Werner P. 1915. Ueber einen seltenen Fall von Zwergwuchs. (About a rare case of dwarfism). *Arch. Gynak.* 104:278-300.
- Wieczorek D. 2013. Human facial dysostoses. *Clin Genet* 83:499-510.
- Wieczorek D, Pawlik B, Li Y, Akarsu NA, Caliebe A, May KJ, Schweiger B, Vargas FR, Balci S, Gillissen-Kaesbach G, Wollnik B. 2010. A specific mutation in the distant sonic hedgehog (*SHH*) cis-regulator (*ZRS*) causes Werner mesomelic syndrome (*WMS*) while complete *ZRS* duplications underlie Haas type polysyndactyly and preaxial polydactyly (*PPD*) with or without triphalangeal thumb. *Hum Mutat* 31:81-9.
- Witte F, Dokas J, Neuendorf F, Mundlos S, Stricker S. 2009. Comprehensive expression analysis of all Wnt genes and their major secreted antagonists during mouse limb development and cartilage differentiation. *Gene Expr Patterns* 9:215-23.
- Wu L, Liang D, Niikawa N, Ma F, Sun M, Pan Q, Long Z, Zhou Z, Yoshiura K, Wang H, Sato D, Nishimura G et al. 2009. A *ZRS* duplication causes syndactyly type IV with tibial hypoplasia. *Am J Med Genet A* 149A:816-8.
- Xu X, Weinstein M, Li C, Naski M, Cohen RI, Ornitz DM, Leder P, Deng C. 1998. Fibroblast growth factor receptor 2 (*FGFR2*)-mediated reciprocal regulation loop between *FGF8* and *FGF10* is essential for limb induction. *Development* 125:753-65.
- Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, Tabin C, Sharpe A, Caput D, Crum C, McKeon F. 1999. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 398:714-8.

- Yang Y, Drossopoulou G, Chuang PT, Duprez D, Marti E, Bumcrot D, Vargesson N, Clarke J, Niswander L, McMahon A, Tickle C. 1997. Relationship between dose, distance and time in Sonic Hedgehog-mediated regulation of anteroposterior polarity in the chick limb. *Development* 124:4393-404.
- Yang Y, Muzny DM, Reid JG, Bainbridge MN, Willis A, Ward PA, Braxton A, Beuten J, Xia F, Niu Z, Hardison M, Person R et al. 2013. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N Engl J Med* 369:1502-11.
- Zakany J, Duboule D. 2007. The role of Hox genes during vertebrate limb development. *Curr Opin Genet Dev* 17:359-66.
- Zakany J, Kmita M, Alarcon P, de la Pompa JL, Duboule D. 2001. Localized and transient transcription of Hox genes suggests a link between patterning and the segmentation clock. *Cell* 106:207-17.
- Zakany J, Kmita M, Duboule D. 2004. A dual role for Hox genes in limb anterior-posterior asymmetry. *Science* 304:1669-72.
- Zeller R. 2010. The temporal dynamics of vertebrate limb development, teratogenesis and evolution. *Curr Opin Genet Dev* 20:384-90.
- Zguricas J, Heus H, Morales-Peralta E, Breedveld G, Kuyt B, Mumcu EF, Bakker W, Akarsu N, Kay SP, Hovius SE, Heredero-Baute L, Oostra BA et al. 1999. Clinical and genetic studies on 12 preaxial polydactyly families and refinement of the localisation of the gene responsible to a 1.9 cM region on chromosome 7q36. *J Med Genet* 36:32-40.
- Zhang Y, Lu Y, Yuan BZ, Castranova V, Shi X, Stauffer JL, Demers LM, Chen F. 2005. The Human mineral dust-induced gene, mdig, is a cell growth regulating gene associated with lung cancer. *Oncogene* 24:4873-82.
- Zhu J, Nakamura E, Nguyen MT, Bao X, Akiyama H, Mackem S. 2008. Uncoupling Sonic hedgehog control of pattern and expansion of the developing limb bud. *Dev Cell* 14:624-32.
- Zlotogora J. 1994. On the inheritance of the split hand/split foot malformation. *Am J Med Genet* 53:29-32.
- Zlotogora J, Nubani N. 1989. Is there an autosomal recessive form of the split hand and split foot malformation? *J Med Genet* 26:138-40.
- Zuniga A, Haramis AP, McMahon AP, Zeller R. 1999. Signal relay by BMP antagonism controls the SHH/FGF4 feedback loop in vertebrate limb buds. *Nature* 401:598-602.
- Zuniga A, Michos O, Spitz F, Haramis AP, Panman L, Galli A, Vintersten K, Klasen C, Mansfield W, Kuc S, Duboule D, Dono R et al. 2004. Mouse limb deformity mutations disrupt a global control region within the large regulatory landscape required for Gremlin expression. *Genes Dev* 18:1553-64.
- Zuniga A, Quillet R, Perrin-Schmitt F, Zeller R. 2002. Mouse Twist is required for fibroblast growth factor-mediated epithelial-mesenchymal signalling and cell survival during limb morphogenesis. *Mech Dev* 114:51-9.