



**HAL**  
open science

# Pseudohypoparathyroïdie : distorsion du ratio de transmission maternelle des mutations perte de fonction de GNAS

Sarah Snanoudj-Verber

► **To cite this version:**

Sarah Snanoudj-Verber. Pseudohypoparathyroïdie : distorsion du ratio de transmission maternelle des mutations perte de fonction de GNAS. Médecine humaine et pathologie. 2019. dumas-02331048

**HAL Id: dumas-02331048**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02331048>**

Submitted on 24 Oct 2019

**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.

UNIVERSITÉ de CAEN NORMANDIE

-----  
UFR SANTÉ

Année 2018/2019

**THÈSE POUR L'OBTENTION**  
**DU GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE**

Présentée et soutenue publiquement le 19 septembre 2019

par

Mme SNANOUDJ-VERBER Sarah

Née le 07/06/1991 à Paris XIV<sup>e</sup> (75)

**TITRE DE LA THÈSE :**

**Pseudohypoparathyroïdie : Distorsion du ratio de transmission maternelle des mutations perte de fonction de GNAS**

**Président : Monsieur le Professeur Michel BOULOUARD**

Membres : Madame le Professeur Marie-Laure KOTTLER

Monsieur le Docteur Nicolas RICHARD

Monsieur le Docteur Nicolas GRUCHY

Madame le Docteur Sophie KRIEGER

**Directeur de thèse : Dr Nicolas RICHARD**

**Année Universitaire 2018/2019****Doyen**

Professeur Emmanuel TOUZÉ

**Assesseurs**

Professeur Paul MILLIEZ (pédagogie)

Professeur Guy LAUNOY (recherche)

Professeur Sonia DOLLFUS & Professeur Evelyne EMERY (3<sup>ème</sup> cycle)**Directrice administrative**

Madame Sarah CHEMTOB

**PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS**

M.	AGOSTINI Denis	Biophysique et médecine nucléaire
M.	AIDE Nicolas	Biophysique et médecine nucléaire
M.	ALLOUCHE Stéphane	Biochimie et biologie moléculaire
M.	ALVES Arnaud	Chirurgie digestive
M.	AOUBA Achille	Médecine interne
M.	BABIN Emmanuel	Oto-Rhino-Laryngologie
M.	BÉNATEAU Hervé	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
M.	BENOIST Guillaume	Gynécologie - Obstétrique
M.	BERGER Ludovic	Chirurgie vasculaire
M.	BERGOT Emmanuel	Pneumologie
M.	BIBEAU Frédéric	Anatomie et cytologie pathologique
Mme	BRAZO Perrine	Psychiatrie d'adultes
M.	BROUARD Jacques	Pédiatrie
M.	BUSTANY Pierre	Pharmacologie
Mme	CHAPON Françoise	Histologie, Embryologie
Mme	CLIN-GODARD Bénédicte	Médecine et santé au travail
M.	COQUEREL Antoine	Pharmacologie
M.	DAO Manh Thôn	Hépatologie-Gastro-Entérologie
M.	DAMAJ Ghandi Laurent	Hématologie
M.	DEFER Gilles	Neurologie
M.	DELAMILLIEURE Pascal	Psychiatrie d'adultes
M.	DENISE Pierre	Physiologie
M.	DERLON Jean-Michel	Neurochirurgie
Mme	DOLLFUS Sonia	Psychiatrie d'adultes
M.	DREYFUS Michel	Gynécologie - Obstétrique
M.	DU CHEYRON Damien	Réanimation médicale
Mme	ÉMERY Evelyne	Neurochirurgie
M.	ESMAIL-BEYGUI Farzin	Cardiologie

Mme	FAUVET Raffaèle	Gynécologie – Obstétrique
M.	FISCHER Marc-Olivier	Anesthésiologie – réanimation et médecine péri-opératoire
M.	GÉRARD Jean-Louis	Anesthésiologie – réanimation et médecine péri-opératoire
M.	GUILLOIS Bernard	Pédiatrie
Mme	GUITTET-BAUD Lydia	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
M.	HABRAND Jean-Louis	Cancérologie option Radiothérapie
M.	HAMON Martial	Cardiologie
Mme	HAMON Michèle	Radiologie et imagerie médicale
M.	HANOUS Jean-Luc	Anesthésiologie – réanimation et médecine péri-opératoire
M.	HULET Christophe	Chirurgie orthopédique et traumatologique
M.	HURAUULT de LIGNY Bruno <small>Éméritat jusqu'au 31/01/2020</small>	Néphrologie
M.	ICARD Philippe	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
M.	JOIN-LAMBERT Olivier	Bactériologie - Virologie
Mme	JOLY-LOBBEDEZ Florence	Cancérologie
M.	JOUBERT Michael	Endocrinologie
Mme	KOTTLER Marie-Laure	Biochimie et biologie moléculaire
M.	LAUNOY Guy	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
M.	LE COUTOUR Xavier	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
M.	LE HELLO Simon	Bactériologie-Virologie
Mme	LE MAUFF Brigitte	Immunologie
M.	LEPORRIER Michel <small>Éméritat jusqu'au 31/08/2020</small>	Hématologie
M.	LEROY François	Rééducation fonctionnelle
M.	LOBBEDEZ Thierry	Néphrologie
M.	MANRIQUE Alain	Biophysique et médecine nucléaire
M.	MARCÉLLI Christian	Rhumatologie
M.	MARTINAUD Olivier	Neurologie
M.	MAUREL Jean	Chirurgie générale
M.	MILLIEZ Paul	Cardiologie
M.	MOREAU Sylvain	Anatomie/Oto-Rhino-Laryngologie
M.	MOUTEL Grégoire	Médecine légale et droit de la santé
M.	NORMAND Hervé	Physiologie
M.	PARIENTI Jean-Jacques	Biostatistiques, info. médicale et tech. de communication
M.	PELAGE Jean-Pierre	Radiologie et imagerie médicale
Mme	PIQUET Marie-Astrid	Nutrition
M.	QUINTYN Jean-Claude	Ophtalmologie
M.	RAVASSE Philippe	Chirurgie infantile
M.	REZNIK Yves	Endocrinologie
M.	ROD Julien	Chirurgie infantile
M.	ROUPIE Eric	Médecine d'urgence
Mme	THARIAT Juliette	Radiothérapie
M.	TILLOU Xavier	Urologie

M.	TOUZÉ Emmanuel	Neurologie
M.	TROUSSARD Xavier	Hématologie
Mme	VABRET Astrid	Bactériologie - Virologie
M.	VERDON Renaud	Maladies infectieuses
Mme	VERNEUIL Laurence	Dermatologie
M.	VIADER Fausto	Neurologie
M.	VIVIEN Denis	Biologie cellulaire

### **PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS**

### **PROFESSEUR ASSOCIÉ DES UNIVERSITÉS A TEMPS PLEIN**

M.	VABRET François	Addictologie
----	-----------------	--------------

### **PROFESSEURS ASSOCIÉS DES UNIVERSITÉS A MI-TEMPS**

M.	de la SAYETTE Vincent	Neurologie
Mme	DOMPMARTIN-BLANCHÈRE Anne	Dermatologie
Mme	LESCURE Pascale	Gériatrie et biologie du vieillissement
M.	SABATIER Rémi	Cardiologie

### **PRCE**

Mme	LELEU Solveig	Anglais
-----	---------------	---------

**Année Universitaire 2018 / 2019****Doyen**

Professeur Emmanuel TOUZÉ

**Assesseurs**

Professeur Paul MILLIEZ (pédagogie)

Professeur Guy LAUNOY (recherche)

Professeur Sonia DOLLFUS & Professeur Evelyne EMERY (3<sup>ème</sup> cycle)**Directrice administrative**

Madame Sarah CHEMTOB

**MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS**

M.	ALEXANDRE Joachim	Pharmacologie clinique
Mme	BENHAÏM Annie	Biologie cellulaire
M.	BESNARD Stéphane	Physiologie
Mme	BONHOMME Julie	Parasitologie et mycologie
M.	BOUVIER Nicolas	Néphrologie
M.	COULBAULT Laurent	Biochimie et Biologie moléculaire
M.	CREVEUIL Christian	Biostatistiques, info. médicale et tech. de communication
M.	DE BOYSSON Hubert	Médecine interne
Mme	DEBRUYNE Danièle <small>Éméritat jusqu'au 31/08/2019</small>	Pharmacologie fondamentale
Mme	DERLON-BOREL Annie <small>Éméritat jusqu'au 31/08/2020</small>	Hématologie
Mme	DINA Julia	Bactériologie - Virologie
Mme	DUPONT Claire	Pédiatrie
M.	ÉTARD Olivier	Physiologie
M.	GABEREL Thomas	Neurochirurgie
M.	GRUCHY Nicolas	Génétique
M.	GUÉNOLÉ Fabian	Pédopsychiatrie
M.	HITIER Martin	Anatomie - ORL Chirurgie Cervico-faciale
M.	ISNARD Christophe	Bactériologie Virologie
M.	LEGALLOIS Damien	Cardiologie
Mme	LELONG-BOULOUARD Véronique	Pharmacologie fondamentale
Mme	LEPORRIER Nathalie <small>Éméritat jusqu'au 31/10/2020</small>	Génétique
Mme	LEVALLET Guénaëlle	Cytologie et Histologie
M.	LUBRANO Jean	Chirurgie générale
M.	MITTRE Hervé	Biologie cellulaire
M.	REPESSEY Johann	Hématologie
M.	SESBOÛÉ Bruno	Physiologie
M.	TOUTIRAIS Olivier	Immunologie

**M. VEYSSIERE Alexis**

Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie

**MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIÉS DES UNIVERSITÉS A MI-TEMPS**

**Mme ABBATE-LERAY Pascale** Médecine générale

**M. COUETTE Pierre-André** (fin 31/08/19) Médecine générale

**M. LE BAS François** (fin 31/08/19) Médecine générale

**M. SAINMONT Nicolas** (fin 31/08/19) Médecine générale

**Mme NOEL DE JAEGHER Sophie** (fin 31/08/2021) Médecine générale

**LISTE DES ENSEIGNANTS – CHERCHEURS**

**Directeur de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques**  
Professeur Michel BOULOUARD

**Assesseurs**

Professeur Pascale SCHUMANN-BARD  
Professeur Anne-Sophie VOISIN-CHIRET

**Directrice administrative et Directrice administrative adjointe**  
Madame Sarah CHEMTOB  
Madame Alexandra HOUARD

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

<b>BOULOUARD Michel</b>	Physiologie, Pharmacologie
<b>BUREAU Ronan</b>	Biophysique, Chémoinformatique
<b>COLLOT Valérie</b>	Pharmacognosie
<b>DALLEMAGNE Patrick</b>	Chimie médicinale
<b>DAUPHIN François</b>	Physiologie, Pharmacologie
<b>DELEPEE Raphaël</b>	Chimie analytique
<b>FABIS Frédéric</b>	Chimie organique
<b>FRERET Thomas</b>	Physiologie, Pharmacologie
<b>GARON David</b>	Botanique, Mycologie, Biotechnologies
<b>GAUDUCHON Pascal</b> Eméritat jusqu'au 31/08/2019	Biologie cellulaire
<b>GIARD Jean-Christophe</b>	Bactériologie, Virologie
<b>MALZERT-FREON Aurélie</b>	Pharmacie galénique
<b>RAULT Sylvain</b> Eméritat jusqu'au 31/08/2019	Chimie thérapeutique
<b>ROCHAIS Christophe</b>	Chimie organique
<b>SCHUMANN-BARD Pascale</b>	Physiologie, Pharmacologie
<b>SICHEL François</b>	Toxicologie
<b>SOPKOVA Jana</b>	Biophysique, Drug design
<b>VOISIN-CHIRET Anne-Sophie</b>	Chimie médicinale

**MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES**

<b>ANDRE Véronique – HDR</b>	Biochimie, Toxicologie
<b>BOUET Valentine – HDR</b>	Physiologie, Pharmacologie
<b>CAILLY Thomas – HDR</b>	Chimie bio-inorganique, Chimie organique
<b>DENOYELLE Christophe – HDR</b>	Biologie cellulaire et moléculaire, Biochimie, Cancérologie



<b>DHALLUIN Anne</b>	Bactériologie, Virologie, Immunologie
<b>ELDIN de PECOULAS Philippe – HDR</b>	Parasitologie, Mycologie médicale
<b>GROO Anne-Claire</b>	Pharmacie galénique
<b>KIEFFER Charline</b>	Chimie médicinale
<b>KRIEGER Sophie</b> (Praticien hospitalier)	Biologie clinique
<b>LAPORTE-WOJCIK Catherine</b>	Chimie bio-inorganique
<b>LEBAILLY Pierre – HDR</b>	Santé publique
<b>LECHEVREL Mathilde – HDR</b>	Toxicologie
<b>LEGER Marianne</b>	Physiologie, Pharmacologie
<b>LEPAILLEUR Alban – HDR</b>	Modélisation moléculaire
<b>N'DIAYE Monique</b>	Parasitologie, Mycologie médicale, Biochimie clinique
<b>PAIZANIS Eleni</b>	Physiologie, Pharmacologie
<b>PEREIRA-ROSENFELD Maria de Fatima</b>	Chimie organique et thérapeutique
<b>POTTIER Ivannah</b>	Chimie et toxicologie analytiques
<b>PREVOST Virginie – HDR</b>	Chimie analytique, Nutrition, Education thérapeutique du patient
<b>QUINTIN Jérôme</b>	Pharmacognosie
<b>RIOULT Jean-Philippe</b>	Botanique, Mycologie, Biotechnologies
<b>SINCE Marc</b>	Chimie analytique
<b>VILLEDIEU Marie</b>	Biologie et thérapies innovantes des cancers
 <b><u>PROFESSEUR AGREGÉ (PRAG)</u></b>	
<b>PRICOT Sophie</b>	Anglais
 <b><u>PERSONNEL ASSOCIÉ À TEMPS PARTIEL (PAST)</u></b>	
<b>SAINT-LORANT Guillaume</b>	Pharmacie clinique
<b>SEDILLO Patrick</b>	Pharmacie officinale
<b>RICHARD Estelle</b>	Pharmacie officinale

**Enseignants titulaires du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie**

## REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord mon président de Jury, Monsieur le Professeur Michel BOULOUARD, d'avoir immédiatement accepté de juger mon travail.

Un grand merci au Docteur Nicolas RICHARD, pour m'avoir confié ce sujet et pour avoir dirigé cette thèse. Merci pour ta confiance, ta disponibilité et ton optimisme.

Je remercie Madame le Professeur Marie-Laure KOTTLER pour son accueil au sein du service de génétique, sa disponibilité, son soutien et son aide.

Je remercie également les Docteurs Nicolas GRUCHY et Sophie KRIEGER d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, ainsi que pour leur encadrement et leur gentillesse.

Je remercie les médecins, les professeurs et les équipes pédagogiques de la faculté de médecine de l'Université Pierre et Marie Curie, de Karolinska – notamment les professeurs qui m'ont fait découvrir et aimer la génétique – et du Magistère de génétique de l'Université Paris Diderot. Je remercie Yannis, Duc-Phat, Vincent et Alice pour m'avoir aidée à traverser les P1 ; à mes amis de médecine, de Paris et d'ERASMUS, pour m'avoir aidée à traverser le reste, à Clara et Claire qui ont toujours été là pour moi et qui le sont encore.

Je remercie tous les médecins, internes, infirmières, aides-soignantes, sages-femmes, co-externes des Hôpitaux de l'Est Parisien et de Stockholm (mais aussi à Montréal et à Linhai) que j'ai pu croiser au cours de mes stages d'externes, en particulier le service de génétique de l'Hôpital Trousseau où j'ai découvert la biologie médicale et les laboratoires de génétique.

Je remercie les biologistes, techniciens, aides de labo, ASH et secrétaires du CHU de Caen, mes co-internes Anne-Laure, Mathilde, François, Simon, Benjamin, Valérie et l'ensemble du service de génétique du CHR. Merci à Andreea pour ton amitié, ton soutien et les dimanches au CHR. Merci également au laboratoire du Centre François Baclesse ainsi qu'à mes collègues Nefert et Marguerite pour un dernier stage d'internat enrichissant.

Je remercie l'équipe du DIU « Maladies Héréditaires du Métabolisme » et le laboratoire de biochimie métabolique et service de maladies métaboliques de l'hôpital Necker pour m'avoir transmis la passion des MHM ! Un grand merci à Irina pour avoir été la meilleure des co-internes, j'ai hâte de te recroiser aux journées de la SFEIM, de la SSIEM, ...ou pour un escape game !

Je remercie de tout mon cœur les Escape Girls pour leur soutien indéfectible toutes ces années : Fanny A pour les soirées « horreur », les discussions interminables ; Fanny P pour nos escapades suédoises ; Clarisse pour tout (lots and lots of spongy love).

Un grand merci à mes amies du cheval Krystel, Hélène, Anne-Lise et les autres, de partager ma passion, d'avoir été là, pour moi ou pour Mika. Et un immense merci à Filippa et surtout surtout à Stéphanie pour avoir créé le paradis des chevaux sur Terre et pour avoir pris soin de ce qui m'appartient de plus précieux.

Merci à ma famille normande : merci à Maya, pour avoir partagé Pompom avec moi, pour cette incroyable année de concours avec ta maman, pour tout ce que tu m'as appris, à cheval et à pied, d'être ma petite sœur de cœur. Merci à Martine et à Jean-Marc pour leur accueil, les consultations médicales illégales, les tours du golf. Merci pour votre confiance, votre gentillesse et votre amour.

Maya : La Mongolie après la thèse... de sciences ?

Many thanks to Steve and his family, to the Gray Lab, Xin, Daphne, Emma, Charles, to Peyton, and most of all to Valerie, my third mom, for making Chapel Hill my home.

A ma famille...

En particulier aux médecins, Cathy, Sylvain, Renaud et Nadia.

A ma grand-mère, je suis heureuse de partager ce moment avec toi.

A ma sœur, merci d'être la meilleure, je t'aime.

A mes parents, merci de m'avoir toujours soutenue, de m'avoir donné les moyens de réaliser mes projet et mes rêves et pour ce que vous m'avez appris et transmis (et pour votre patience !). J'espère que vous êtes fiers.

Et enfin merci à John, Doug, Mark, Susan, Abby de m'avoir ouvert la voie.

## ABREVIATIONS

A	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AHO	<i>Albright's hereditary osteodystrophy</i>
AMPc/ <i>cAMP</i>	Adénosine monophosphate cyclique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
C	Cytosine
CHU	Centre hospitalo-universitaire
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
DMR	<i>Differentially methylated regions</i>
DPN	Diagnostic prénatal
G	Guanine
GDP	Guanosine 5'-diphosphate
GNAS	<i>Guanine nucleotide binding protein alpha stimulating</i>
G <sub>s</sub> α/Gαs	Protéine Gα stimulatrice
GTP	Guanosine 5'-triphosphate
IC95	Intervalle de confiance à 95%
MAS	Syndrome de McCune-Albright
NESP55	<i>Neuroendocrine secretory protein 55</i>
NGS	<i>Next generation sequencing</i> /Séquençage massif en parallèle
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PGM	<i>Ion personal genome machine system</i>
PHP1A/B/C	Pseudohypoparathyroïdie de type 1A/B/C
PKA	Protéine kinase AMPc-dépendante
POH	<i>Progressive osseous heteroplasia</i>
PHP	Pseudohypoparathyroïdie
PPHP	Pseudopseudohypoparathyroïdie
PTH	Parathormone
PTH1R	Récepteur à la PTH
PTHrP	<i>PTH-related protein</i>
RCIU	Retard de croissance intra-utérin
RCPG	Récepteur couplés aux protéines G
SR	Sex ratio
STX	Syntaxine
T	Thymine
TRD	<i>Transmission ratio distortion</i> /distorsion du ratio de transmission
TSH	<i>Thyroid-stimulating hormone</i> /Thyréostimuline
XLαs	Isoforme extra-large de G <sub>s</sub> α

## LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

FIGURE 1 : DOUBLE HELICE DE L'ADN .....	2
FIGURE 2 : LE CODE GENETIQUE .....	2
FIGURE 3 : CARYOTYPE NORMAL .....	3
FIGURE 4 : SCHEMA SIMPLIFIE DE LA TRANSCRIPTION, DE L'ÉPISSAGE ET DE LA TRADUCTION	5
FIGURE 5 : GENES SOUMIS OU NON A EMPREINTE PARENTALE .....	6
FIGURE 6 : MUTATIONS PONCTUELLES ET CONSEQUENCES SUR LA SEQUENCE D'ACIDES AMINES.....	8
FIGURE 7 : TRANSMISSION AUTOSOMIQUE DOMINANTE .....	12
FIGURE 8 : SCHEMA SIMPLIFIE DU METABOLISME PHOSPHOCALCIQUE .....	16
FIGURE 9 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES FONCTIONS PRINCIPALES DU RECEPTEUR PTH/PTHrP.....	16
FIGURE 10 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE BIDIMENSIONNELLE D'UN RECEPTEUR COUPLE A LA PROTEINE G.....	18
FIGURE 11 : CYCLE DE LA PROTEINE G/GTPASE .....	19
FIGURE 12 : VOIE DE SIGNALISATION PTH-PTHrP .....	20
FIGURE 13 : SCHEMA DES DIFFERENTS TRANSCRITS DU LOCUS GNAS .....	23
FIGURE 14 : PHOTOGRAPHIES DE MAINS ET DE PIEDS D'UNE ENFANT DE 3 ANS ET DE SA MERE ATTEINTES D'AHO.....	24
FIGURE 15 : ASPECTS CLINIQUES ET RADIOLOGIQUES DU SYNDROME McCUNE-ALBRIGHT	28
FIGURE 16 : ARBRES GENEALOGIQUES DE FAMILLES PHP .....	29
FIGURE 17 : ARBRE GENEALOGIQUE DIVISE EN FAMILLES NUCLEAIRES .....	33
FIGURE 18 : ÉTAPES DU PROCESSUS DE SEQUENÇAGE DE NOUVELLE GENERATION POUR LA PLATEFORME ION TORRENT .....	35
FIGURE 19 : CORRECTION DU BIAIS DE CONSTATATION .....	38
FIGURE 20 : DIAGRAMME DE FLUX DE L'ANALYSE DE TRANSMISSION .....	41
FIGURE 21 : ANALYSE DE TRANSMISSION APRES CORRECTION DU BIAIS .....	45
FIGURE 22 : DIAGRAMME EN FORET REPRESENTANT LES RESULTATS DE L'ANALYSE DE SENSIBILITE .....	46
FIGURE 23 : ANALYSE DE TRANSMISSION APRES CORRECTION DU BIAIS EN FONCTION DU PHENOTYPE DU PARENT TRANSMETTEUR ET DE LA SEVERITE DE LA MUTATION .....	48
FIGURE 24 : PREDOMINANCE FEMININE PARMIS LES DESCENDANTS MUTES .....	49
FIGURE 25 : MECANISMES BIOLOGIQUES CONTRIBUTANT A LA TRD.....	54
TABLEAU 1 : PATHOLOGIES CAUSEES PAR DES MUTATIONS PERTE DE FONCTIONS GNAS	27
TABLEAU 2 : RESULTATS DES DPN .....	43

# SOMMAIRE

PREAMBULE .....	1
INTRODUCTION .....	13
I.    Introduction au métabolisme phosphocalcique et voie de la PTH .....	13
1) L'homéostasie calcique .....	13
2) L'homéostasie phosphorique.....	13
3) PTH et voie de signalisation .....	14
II.   Récepteurs couplés aux protéines G et protéines G .....	17
1) Les récepteurs couplés aux protéines G .....	17
2) Les protéines G .....	18
3) La protéine $G_{s\alpha}$ .....	19
III.  Le locus GNAS .....	21
IV.  Pathologies liées au locus GNAS.....	23
1) Pathologies liées aux mutations perte de fonction.....	23
2) Pathologies liées à un défaut d'empreinte.....	26
3) Pathologies liées à des mutations gain de fonction .....	28
V.   Centre de référence et observations .....	29
VI.  Distorsion du ratio de transmission.....	30
VII. Objectif .....	30
MATERIEL ET METHODES.....	31
I.    Cohorte de patients .....	31
1) Source des données.....	31
2) Ethique .....	32
3) Sélection des familles.....	32
II.   Génotypage.....	33
1) Séquençage massif parallèle ou NGS (Next Generation Sequencing).....	33

2)	Séquençage par technique conventionnelle ou séquençage Sanger .....	35
3)	Classification des mutations .....	36
III.	Calcul des ratios .....	36
IV.	Biais de constatation .....	37
V.	Analyse statistique.....	39
RESULTATS	.....	40
I.	Cohorte de patients .....	40
1)	Effectifs.....	40
2)	Sporadique/familial .....	41
3)	Nombre d'enfants par parent atteint .....	42
4)	Mutations.....	42
5)	Diagnostic prénatal.....	42
II.	Ratios de transmission .....	43
1)	Transmission maternelle/paternelle.....	43
2)	Sévérité des mutations .....	46
3)	Origine grand-parentale des mutations et phénotype du parent transmetteur	47
4)	Sex ratio .....	48
DISCUSSION	.....	50
I-	Distorsion du ratio de transmission : discussion des résultats.....	50
1)	Stratégie d'inclusion .....	50
2)	Biais de constatation .....	51
3)	Transmissions maternelles et paternelles .....	51
4)	Déséquilibre du sex ratio .....	52
5)	Fertilité.....	52
6)	Autres cas dans la littérature .....	52
II-	Distorsion du ratio de transmission : mécanismes et hypothèses .....	53
1)	Mécanismes biologiques contribuant à la TRD.....	53

2) Entraînement méiotique de l'ovogenèse.....	55
3) Rôle de l'empreinte.....	56
4) Prédominance féminine.....	56
III- Limites de l'étude.....	56
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	58
BIBLIOGRAPHIE.....	59
ANNEXES .....	65
ANNEXE 1 – Article.....	66
ANNEXE 2 – Feuille de demande de génotypage de <i>GNAS</i> .....	86
ANNEXE 3 – Liste des mutations.....	87



## PREAMBULE

Quelques connaissances de base en génétique pour les non-initiés, afin d'aider à la compréhension de ce qui va suivre.

*D'après Biologie moléculaire et médecine : de la biologie à la clinique, Flammarion ; Biologie et génétique moléculaires, Dunod ; [www.orpha.net](http://www.orpha.net)*

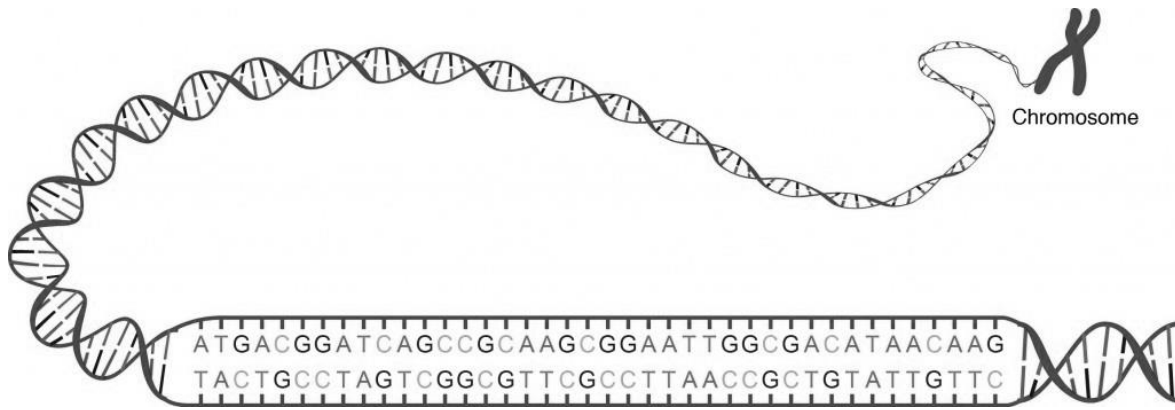
### La double hélice :

En 1944, Avery, McLeod et McCarthy ont montré que l'**acide désoxyribonucléique (ADN)** était le support de l'information génétique. Sa structure en double hélice a été élucidée par Watson, Crick et Wilkins en 1953.

Chez l'homme, comme chez tous les eucaryotes, la quasi-totalité de l'ADN est localisée dans le noyau cellulaire. Une petite molécule d'ADN circulaire est retrouvée dans la mitochondrie et complète le patrimoine génétique de la cellule.

### La structure de l'ADN est étonnamment simple :

Une molécule d'ADN est composée de l'union de deux brins, enroulés en hélice droite, constitués chacun par une longue chaîne dont l'unité de base est le **nucléotide**. Il existe 4 nucléotides différents dans l'ADN : l'adénine (**A**), la guanine (**G**), la cytosine (**C**) et la thymine (**T**). Les nucléotides de chaque brin s'associent ensemble, l'adénine avec une thymine du brin complémentaire, la guanine avec une cytosine.

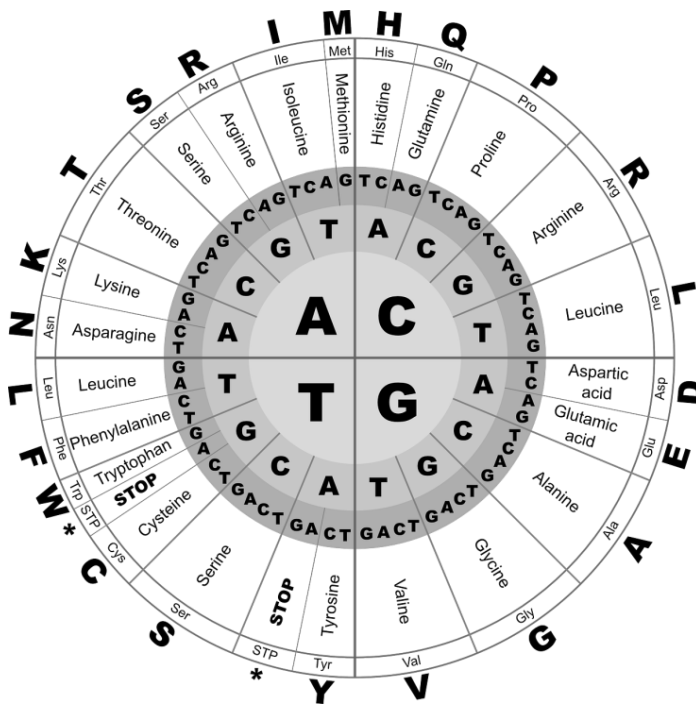


**FIGURE 1: DOUBLE HELICE DE L'ADN**

Les nucléotides de chaque brin s'associent deux à deux, une adénine avec une thymine, une guanine avec une cytosine. D'après <http://expertadn.fr/><sup>1</sup>.

Le code génétique :

L'information dont la cellule a besoin est encodée par l'ordre d'enchaînement des bases. Un enchaînement de trois nucléotides (ou **codon**) définit le code d'un **acide aminé**, l'unité de base des protéines (FIGURE 2). Il existe 64 codons possibles pour seulement 20 acides aminés : le code génétique est redondant.

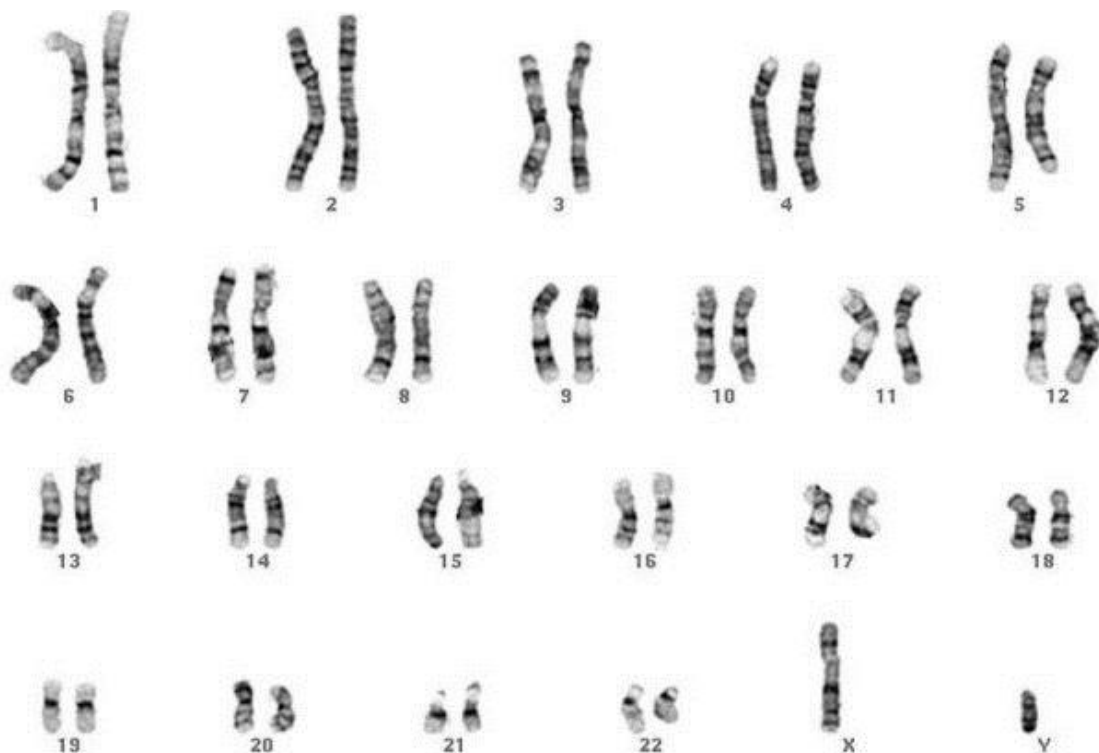


**FIGURE 2 : LE CODE GENETIQUE**

Depuis le centre : premier nucléotide du codon, puis deuxième et troisième. Trois codons correspondent au codon STOP (image open source).

### L'ADN est compacté dans le noyau :

Chez l'homme, l'ADN contient 3 milliards de paires de bases pour une longueur totale de 1 m s'il était entièrement déroulé. L'ADN est donc compacté selon un système hiérarchisé et son degré de compaction dépend de l'état de la cellule (notamment si elle se divise ou non). La superstructure de l'ADN correspondant à l'état le plus compacté est le **chromosome**. Chaque noyau cellulaire contient **46 chromosomes**, organisés en paires : 22 paires d'**autosomes** et 1 paire de **chromosomes sexuels**, XX pour les femmes, XY pour les hommes (FIGURE 3). Un chromosome de chaque paire provient de chacun des parents.



**FIGURE 3 : CARYOTYPE NORMAL**

Le caryotype est l'arrangement standard de l'ensemble des chromosomes d'une cellule, à partir d'une prise de vue microscopique. Les chromosomes sont organisés par paire et numérotés en fonction de leur taille et de leur forme. Il s'agit ici du caryotype en bandes G (coloration par le Giemsa après traitement à la trypsine) d'un garçon (un chromosome X et un chromosome Y). Image open source.

### ADN codant pour les protéines :

Parmi les 3 milliards de paires de bases du génome, seuls 2% constituent l'ADN codant pour les protéines : ce sont les **gènes**, au nombre d'environ 25 000. Ils sont présents en deux copies, ou **allèles**, l'une provenant du père, l'autre de la mère.

*NB* : un allèle est une version d'un gène occupant une place précise sur un chromosome et qui peut varier d'un individu à un autre. Lorsque les deux allèles d'un même gène sont identiques, on parle d'**homozygotie** ; lorsque les deux allèles sont différents, on parle d'**hétérozygotie**.

Ces gènes sont **transcrits** par une enzyme (l'ARN polymérase) en acides ribonucléiques messagers (**ARNm**) qui sont exportés en dehors du noyau vers le cytosol pour y être **traduits** en protéine. On parle de l'**expression** d'un gène (FIGURE 4).

Bien que notre information génétique soit identique dans nos 70 000 milliards de cellules, l'expression des différents gènes varie d'une cellule à l'autre en fonction du stade de développement, de l'organe et du type cellulaire, de notre environnement.

### Architecture des gènes :

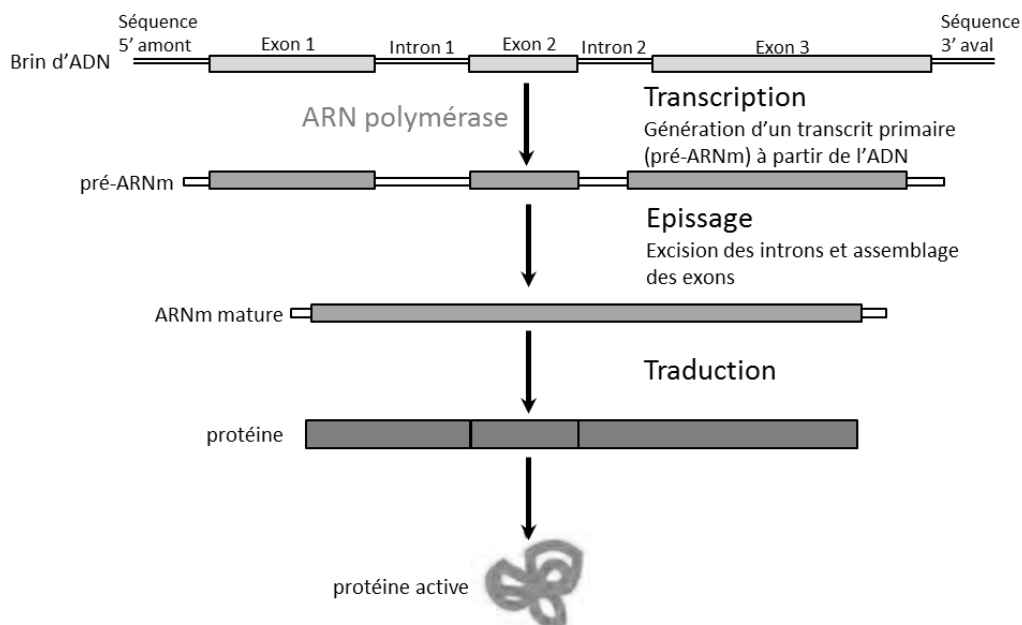
L'information contenue dans les gènes est morcelée. Le gène commence par une séquence contrôlant qualitativement et quantitativement la transcription et qui peut être très éloignée (jusqu'à plusieurs milliers de bases, ou kb, en amont). Plus proche de la séquence codante se trouve le **promoteur** où se fixe l'ARN polymérase. Ces séquences régulatrices interagissent avec des protéines appelées facteurs de transcription qui participent au contrôle de l'expression des gènes. Vient ensuite le site d'initiation de la transcription correspondant au premier exon. La séquence est non codante (non traduite en protéine) jusqu'à la séquence ATG, codon méthionine, qui signale le lieu d'initiation de la traduction. Suivent ensuite une alternance de séquences conservées (**exons**) ou non (**introns**) dans la version finale de l'ARNm cytosolique.

On appelle exons toutes les séquences transcrites retrouvées dans les messagers cytosoliques. Ils ne correspondent pas forcément aux parties codantes du gène : les séquences en amont du codon ATG et en aval du premier codon STOP (signalant la fin de la traduction) ne sont pas traduites. Il existe des exons alternatifs, qui seront conservés ou non dans l'ARNm mature cytosolique.

On appelle intron toute séquence transcrite éliminée par épissage au cours de la maturation du transcrit.

Le nombre et la taille des exons et des introns peuvent varier considérablement d'un gène à un autre. A titre d'exemples, le gène de la  $\beta$ -globine codant pour une partie de l'hémoglobine contient 3 exons, celui de la dystrophine (gène de la myopathie de Duchenne) en contient 78 et celui de la titine, une protéine musculaire, en contient 363 ; c'est le plus grand du génome humain.

*NB* : Par la suite, et par convention, les sigles désignant les gènes sont en italique.



**FIGURE 4 : SCHEMA SIMPLIFIE DE LA TRANSCRIPTION, DE L'ÉPISSAGE ET DE LA TRADUCTION**

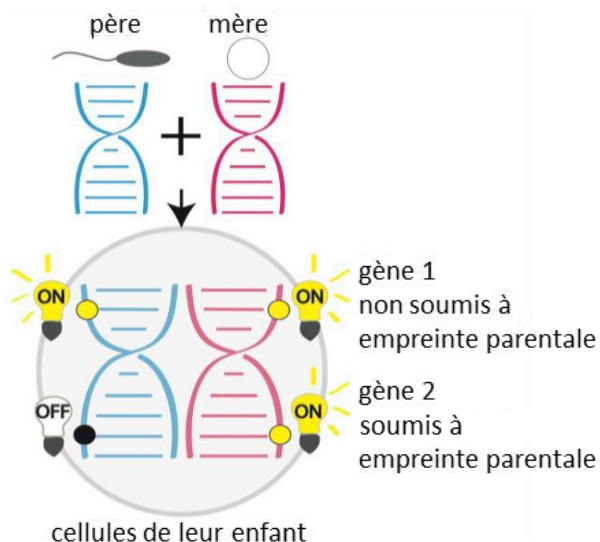
Un gène est transcrit dans le noyau par une ARN polymérase en pré-ARNm, ou transcrit primaire. Celui-ci subit des modifications d'épissage : les introns sont excisés et les exons assemblés pour former un ARNm mature qui est ensuite traduit en protéine dans le cytosol. La protéine nouvellement synthétisée doit subir des modifications et se replier pour devenir active. D'après <http://planet-vie.ens.fr/>.

## Régulation par modification de la structure primaire de l'ADN et épigénétique :

Il existe une autre « couche » d'informations sous la forme de modifications réversibles, transmissibles (lors des divisions cellulaires) et adaptatives sans modification de la séquence nucléotidique. C'est l'**épigénétique**. Il peut s'agir de modifications de l'organisation en trois dimensions de l'ADN, de modifications des protéines autour desquelles s'enroule l'ADN, ou bien de modifications de la molécule d'ADN qui vont modifier l'expression des gènes. Les modifications de l'ADN sont principalement des **méthylations** (ajout d'un groupement méthyl  $-CH_3$ ) des cytosines (C) des doublets GC (ou îlots CpG). La méthylation des séquences en amont des gènes est associée à une diminution de leur activité transcriptionnelle.

### Empreinte parentale :

Certains gènes sont dits soumis à **empreinte parentale** : ils ne sont pas exprimés de la même manière selon qu'ils proviennent de l'allèle maternel ou paternel (FIGURE 5). Par exemple, un gène soumis à empreinte maternelle sera méthylé sur l'allèle maternel et ne sera exprimé qu'à partir de l'allèle paternel. L'empreinte peut être un phénomène dépendant du stade de développement ou du tissu.



**FIGURE 5 : GENES SOUMIS OU NON A EMPREINTE PARENTALE**

Les gènes non soumis à empreinte parentale sont exprimés de manière biallélique. Les gènes soumis à empreinte, ici paternelle, ne sont exprimés qu'à partir de l'allèle maternel. D'après Borel (2017)<sup>3</sup>.

## Variations, polymorphismes et mutations :

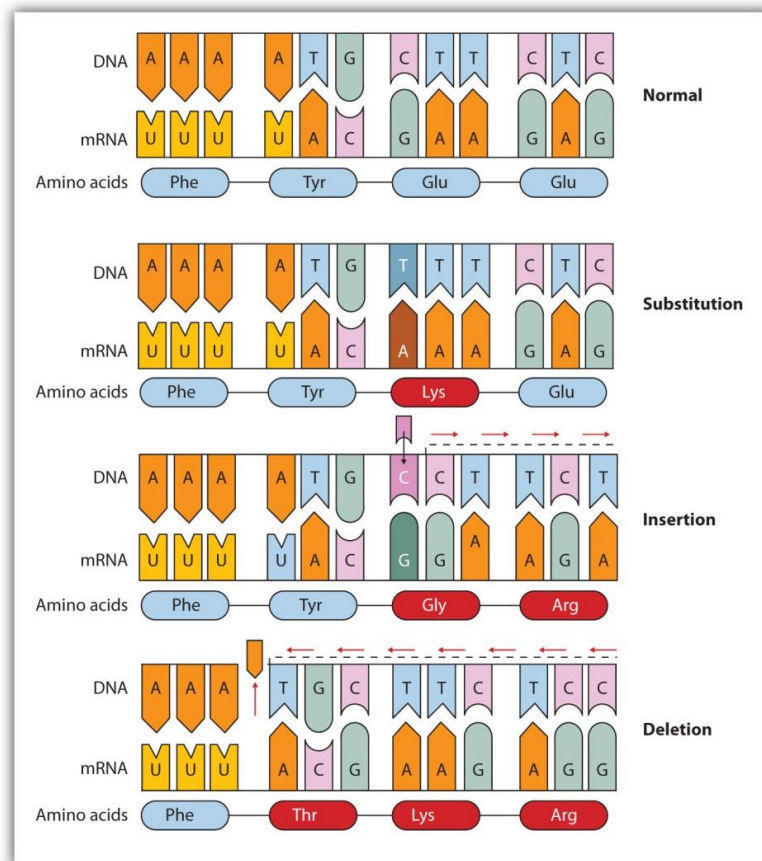
L'ADN comporte en moyenne une variation tous les 2 à 3000 nucléotides. Lorsqu'elles n'ont pas de conséquence pathogénique, ces différences participent à la variabilité des individus et peuvent être situées tout au long du génome, y compris dans les gènes. Dans le cas de variations situées dans les régions régulatrices des gènes et qui les perturbent, ou dans les régions codantes et qui modifient la séquence d'acides aminés de la protéine de manière significative, on parle de variation pathogène, ou mutation.

Différents types de mutations ponctuelles sont décrits (FIGURE 6) :

- **Substitutions** : remplacement d'un nucléotide par un autre
  - **Mutation faux-sens** : entraîne le remplacement d'un acide aminé par un autre.
  - **Mutation non-sens** : entraîne l'apparition d'un codon STOP prématuré tronquant la protéine.
  - **Mutation synonyme** ou silencieuse : du fait de la redondance du code génétique, la modification d'un nucléotide dans un codon (souvent en 2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> position) n'entraîne pas de modification de l'acide aminé correspondant. Dans certains cas, une mutation synonyme peut avoir comme conséquence une modification de l'épissage.
  - **Mutation d'épissage** : substitution intronique cette fois au niveau d'un site régulant l'épissage du transcrit, pouvant conduire à un saut d'exon ou à la rétention d'un intron.
- **Délétions, duplications ou insertions** : perte ou addition d'un ou plusieurs nucléotides
  - **Avec décalage de cadre de lecture** : lorsque le nombre de nucléotides perdus ou gagnés n'est pas un multiple de 3, les codons suivants seront modifiés, entraînant une séquence d'acides aminés aberrante.

- **Sans décalage du cadre de lecture** : lorsque le nombre de nucléotides perdus ou gagnés est un multiple de 3, il existe une délétion ou une insertion d'un ou plusieurs acides aminés. En fonction de leur localisation et de leur importance au sein de la protéine, ces modifications peuvent perturber la conformation en trois dimensions de la protéine, son activité ou son adressage à un compartiment cellulaire.

Il existe des mutations concernant un plus grand nombre de nucléotides dont des délétions pouvant concerner un ou plusieurs exons, voire un ou plusieurs gènes, des translocations par échange de matériel génétique entre deux ou plusieurs chromosomes, des trisomies ou monosomie par le gain ou la perte d'un chromosome entier, etc.



**FIGURE 6 : MUTATIONS PONCTUELLES ET CONSEQUENCES SUR LA SEQUENCE D'ACIDES AMINES**

Une substitution peut avoir comme conséquence le remplacement d'un acide aminé par un autre. L'insertion ou la délétion d'un nombre de nucléotides différent d'un multiple de 3 entraîne un décalage du cadre de lecture et une séquence d'acides aminés aberrante (image open source).



### Conséquence des mutations :

Les mutations peuvent avoir différentes conséquences sur la fonction protéique :

- **Mutations perte de fonction** : elles entraînent la perte de l'activité de la protéine, soit en perturbant des régions essentielles de la protéine, soit en entraînant une dégradation de la protéine, voire une absence de production
  - **Haploinsuffisance** : lorsque la production de la protéine à partir de l'allèle sain restant est insuffisante pour assurer le rôle de la protéine
  - Mutations avec **effet dominant négatif** : lorsque la protéine produite à partir de l'allèle muté interfère avec l'action de la protéine normale
- **Mutations gain de fonction** : ce sont des cas plus rares avec différents mécanismes possibles. Elles peuvent entraîner la synthèse d'une protéine hyperactive (ce sont des mutations localisées sur des codons spécifiques le long du gène) ou bien concerner les séquences régulatrices et entraîner une sur-expression d'une protéine normale. Parfois, elles peuvent conférer à la protéine une nouvelle fonction. C'est le cas de mutations associées à l'apparition de cancers.

### Hérédité mendélienne et modes de transmission :

Gregor Mendel est l'un des fondateurs de la biologie contemporaine. En 1865, Mendel publie son mémoire princeps sur l'hybridation des petits pois ("*Versuche über Pflanzenhybriden*"), et établit les bases théoriques de la génétique. Trois lois énoncent les principes de l'hérédité biologique :

- Première loi : les deux allèles d'un gène déterminant un caractère se disjointent (ségrégent) lors de la formation des gamètes : une moitié des gamètes contient l'un des allèles et l'autre moitié contient l'autre.
- Deuxième loi : si les descendants d'un croisement impliquant deux lignées pures différant par un seul caractère présentent tous le même phénotype, ce

phénotype (caractère) est qualifié de dominant (l'autre caractère est dit récessif).

- Troisième loi : la ségrégation d'un couple d'allèles est indépendante de celle d'un autre couple d'allèles. Cette loi n'est vraie que lorsque les deux couples d'allèles sont situés sur des chromosomes non homologues.

De là en découle l'hérédité mendélienne avec différents modes de transmission des maladies génétiques :

- Pour les gènes situés sur les autosomes :
  - On parle de **transmission autosomique dominante** si le gène en cause est porté par un autosome et si la présence d'un seul allèle muté suffit pour que la maladie se manifeste. Les individus hétérozygotes ( $A/a$ ) pour le gène en cause sont malades. Généralement, les individus homozygotes ( $A/A$ ), s'ils sont viables, sont plus sévèrement atteints par la maladie; ils sont si rares qu'on peut considérer que tous les atteints sont, sauf exception, hétérozygotes.

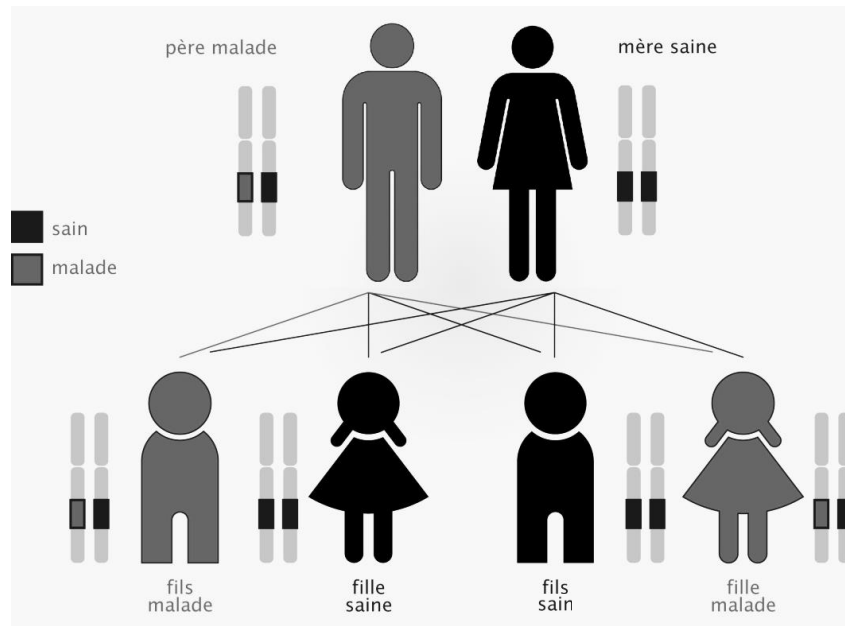
Il y a autant de filles que de garçons atteints parce que le gène impliqué est sur un autosome. Une personne malade a un de ses deux parents atteint, sauf apparition de la mutation causale *de novo* dans une cellule sexuelle d'un des deux parents. Une personne malade a un risque de 50% de transmettre l'allèle muté (et donc la maladie) à chacun de ses enfants (FIGURE 7).

- On parle de **transmission autosomique récessive** si le gène en cause est porté par un autosome et si la présence de deux allèles mutés du gène est nécessaire pour que la maladie se manifeste. Les malades sont homozygotes (ou hétérozygotes composites si chaque allèle comporte une mutation différente) pour le gène en cause.

Un couple à risque est formé par deux conjoints porteurs sains hétérozygotes ( $A/a$ ). Il a, à chaque grossesse, un risque de 25% d'avoir un

enfant atteint (homozygote  $a/a$ ), une probabilité de 50% d'avoir un enfant porteur sain (hétérozygote  $A/a$ ) qui peut avoir un enfant atteint si son conjoint est également porteur et une probabilité de 25% de donner naissance à un enfant sain (homozygote  $A/A$ ).

- Pour les gènes situés sur les chromosomes sexuels : **hérédité liée à l'X**
  - Les individus de sexe masculin n'ont qu'un seul chromosome X : ils sont hémizygotés et ne possèdent qu'un seul exemplaire des gènes du chromosome X. Par contre, les femmes possèdent deux chromosomes X et deux exemplaires de chacun des gènes localisés sur le chromosome X. La question de la dominance ou de la récessivité ne se pose pas chez les individus de sexe masculin : soit le gène est muté et ils sont atteints, soit le gène est normal et ils sont sains. La question de la dominance ou de la récessivité ne se pose que chez les individus de sexe féminin : si la maladie survient quand un seul gène est muté, elle est dominante, si la maladie survient seulement quand les deux exemplaires sont mutés, elle est récessive.
  
- Cas particuliers :
  - **Pénétrance incomplète** : quand on peut avoir le génotype à risque sans être atteint de la maladie.
  - **Expressivité variable** : quand, pour un même génotype à risque, la maladie peut prendre différentes formes.
  - **Empreinte parentale** : quand la maladie dépend du fait que la mutation responsable a été transmise par le père ou par la mère.



**FIGURE 7 : TRANSMISSION AUTOSOMIQUE DOMINANTE**

Un parent atteint d'une maladie génétique autosomique dominante a 50% de chance de transmettre son allèle sain (et donc d'avoir un enfant sain) et 50% de transmettre son allèle malade (et donc d'avoir un enfant malade), quel que soit son sexe ou celui de son enfant. D'après <http://www.brusselsgenetics.be/><sup>4</sup>.

# INTRODUCTION

## I. Introduction au métabolisme phosphocalcique et voie de la PTH

Le calcium (sous forme  $\text{Ca}^{2+}$ ) et le phosphore (sous forme de phosphate  $\text{PO}_4^{3-}$ ) jouent des rôles essentiels dans l'organisme et leurs régulations sont interdépendantes<sup>5</sup>. Le calcium participe à plusieurs voies de signalisation et au métabolisme cellulaire, à la transmission de l'influx nerveux, à la sécrétion hormonale, à la contraction musculaire, à la coagulation, etc., tandis que le phosphate est impliqué dans l'équilibre acido-basique, le métabolisme énergétique (sous forme d'ATP par exemple). Leurs homéostasies sont étroitement liées à la physiologie de l'os (FIGURE 8).

### 1) L'homéostasie calcique

Les principaux organes impliqués sont l'intestin, les reins et le squelette. Les principales hormones impliquées sont la parathormone (PTH) et la vitamine D sous sa forme active ( $1,25(\text{OH})_2$  vitamine  $\text{D}_3$ ).

Environ 99% du calcium de l'organisme est stocké sous forme d'hydroxyapatite dans les os qui jouent alors un rôle de réservoir. Seule une infime fraction circule dans le plasma et sa concentration est finement régulée par la PTH qui est une hormone hypercalcémiante et dont la synthèse est contrôlée par la vitamine D. La PTH va agir sur l'os en induisant une ostéolyse, ainsi que sur le tubule rénal en majorant la réabsorption du calcium.

### 2) L'homéostasie phosphorique

La masse de phosphate contenue dans l'organisme est équivalente à celle du calcium. Elle se répartie dans l'os ( $\approx 90\%$ ), dans le milieu intracellulaire ( $\approx 9\%$ ) et dans

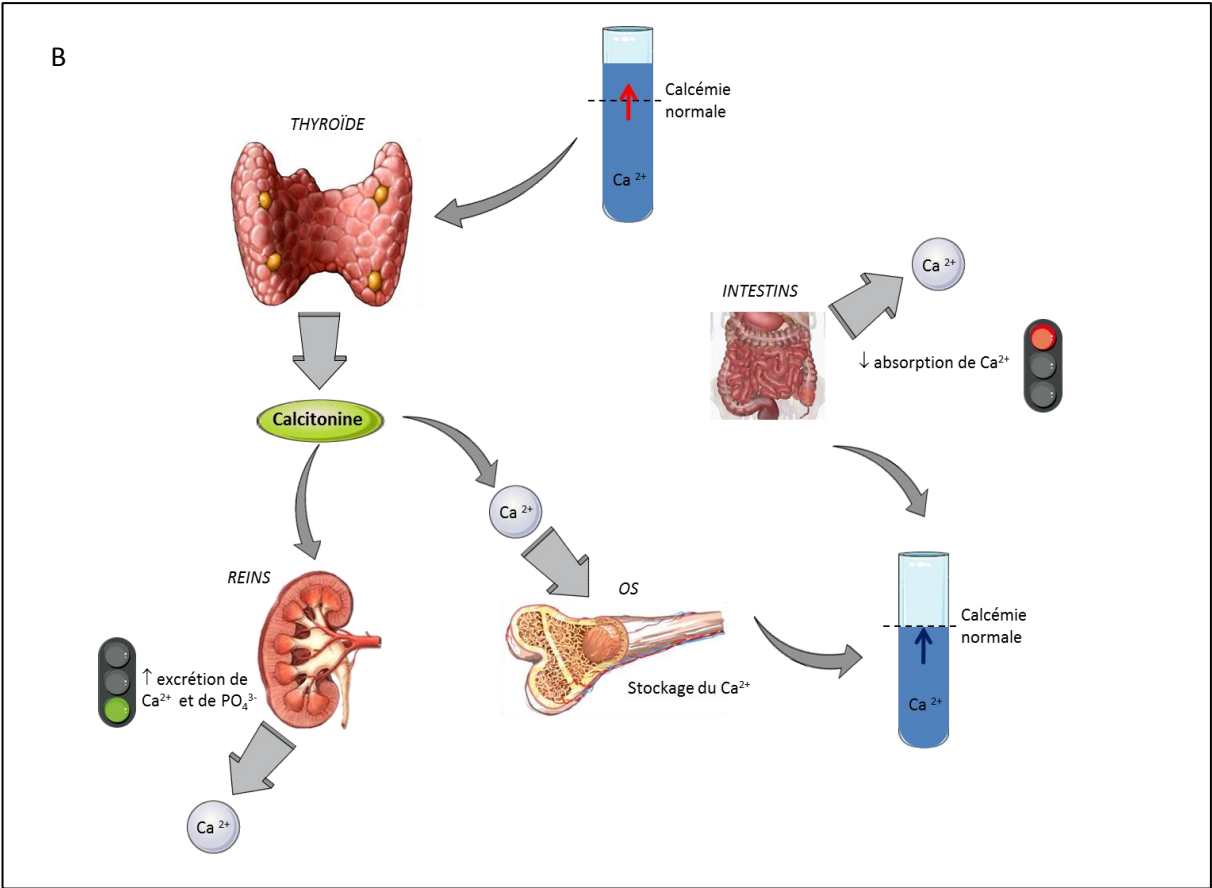
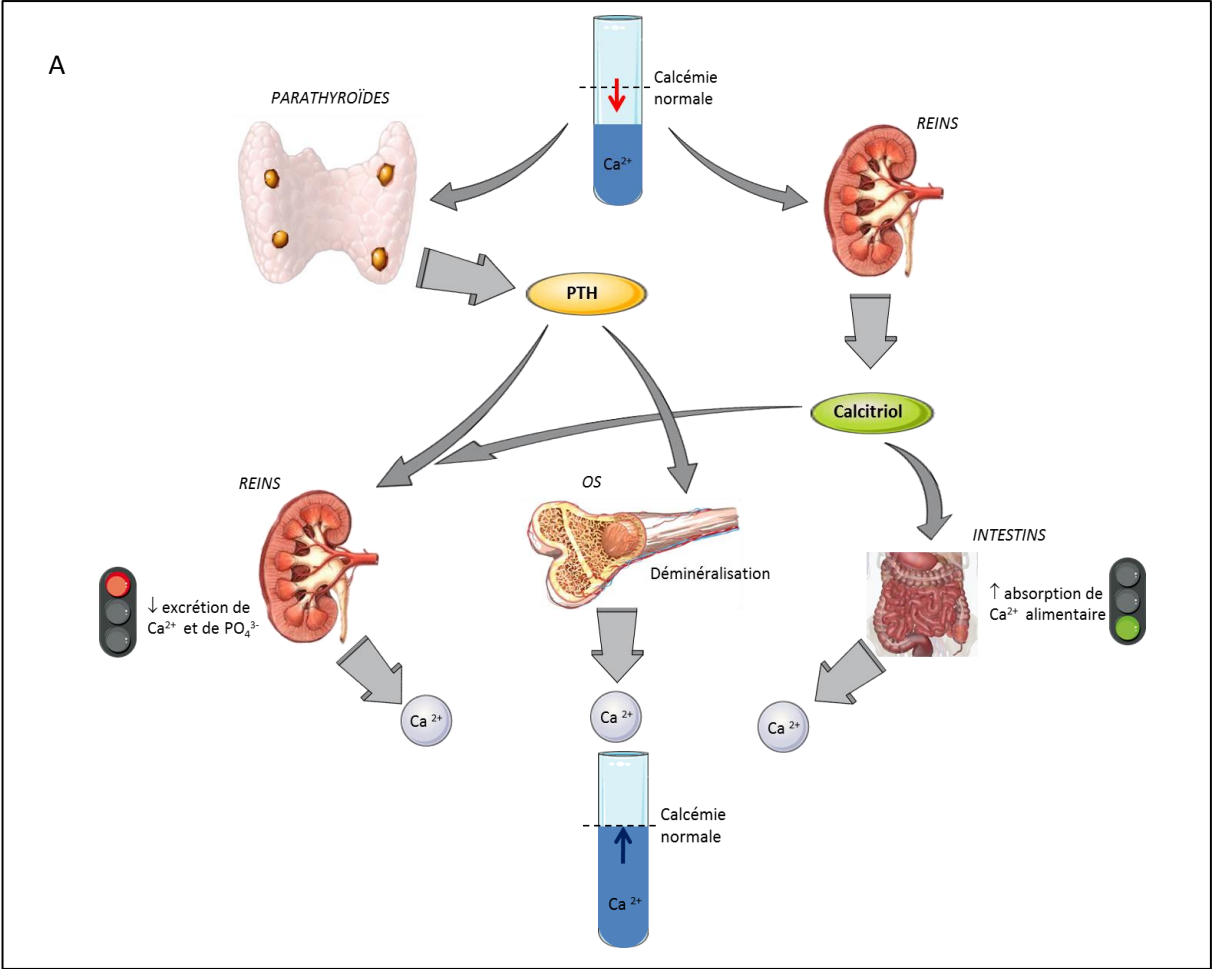
le plasma ( $\approx 1\%$ ). Les mêmes voies métaboliques sont impliquées dans son métabolisme mais avec des mécanismes différents. Ainsi, la PTH aura cette fois une action hypophosphatémiant en réduisant sa réabsorption tubulaire.

### 3) PTH et voie de signalisation

La parathormone (PTH) est une hormone peptidique hypercalcémiant et hypophosphatémiant produite par les cellules principales des glandes parathyroïdes situées à la face postérieure de la thyroïde<sup>6</sup>. Sa sécrétion est étroitement régulée par la calcémie (rétrocontrôle, FIGURE 8). La PTH est synthétisée sous forme de prépro-peptide qui, après clivages enzymatiques successifs, va être stockée puis libérée sous sa forme active constituée de 84 acides aminés.

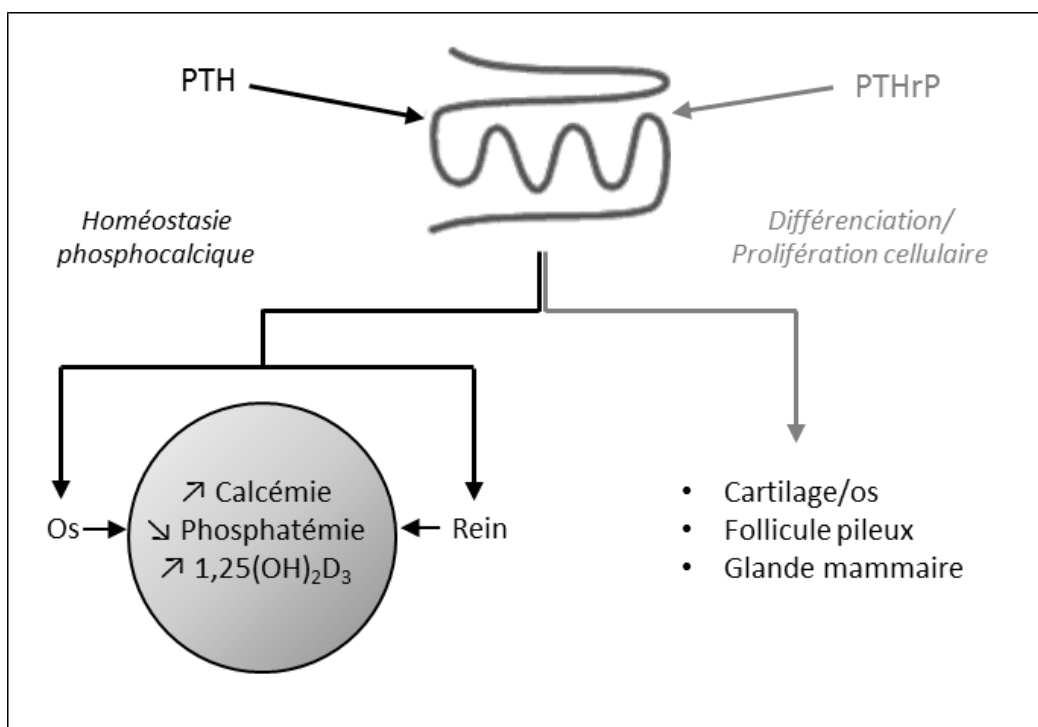
Les actions de la PTH sont principalement médiées par un récepteur à la PTH, PTHR1. Le domaine N-terminal de la PTH interagit avec PTHR1 qui est un récepteur à 7 domaines transmembranaires lié à une protéine G. PTHR1 est exprimé à la surface des ostéoblastes et des ostéocytes dans l'os, ainsi qu'à la surface des cellules du tubule rénal. La cascade de signalisation engendrée par la liaison de la PTH avec son récepteur via deux voies de signalisation intracellulaire (celle de l'AMP cyclique et celle de la phospholipase C) module l'expression de gènes contrôlant le remodelage osseux et l'homéostasie phosphocalcique (FIGURE 9).

La PTHrP (*PTH related protein*) est un peptide apparenté à la PTH, produit par des cellules cancéreuses, notamment pulmonaires ou glandulaires dans le cadre d'un syndrome paranéoplasique, à l'origine d'hypercalcémies malignes. En effet, l'action de la PTHrP est médiée par le récepteur PTHR1. Mais la PTHrP est également produite de manière physiologique, en particulier au cours de la vie fœtale<sup>7</sup> : elle a un rôle critique dans le développement de la glande mammaire, de l'épiderme, du tissu dentaire et du squelette (FIGURE 9).



**FIGURE 8 : SCHEMA SIMPLIFIE DU METABOLISME PHOSPHOCALCIQUE**

**(A)** Une hypocalcémie entraîne la production de PTH par les parathyroïdes et de calcitriol par le rein. Ces deux hormones agissent sur le rein afin de réduire l'excrétion de calcium et de phosphate, sur l'os en entraînant un relargage des stocks de calcium et sur l'intestin afin d'augmenter l'absorption du calcium alimentaire, normalisant ainsi la calcémie. **(B)** En cas d'hypercalcémie, la calcitonine produite par la thyroïde a un effet hypocalcémiant en augmentant l'excrétion de calcium et de phosphate par le rein et le stockage du calcium par l'os. D'après Pharmacology: an illustrated review<sup>8</sup>.



**FIGURE 9 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES FONCTIONS PRINCIPALES DU RECEPTEUR PTH/PTHrP**

En transmettant les effets de la PTH sur le rein et l'os, le récepteur PTH/PTHrP contrôle l'homéostasie phosphocalcique. En transmettant les actions autocrines et paracrines du PTHrP au cours du développement embryonnaire, le récepteur contrôle la différenciation et la prolifération cellulaire du tissu osseux, de la peau et de la glande mammaire. D'après Silve *et al.* (2013)<sup>9</sup>.



## II. Récepteurs couplés aux protéines G et protéines G

### 1) Les récepteurs couplés aux protéines G

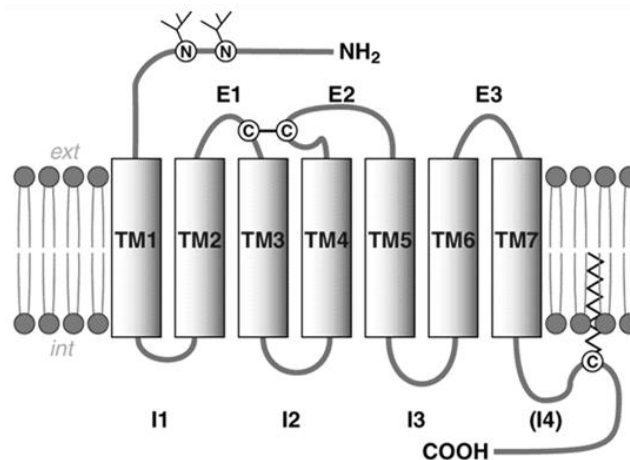
En 2012, Brian K. Kobilka et Robert J. Lefkowitz sont récompensés pour leurs travaux sur les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) par un Prix Nobel de Chimie. Ces RCPG (ou récepteurs à 7 domaines transmembranaires) représentent la plus grande famille de protéines membranaires<sup>10</sup>.

Ces récepteurs sont critiques dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que la vision, l'odorat, le métabolisme cellulaire, le système endocrinien, le fonctionnement de la jonction neuromusculaire et du système nerveux central. Plus de 800 RCPG ont été identifiés chez l'humain et sont responsables d'un large éventail de maladies cardiovasculaires, métaboliques, neurodégénératives, psychiatriques, cancéreuses, infectieuses et représentent plus de 40% des cibles thérapeutiques des médicaments actuellement sur le marché<sup>11</sup>.

Localisés à la surface des cellules dans la membrane plasmique, ils se lient à une grande diversité de ligands tels que les hormones, les nucléotides, les lipides, les ions et les neurotransmetteurs. La fixation d'un ligand sur ces récepteurs entraîne un changement de conformation de ces derniers, faisant d'eux des intermédiaires clés dans la transmission de signaux extracellulaires vers l'intérieur de la cellule. En effet, la structure tertiaire des RCPG peut être divisée en 3 parties (FIGURE 10) :

- 7 domaines transmembranaires organisés en hélices  $\alpha$  (reliés par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires) ;
- un domaine extracellulaire, composé de l'extrémité N-terminale qui peut subir des modifications post-transcriptionnelles et des trois boucles, et qui va interagir avec les différents ligands ;
- un domaine intracellulaire, composé des trois boucles et de l'extrémité C-terminale pouvant posséder des sites d'ancrage lipidique à la membrane (création d'une quatrième boucle) et pouvant être phosphorylé sur différents résidus.

Le changement de conformation du récepteur lors de la liaison du ligand va rendre le RCPG capable d'activer les protéines G intracellulaires.



**FIGURE 10 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE BIDIMENSIONNELLE D'UN RECEPTEUR COUPLE A LA PROTEINE G**

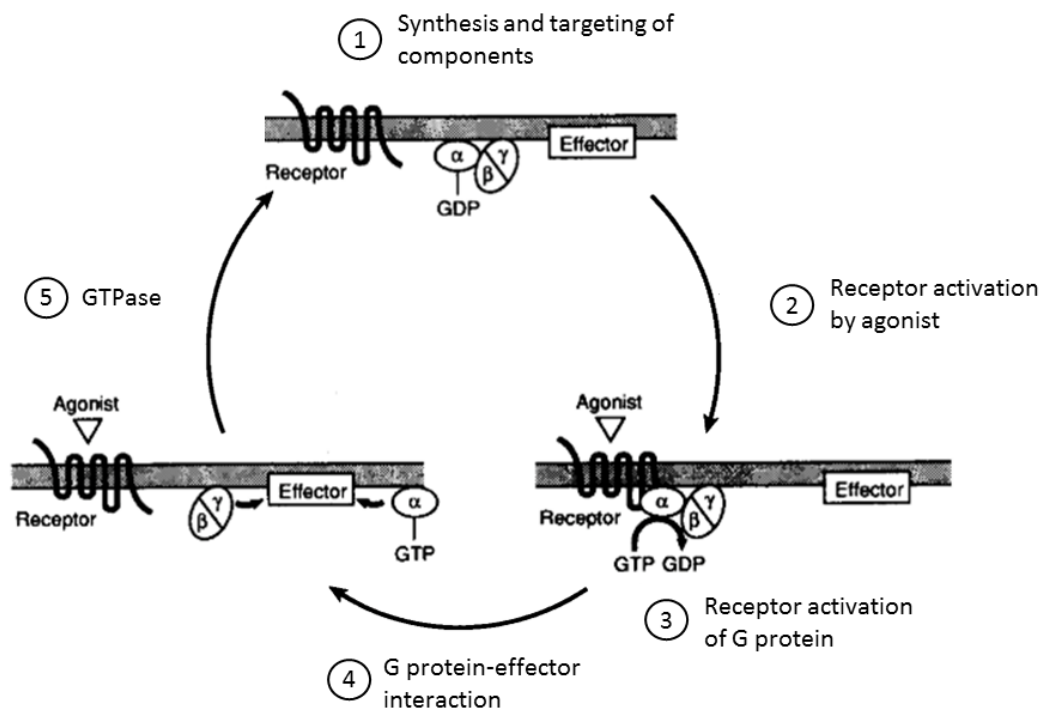
L'extrémité N-terminale est extracellulaire et est ici représentée N-glycosylée sur deux sites. Les sept hélices traversant la membrane sont représentées par des rectangles verticaux et sont numérotées TM1 à TM7. Les trois boucles extracellulaires et les trois boucles intracellulaires sont numérotées E1 à E3 et I1 à I3 respectivement. Un pont disulfure entre deux cystéines de E1 et E2 est représenté, ainsi qu'une cystéine palmitoylée dans l'extrémité C-terminal formant une quatrième boucle intracellulaire (I4). D'après Spiegel (1995)<sup>12</sup>.

## 2) Les protéines G

Dix-huit ans avant Kobilka et Lefkowitz, en 1994, Alfred G. Gilman et Martin Rodbell obtenaient le Prix Nobel de Physiologie et de Médecine pour leur découverte des protéines G et leur rôle dans la signalisation cellulaire<sup>13</sup>.

Les protéines G sont des hétérotrimères, composées des sous-unités  $G\alpha$ ,  $G\beta$  et  $G\gamma$ . La sous-unité  $G\alpha$  inactivée contient une molécule de guanosine 5'-diphosphate (GDP). L'activation du récepteur transmembranaire par la liaison d'un ligand entraînant un changement de conformation de son domaine intracellulaire va permettre à la protéine G de se lier au récepteur. Ceci va entraîner la libération de la molécule de GDP et le recrutement d'une molécule de guanosine 5'-triphosphate (GTP) par la sous-unité  $G\alpha$ . Les sous-unités  $G\alpha$  d'une part et  $G\beta\gamma$  d'autre part se dissocient alors du récepteur et régulent leurs effecteurs respectifs. L'activité

GTPase de  $G\alpha$  hydrolyse le GTP en GDP donnant lieu au réassemblage de l'hétérotrimère (FIGURE 11).



**FIGURE 11 : CYCLE DE LA PROTEINE G/GTPASE**

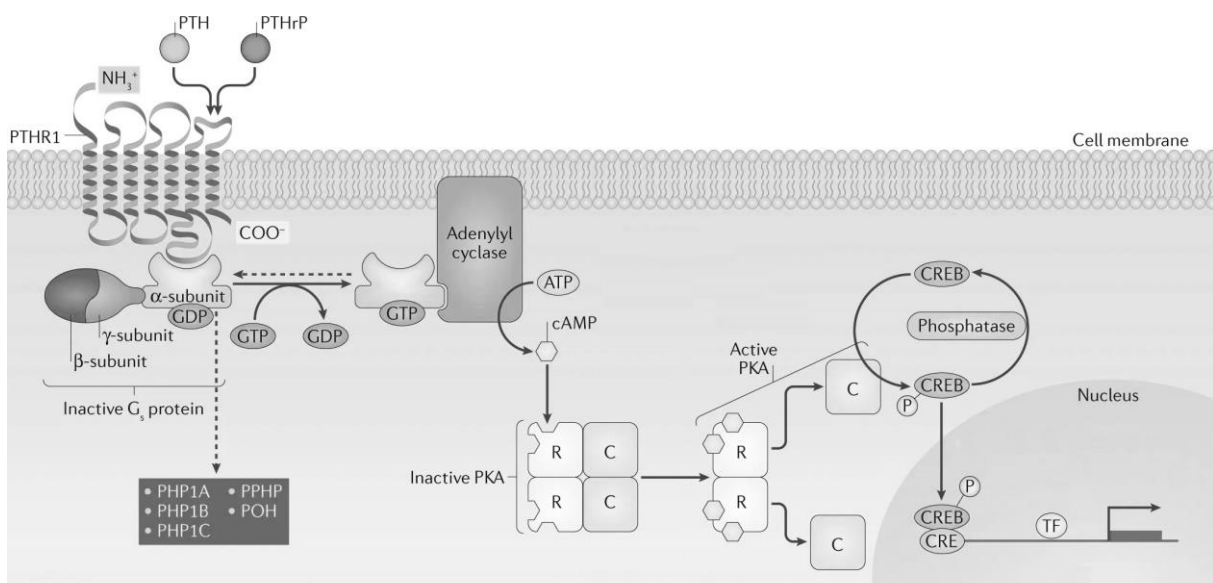
La bande grise correspond à la membrane plasmique ; au-dessus le compartiment extracellulaire, en-dessous le compartiment intracellulaire. A l'état basal, la protéine G est un hétérotrimère avec un GDP étroitement lié à la sous-unité  $\alpha$ . Le récepteur activé par un agoniste catalyse la libération du GDP, qui permet à un GTP de se lier. La sous-unité  $\alpha$  liée au GTP se dissocie du dimère. Les différentes sous-unités régulent l'activité d'un effecteur. Dans des conditions physiologiques, la régulation de l'effecteur est transitoire et est interrompue par l'activité GTPase de la sous-unité  $\alpha$ . Celle-ci hydrolyse le GTP en GDP, ramenant ainsi la sous-unité  $\alpha$  à son état inactivé avec une grande affinité pour le dimère  $\beta\gamma$  pour former à nouveau l'hétérotrimère. D'après Spiegel (1995)<sup>12</sup>.

### 3) La protéine $G_{s\alpha}$

Il existe plus de 16 sous-unités  $G\alpha$  différentes chez les mammifères. Les protéines G sont classées en fonction de la séquence primaire de la sous-unité  $\alpha$  avec 4 grandes familles :  $G_{\alpha_i/o}$ ,  $G_{\alpha_s}$ ,  $G_{\alpha_q/11}$  et  $G_{\alpha_{12/13}}$ . Dans la plupart des cas, les protéines G peuvent se coupler à plus d'un sous-type de RCPG avec des affinités différentes<sup>14</sup>.

Le groupe S des sous-unités  $G\alpha$  est composé de la protéine  $G_s\alpha$  (ou  $G\alpha_s$ , S pour *stimulatory*) qui active l'adénylate cyclase (ou adénylyl-cyclase), une enzyme membranaire catalysant la formation d'adénosine monophosphate cyclique (AMP cyclique ou AMPc) à partir de l'adénosine triphosphate (ATP). L'AMPc est un nucléotide jouant le rôle de messenger secondaire dans de nombreuses voies de signalisation intracellulaire<sup>15</sup>. Il régule de nombreuses fonctions cellulaires : croissance cellulaire et différenciation, transcription, expression protéique notamment. L'AMPc stimule la protéine kinase A AMPc-dépendante (PKA), entraînant la phosphorylation de nombreuses protéines, dont la protéine CREB (*cAMP response-element-binding-protein*), un facteur de transcription se liant aux séquences CRE (*cAMP response element*) et ayant pour cible différents gènes (FIGURE 12).

La protéine  $G_s\alpha$  qui est ubiquitaire, est codée par le gène *GNAS* (*guanine nucleotide binding protein alpha stimulating*).



**FIGURE 12 : VOIE DE SIGNALISATION PTH-PTHrP**

Lors de la liaison du ligand (PTH et PTHrP), le récepteur PTHR1 active la protéine  $G_s$  hétérotrimérique. La sous-unité  $G_s\alpha$  déclenche l'activation de l'adénylate cyclase, ce qui conduit à la synthèse d'AMPc. L'AMPc se lie ensuite aux sous-unités régulatrices (R) de la PKA, l'effecteur prédominant de l'AMPc. Lors de la liaison à l'AMPc, les sous-unités catalytiques (C) se dissocient des sous-unités R et phosphorylent de nombreuses protéines cibles, y compris les CREB qui activent la transcription des gènes sensibles à l'AMPc. Les principales caractéristiques cliniques de la pseudohypoparathyroïdie (PHP) sont dues à défauts moléculaires dans la voie de signalisation PTH-PTHrP, à l'exception peut-être de l'ossification ectopique. *TF* : Facteur de transcription. D'après Mantovani *et al.* (2018)<sup>16</sup>.

### III. Le locus GNAS

Le gène *GNAS* est situé sur un locus complexe qui s'étend sur plus de 200 kb, situé sur le bras long du chromosome 20 (20q13.32) et soumis à empreinte parentale. Plusieurs produits résultent de ce locus par l'utilisation de plusieurs promoteurs et plusieurs premiers exons avec un set commun d'exons en aval (exons 2 à 13)<sup>17,18</sup> (FIGURE 13).

Le produit majoritaire est la protéine  $G_s\alpha$  générée par le promoteur le plus en aval.

Le promoteur le plus en amont du locus génère le transcrite pour la protéine *NESP55* (*neuroendocrine secretory protein 55*). La partie codante est limitée à son exon 1 spécifique. Le promoteur suivant génère un transcrite encodant une isoforme de  $G_s\alpha$  spécifique du tissu neuroendocrine, *XL $\alpha$ s* (XL pour *extra large*) dont la structure est identique à  $G_s\alpha$  en dehors d'une longue extrémité N-terminale codée par son exon 1 spécifique. *NESP55* et *XL $\alpha$ s* sont soumis à empreinte de manière opposée : *NESP55* n'est exprimé qu'à partir de l'allèle maternel (son promoteur est méthylé sur l'allèle paternel au niveau des îlots CpG) tandis que *XL $\alpha$ s* n'est exprimé qu'à partir de l'allèle paternel (son promoteur est méthylé sur l'allèle maternel). Ces deux protéines sont exprimées majoritairement dans les tissus neuroendocrines. Leurs rôles ne sont pas bien connus mais leur déficit semble avoir peu d'effet chez l'homme (le déficit en *XL $\alpha$ s* chez la souris entraîne un phénotype sévère). Cette région génère également un transcrite anti-sens à partir de l'allèle paternel (*GNAS-AS1*) avec des exons distincts.

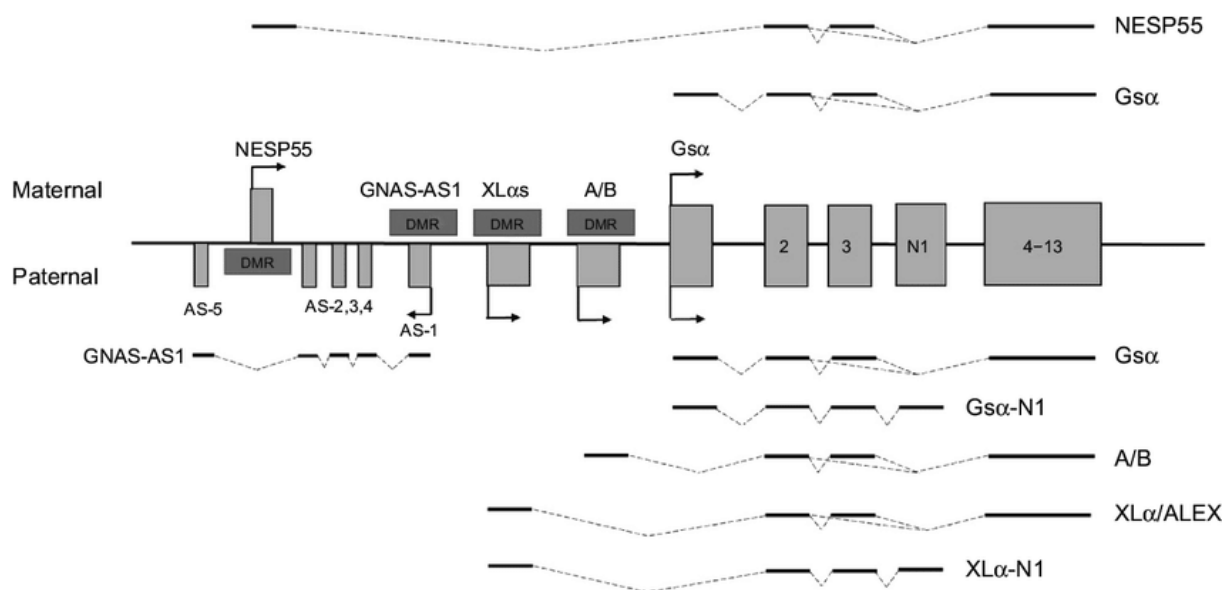
Juste en amont de  $G_s\alpha$ , un autre premier exon donne naissance à un transcrite non traduit A/B (ou 1A) à partir de l'allèle paternel. L'expression de ce transcrite inhibe la transcription de  $G_s\alpha$ .

Il existe également des transcrits courts de  $G_s\alpha$  et de *XL $\alpha$ s* exprimés dans le cerveau utilisant un exon alternatif N1 (on parle de  $G_s\alpha$ N1 et de *XLN1*) et qui se terminent prématurément avant l'exon 4.

Ces différentes empreintes se traduisent par des régions méthylées de manière différentielle sur les deux allèles (*differentially methylated regions* DMR).

Le promoteur de  $G_s\alpha$  est situé à 35 kb en aval du promoteur de  $XL\alpha_s$ .  $G_s\alpha$  est soumis à empreinte parentale de manière tissu-spécifique : il est exprimé majoritairement à partir de l'allèle maternel dans des tissus cibles d'hormones tels que le tubule rénal proximal - principal cible de la PTH -, la thyroïde, l'hypophyse et les ovaires. Dans les autres tissus,  $G_s\alpha$  est exprimé de manière biallélique. Le mécanisme à l'origine de cette expression tissu-spécifique n'est pas connu, d'autant que le promoteur de  $G_s\alpha$  n'est pas une DMR. Weinstein, *et al.* (2004)<sup>17</sup> ont proposé un modèle faisant intervenir deux éléments de régulation : une séquence en *cis* contenue dans la région de l'exon A/B (donc sur le même allèle) à laquelle se lierait, quand elle n'est pas méthylée (sur l'allèle paternel) un facteur *trans* produit uniquement dans certains tissus comme le tubule rénal proximal, aboutissant à l'inhibition de l'expression de  $G_s\alpha$  à partir de l'allèle paternel dans ces tissus. Dans le cas de l'allèle maternel, l'exon A/B étant méthylé, le facteur ne pourrait pas se lier : l'exon A/B n'étant pas transcrit,  $G_s\alpha$  peut être exprimé. Ainsi, dans les tissus ne produisant pas ce facteur, l'expression de  $G_s\alpha$  n'est réprimée sur aucun des deux allèles.

En position centromérique du locus  $GNAS$ , 220 kb en amont, se situe le gène de la Syntaxine 16 ( $STX16$ ). Une délétion récurrente de 4,3 kb de ce gène induit une perte de méthylation de l'exon A/B lorsqu'elle se situe sur l'allèle maternel, réprimant ainsi l'expression de  $G_s\alpha$ . Ce gène  $STX16$  correspond donc probablement à un centre d'empreinte agissant en *cis*<sup>19</sup>.



**FIGURE 13 : SCHEMA DES DIFFERENTS TRANSCRITS DU LOCUS GNAS**

$Gs\alpha$ ,  $XL\alpha$ s et NESP55 sont les principaux transcrits qui produisent les protéines à partir du locus GNAS. GNAS-AS1 est transcrit anti-sens. Tous les transcrits ont un premier exon distinct qui se s'assemble aux exons 2 à 13 communs.  $Gs\alpha$  est biallélique dans la plupart des tissus.  $XL\alpha$ s, A/B et GNAS-AS1 sont limités à l'expression de l'allèle paternel, alors que NESP55 n'est exprimé que par l'allèle maternel. L'empreinte est régulée par des régions méthylées différemment (DMR) dans les promoteurs. L'épissage alternatif conduit à des transcrits neuronaux spécifiques  $Gs\alpha$ -N1 et  $XL\alpha$ s-N1, alors qu'un second cadre de lecture de  $XL\alpha$ s conduit à une protéine appelée ALEX. Les transcrits des allèles maternels et paternels sont représentés en haut et en bas, respectivement. Les lignes en gras indiquent les exons et les lignes en pointillés les introns. D'après Pignolo *et al.* (2015)<sup>20</sup>.

#### **IV. Pathologies liées au locus GNAS**

##### **1) Pathologies liées aux mutations perte de fonction**

Les mutations inactivatrices de  $G_s\alpha$  à l'état hétérozygote sont responsables d'une haploinsuffisance<sup>21</sup>. Le phénotype est celui d'une **ostéodystrophie héréditaire d'Albright** (*Albright's Hereditary Osteodystrophy* ou **AHO**) décrit par Albright F. *et al.*<sup>22</sup> incluant une obésité avec un faciès rond, une racine du nez plate, un cou court, une petite taille, une brachydactylie (FIGURE 14), une anomalie des éruptions dentaires, des ossifications sous-cutanées et un retard mental. La brachydactylie est de type E selon la classification de Bell (1951) et est associée à des épiphyses en cône<sup>23</sup>.



**FIGURE 14 : PHOTOGRAPHIES DE MAINS ET DE PIEDS D'UNE ENFANT DE 3 ANS ET DE SA MERE ATTEINTES D'AHO**

Les deux patientes présentent une brachymétacarpie et une brachymétatarsie globale.

### PHP1A et PHP1C

Lorsque la mutation siège sur l'allèle maternel, les patients présentent également une résistance périphérique à la PTH. Dans le tubule rénal proximal notamment où *GNAS* n'est exprimé que sur cet allèle, la protéine  $G_{s\alpha}$  n'est pratiquement pas présente ou non fonctionnelle. On parle alors de **pseudohypoparathyroïdie de type 1A (PHP1A, MIM#103580)**. Le terme de pseudohypoparathyroïdie réfère au fait que le tableau est celui d'une hypoparathyroïdie avec une hypocalcémie, qui peut être symptomatique, et une hyperphosphatémie. Mais contrairement aux hypoparathyroïdies où il existe un défaut de production de PTH, la PTH est ici sécrétée normalement mais la liaison au récepteur n'entraîne pas de transduction de signal intracellulaire. L'abolition du rétrocontrôle négatif exercé par le calcium peut résulter en un taux de PTH élevé. Même lorsque la PTH est normale, elle est inadaptée (la PTH devrait être basse en cas d'hypocalcémie). L'activité érythrocytaire de  $G_{s\alpha}$  est diminuée.



Dans la PHP1A on retrouve un tableau de résistance hormonale multiple<sup>24</sup>.

La thyroïde étant un des tissus où *GNAS* est soumis à empreinte parentale, il existe une résistance à la thyroïdostimuline (TSH) chez la majorité des patients. Elle se traduit par une élévation de la TSH, souvent précoce et pouvant précéder la résistance à la PTH. Cependant, la T4 bien que diminuée reste la plupart du temps à la limite inférieure de la normale et le patient est rarement symptomatique.

*GNAS* est également soumis à empreinte dans l'hypophyse.

La résistance à la somatolibérine (GHRH) est retrouvée chez les patients PHP1A obèses et peut être responsable d'un retard de croissance staturale.

La résistance partielle aux gonadotrophines (LH et FSH) est commune chez les patients atteints de pseudohypoparathyroïdie, avec notamment une augmentation des taux de FSH. Chez les filles, le développement pubertaire est spontané mais l'âge moyen de début des règles peut être retardé. Près de la moitié des garçons présente une cryptorchidie uni ou bilatérale. Cette résistance peut participer au retard de croissance staturale au moment de la puberté.

Des résistances au glucagon, aux catécholamines, à la calcitonine et à la mélanocortine sont également décrites.

Il existe des patients avec des mutations de  $G_s\alpha$  mais sans diminution de l'activité érythrocytaire de la protéine : on parle de PHP1C (MIM#612462). La mutation ne perturbe pas la capacité de  $G_s\alpha$  à activer l'adénylate cyclase mais concerne la région C-terminale de la protéine correspondant à la région d'interaction avec le récepteur. Il n'existe pas de différence phénotypique entre la PHP1A et 1C.

### PPHP et POH :

Lorsque la mutation siège sur l'allèle paternel, le phénotype est uniquement osseux : il existe une haploinsuffisance globale et  $G_s\alpha$  est exprimée normalement dans les tissus hormono-sensibles, la mutation étant sur l'allèle inactivé. C'est la **pseudopseudohypoparathyroïdie (PPHP, MIM#612463)**. On retrouve ainsi un ta-

bleau d'AHO incomplet, sans obésité ni retard mental. Les patients présentent un retard de croissance intra-utérin (RCIU) et un petit poids de naissance d'autant plus sévères que la mutation se situe sur les exons 2 à 13 de *GNAS*. Des études de souris déficientes en *XL $\alpha$ s* exprimée à partir de l'allèle paternel orientent vers un rôle de cette protéine dans la croissance foétale<sup>25-27</sup>.

L'**hétéroplasie osseuse progressive** (*Progressive Osseous Heteroplasia* ou **POH**, MIM#166350) est une forme sévère d'AHO caractérisée par une ossification hétérotopique sévère progressive intéressant le tissu conjonctif profond et les muscles squelettiques<sup>28</sup>. Les ossifications dermales et sous-cutanées deviennent invasives durant l'enfance, et l'atteinte des tendons, ligaments, fascia peuvent conduire à une ankylose des articulations avec un retard de croissance du membre concerné. Les mêmes mutations que dans les PPHP classiques sont retrouvées dans les POH et le mécanisme sous-jacent est mal connu.

## 2) Pathologies liées à un défaut d'empreinte

Il existe des défauts de méthylation du locus *GNAS*, avec perte de méthylation au niveau des DMR de *1A* (ou *A/B*), de *GNAS-AS1* et de *XL $\alpha$ s* et un gain de méthylation au niveau du DMR de *NESP55*, correspondant à l'état de méthylation de l'allèle paternel. Ces défauts peuvent être partiels ou totaux, et concerner un ou plusieurs DMR.

Lorsqu'ils sont situés sur l'allèle maternel, dans les tissus où l'expression de *G<sub>s</sub> $\alpha$*  est soumise à empreinte, l'exon *1A* n'étant plus méthylé sur les deux allèles (physiologiquement sur l'allèle paternel, du fait du défaut de méthylation sur l'allèle maternel), l'expression de *G<sub>s</sub> $\alpha$*  est réprimée. C'est la **pseudohypoparathyroïdie de type 1B (PHP1B)**, MIM#603233). Le phénotype est donc celui d'une résistance hormonale périphérique sans AHO, l'expression de *G<sub>s</sub> $\alpha$*  dans les tissus non soumis à empreinte n'étant pas affectée.

La plupart des cas de PHP1B sont sporadiques. Une unidisomie paternelle partielle ou totale du chromosome 20 peut être à l'origine du défaut de méthylation.

Dans les autres cas, le mécanisme sous-jacent n'est pas connu. Il n'existe pas de cas de transmission à la descendance d'une PHP1B sporadique.

Dans certains cas, la PHP1B est familiale et héritée sur le mode autosomique dominant (AD-PHP1B). Le phénotype hormonal ne se manifeste que lorsque l'épimutation est transmise par une mère atteinte (épimutation transmise par la grand-mère maternelle) ou conductrice (épimutation transmise par le grand-père maternel). Dans la plupart des cas de PHP1B familiale, la perte de méthylation du DMR de A/B est le seul défaut d'empreinte observé. L'élément causal est une microdélétion dans le gène voisin *STX16*.

**TABLEAU 1 : PATHOLOGIES CAUSEES PAR DES MUTATIONS PERTE DE FONCTIONS GNAS**

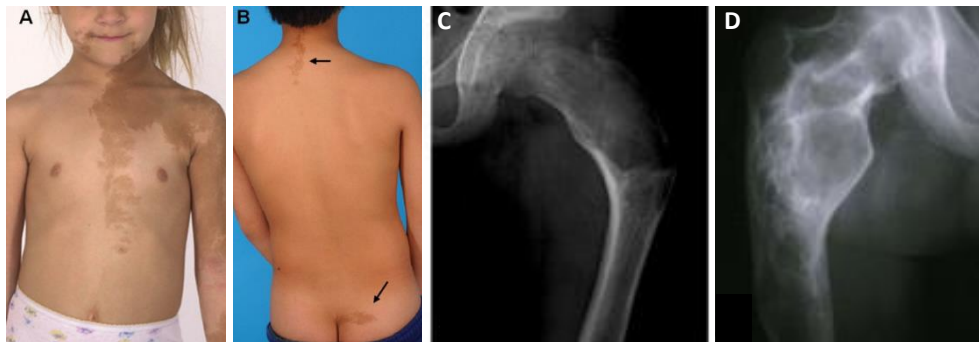
↓ : Expression de *Gsα*, ✨ : Méthylation du promoteur de 1A. D'après Turan *et al.* (2015)<sup>21</sup>.

	Anomalie génétique	Origine parentale	Résistance hormonale	AHO	Activité de $G_s\alpha$ érythrocytaire
<b>PHP1A</b>	Mutation codante	Maternelle	Oui ✘	Oui ✘ ↓	Diminuée
<b>PHP1C</b>	Mutation codante (extrémité 3')	Maternelle	Oui ✘	Oui ✘ ↓	Normale
<b>PPHP/POH</b>	Mutation codante	Paternelle	Non ↓ ✘	Oui ↓ ✘	Diminuée
<b>PHP1B</b>	Microdélétions Défauts d'empreinte	Maternelle	Oui ✘ ✨	Non ↓ ↓	Normale

### 3) Pathologies liées à des mutations gain de fonction

Dans le **syndrome de McCune-Albright (MAS, MIM# 174800)**, des mutations gain de fonction entraînent une activation constitutionnelle de l'activité GTP hydrolase de  $G_s\alpha$  et donc de la voie de signalisation de l'AMP cyclique. Il s'agit de mutations faux-sens concernant les résidus Arg201 et Gln227. De telles mutations germinales seraient incompatibles avec la vie puisqu'aucun patient n'a jamais transmis sa mutation. Ainsi, elles sont retrouvées en mosaïque chez les patients : il s'agit d'événement acquis durant le développement embryonnaire.

Le MAS est caractérisé par une triade clinique : dysplasie fibreuse des os, tâches café au lait, puberté précoce (FIGURE 15). Le phénotype est variable en fonction des tissus atteints. On observe une hyperthyroïdie, un syndrome de Cushing, une acromégalie lors de l'atteinte de la thyroïde, de l'hypophyse et/ou des surrénales.



**FIGURE 15 : ASPECTS CLINIQUES ET RADIOLOGIQUES DU SYNDROME McCUNE-ALBRIGHT**

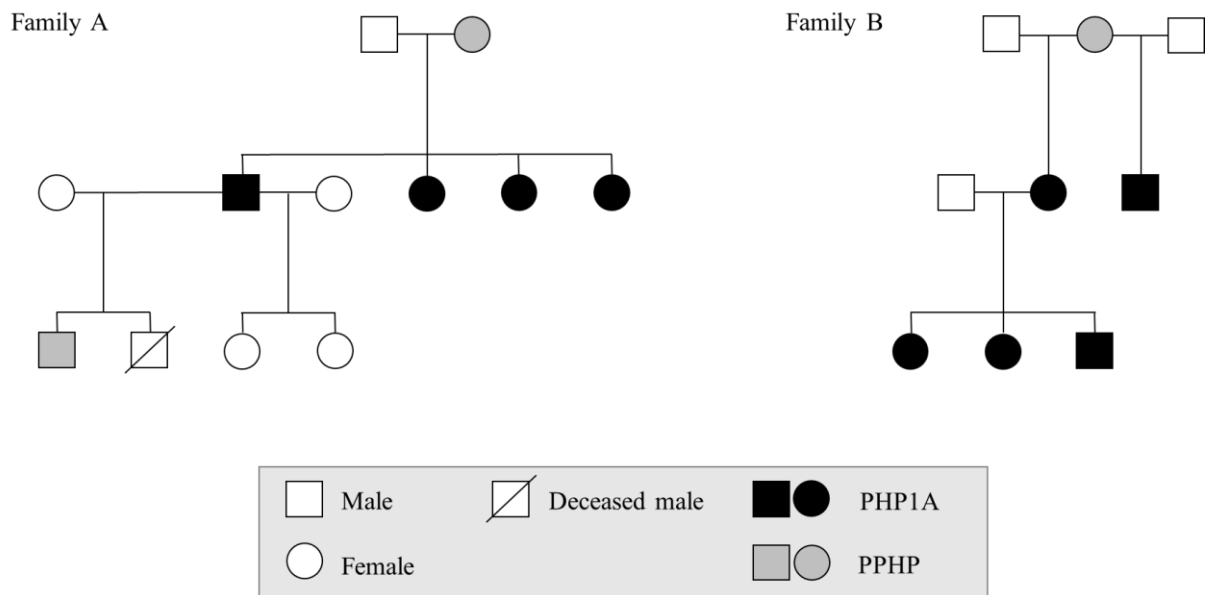
A gauche, pigmentation café-au-lait de la peau. (A) Lésion typique du visage, de la poitrine et du bras d'une fillette de 5 ans respectant la ligne médiane. (B) Les lésions typiques se situent souvent sur la nuque et le pli des fesses. A droite, aspect radiographique de la dysplasie fibreuse. (C) Fémur avec apparence typique en verre dépoli chez un enfant de 10 ans. (D) Fémur chez un adulte de 40 ans non traité ; la dysplasie apparaît plus sclérotique avec le temps. D'après Dumitrescu *et al.* (2008)<sup>29</sup>.

## V. Centre de référence et observations

Les études antérieures relatives aux mutations dans la PHP1A et la PPHP/POH ont mis l'accent sur les corrélations génotype-phénotype<sup>30-38</sup>. Il n'existe cependant pas dans la littérature d'étude s'intéressant de manière systématique à la transmission des allèles mutés de *GNAS*.

En raison de leur mode de transmission singulier, les deux maladies peuvent être observées dans une même famille, mais jamais dans une même fratrie, et l'origine parentale de l'allèle muté peut être déduite du phénotype du patient. Pour rappel, si le patient présente un phénotype de PHP1A (AHO et résistance hormonale), la mutation sera située sur l'allèle maternel, tandis que s'il présente un phénotype de PPHP/POH (AHO sans résistance hormonale), la mutation sera sur l'allèle paternel.

Au sein du laboratoire, plusieurs grandes familles avec une mutation de *GNAS* ont été étudiées, et il a été remarqué que les porteurs de la mutation familiale semblaient représenter une forte proportion des descendants à chaque génération (FIGURE 16).



**FIGURE 16 : ARBRES GENEALOGIQUES DE FAMILLES PHP**

Exemple de deux familles explorées au laboratoire avec de nombreux descendants porteurs d'une mutation de *GNAS*.

Cette observation a été confortée par un nombre plus élevé que prévu de diagnostics prénataux positifs (7 positifs sur 11, voir section Résultats et TABLEAU 2).

Ces données nous ont incités à étudier de manière statistique la transmission des mutations *GNAS* dans notre cohorte de patients.

## **VI. Distorsion du ratio de transmission**

La distorsion du ratio de transmission ou distorsion de transmission allélique (*transmission ratio distortion*, TRD) est définie comme une déviation statistiquement significative de la transmission attendue selon les lois de Mendel qui est de 0,5 pour un allèle sur un autosome, un parent transmettant un de ses deux allèles de manière aléatoire<sup>39</sup>.

Une distorsion du ratio de transmission d'un allèle est fréquemment observée lorsque celui-ci est délétère et entraîne une mort foétale *in utero* par exemple.

A l'opposé, les cas où le ratio est déséquilibré en faveur de l'allèle muté, au détriment de l'allèle sain, ont rarement été décrits, et le ou les mécanismes sous-jacents sont mal connus<sup>40,41</sup>.

## **VII. Objectif**

Dans une étude rétrospective, nous avons étudié la transmission et la distribution des allèles mutés du gène *GNAS* dans un grand nombre de familles PHP1A et PPHP génotypées dans le laboratoire de génétique du CHU de Caen. Nous avons cherché à déterminer si les mutations autosomales causales dans la PHP1A et la PPHP sont transmises selon l'hérédité mendélienne.

# MATERIEL ET METHODES

## I. Cohorte de patients

### 1) Source des données

Cette étude rétrospective porte sur les familles de patients présentant un diagnostic moléculaire de PHP1A ou de PPHP établi dans le Centre de Référence National pour les troubles rares du métabolisme du calcium et du phosphore de Caen.

Les données concernant les patients et leurs familles inclus dans cette étude proviennent des dossiers papiers du service de génétique moléculaire du CHU de Caen ainsi que du logiciel de gestion utilisé par le service de génétique <sup>TD</sup>Genet® (TECHNIDATA).

Les PHP1A ont été différenciées des PPHP à l'aide des informations cliniques fournies par le médecin prescripteur.

Un questionnaire a été envoyé afin de réunir les informations pertinentes qui pourraient manquer (ANNEXE 2). Il comprenait les résultats du dosage du calcium et du phosphate sériques et urinaires, les valeurs de PTH et de TSH, l'activité biologique de la protéine G lorsqu'elle était disponible, la liste des traitements, la taille et le poids de naissance, la taille et le poids actuels et des questions concernant le tableau clinique : visage lunaire, déficit intellectuel, ossifications sous-cutanées. Des radiographies des mains ont également été demandées pour évaluer la présence d'une brachymétopie.

En cas de résistance hormonale (TSH élevée, hypocalcémie, hyperphosphatémie, taux de PTH élevé ou inapproprié) et/ou de transmission maternelle, le diagnostic de PHP1A était posé.

Chez les patients présentant une AHO sans signe de résistance hormonale (TSH et PTH normales, normocalcémie et normophosphatémie sans traitement), des ossifications sous-cutanées ou POH, un RCIU, un faible poids de naissance et/ou lorsque le père était le parent transmetteur, le diagnostic de PPHP était posé.

Les membres de la famille décrits comme asymptomatiques ou pour lesquels les données cliniques, biologiques ou génétiques n'étaient pas disponibles étaient considérés exempts de mutations de *GNAS*.

## 2) Ethique

Tous les individus génotypés – ou leurs parents ou tuteurs légaux dans le cas de mineurs – ont donné leur consentement éclairé par écrit avant les investigations génétiques, conformément à la loi française de bioéthique<sup>a</sup> et à la déclaration d'Hel-sinki<sup>b</sup>.

## 3) Sélection des familles

Seules les familles avec une mutation perte de fonction de *GNAS* identifiée ont été incluses.

Les patients présentant des mutations *de novo* ou sans antécédents familiaux (cas sporadiques) et sans descendance, ainsi que leur famille, ont été exclus, puisqu'il s'agissait d'une analyse de transmission. Les mutations *de novo* étaient définies comme l'absence de la mutation chez les deux parents ou bien chez le parent transmetteur (la mère des patients PHP1A ou le père des patients PPHP).

Les familles les plus petites étaient donc composées d'un parent porteur d'une mutation de *GNAS* et de ses enfants. Les arbres généalogiques plus grands ont été divisés en familles nucléaires, composées d'un parent porteur d'une mutation de *GNAS*, ou porteur obligatoire, et de ses enfants (FIGURE 17).

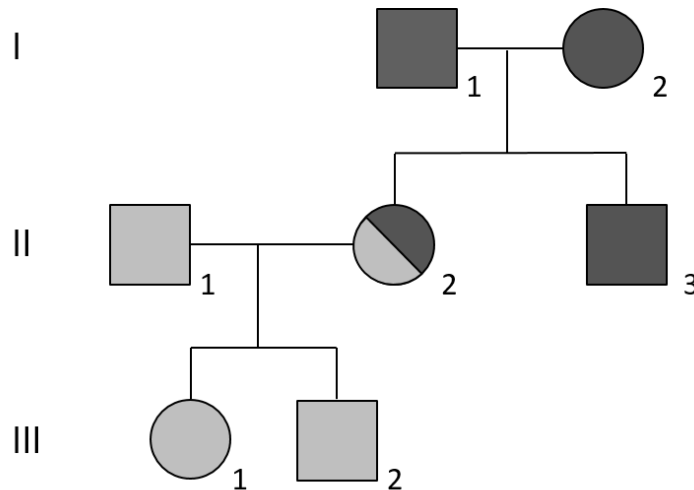
Certains individus ont donc été inclus dans plusieurs familles nucléaires (en tant que descendant dans une, en tant que parent dans l'autre). Ceci n'introduit pas de biais puisque les transmissions d'allèle sont indépendantes à chaque méiose<sup>42</sup>.

---

<sup>a</sup> Loi n°2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique.

<sup>b</sup> Déclaration d'Helsinki de l'Association Médicale Mondiale (AMM ou WMA) amendée – Principes éthiques applicables à la recherche médicale impliquant des êtres humains





**FIGURE 17 : ARBRE GENEALOGIQUE DIVISE EN FAMILLES NUCLEAIRES**

Famille à 3 générations divisée en deux familles nucléaires : gris foncé et gris clair. L'individu II.2 est donc à la fois un des descendants d'une famille nucléaire et le parent transmetteur de l'autre.

## II. Génotypage

Les variations de séquence de *GNAS* ont été nommées selon la nomenclature de l'Human Genome Variation Society (HGVS) à partir du transcrit de référence NM\_8001077488.2 (variant 6). Certains patients ont été génotypés alors que le transcrit de référence était le NM\_000516.6 (variant 1). La différence entre les deux transcrits est la présence d'un codon CAG supplémentaire codant pour une sérine en position 87. Ces anciennes variations ont donc été renommées<sup>43</sup>.

Deux techniques sont disponibles au laboratoire pour séquencer le gène *GNAS*.

### 1) Séquençage massif parallèle ou NGS (Next Generation Sequencing)

Le gène *GNAS* est inclus dans un panel personnalisé AmpliSeq<sup>TM</sup> 44 pour les gènes impliqués dans le métabolisme du calcium et du phosphate séquencés sur un séquenceur Ion Torrent PGM<sup>TM</sup> (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

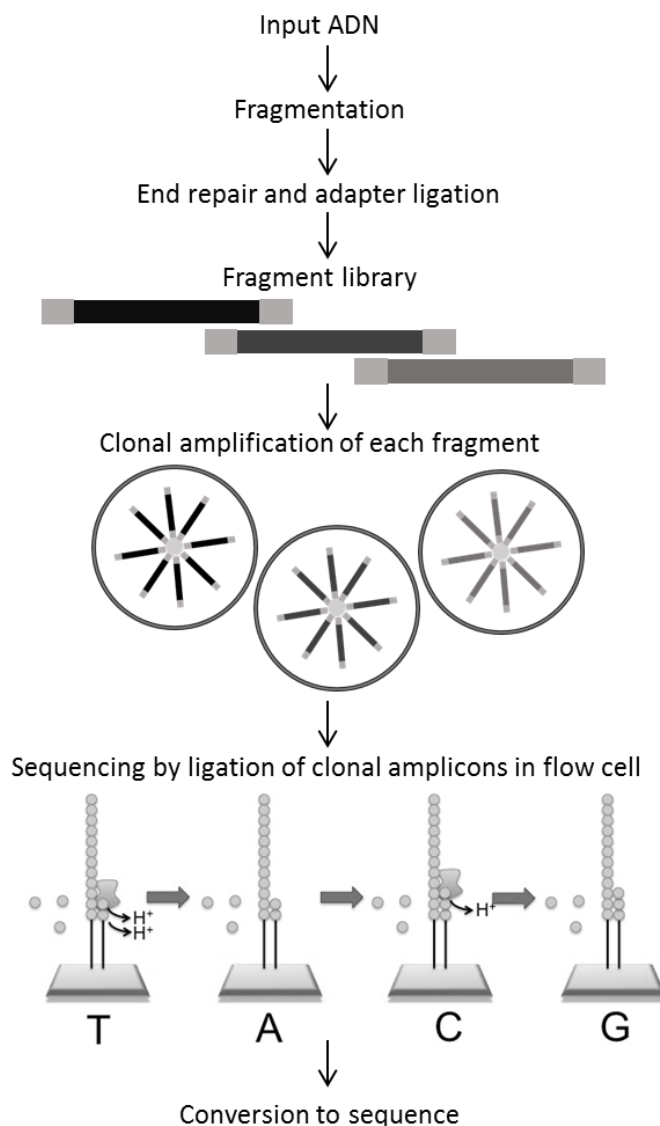
A partir de l'ADN génomique extrait au laboratoire ou envoyé par un laboratoire extérieur, l'enrichissement en séquences cibles est réalisé par multiplex PCR avec des amorces Ion AmpliSeq. Un code barre et deux adaptateurs sont ensuite ajoutés aux extrémités des amplicons. Le code barre permet de « pooler » les patients. Un des adaptateurs est complémentaire de la séquence nucléotidique attachée sur les billes de la PCR en émulsion, l'autre est l'amorce de séquençage. Une étape de PCR permet d'enrichir le milieu en fragments contenant deux adaptateurs différents. Après des étapes de purification, de dosage et de dilution, les bibliothèques sont mises en contact avec les billes de la PCR en émulsion : commence alors une étape d'amplification clonale (FIGURE 18).

Les billes sont ensuite déposées sur une puce Ion 316™. Le taux de chargement est d'environ 70% (amélioré par l'utilisation du système Ion Chef qui permet un chargement automatisé). Environ 60% des puits sont utilisables : il s'agit des puits ne contenant qu'une seule bille sur laquelle un fragment unique d'ADN a été cloné.

Le mode de fonctionnement du PGM repose sur la technologie d'ion semi-conducteur. Il s'agit d'un séquençage par synthèse : les quatre nucléotides sont ajoutés de manière séquentielle. Lorsqu'un nucléotide est incorporé, un proton est libéré et le changement de pH induit est mesuré. Le système peut détecter jusqu'à 7 nucléotides incorporés à la fois (homopolymère).

Pour l'analyse des données bio-informatiques, deux pipelines sont utilisés : Ion Reporter et NextGene.

Le panel ne couvrant pas l'exon 1 de *GNAS*, celui-ci est séquencé par Sanger en cas de panel négatif. De même, les mutations mises en évidence par NGS sont vérifiées sur un second prélèvement indépendant par Sanger.



**FIGURE 18 : ÉTAPES DU PROCESSUS DE SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION POUR LA PLATEFORME ION TORRENT**

L'ADN d'entrée est converti par fragmentation, réparation des extrémités et ligation d'adaptateurs en une bibliothèque de séquençage. Les fragments individuels de la banque sont amplifiés par clonage par une PCR en émulsion. Les billes sont déposées sur une puce. Le séquençage s'effectue par synthèse d'un nouveau brin, l'incorporation d'un nucléotide entraînant la libération d'un proton. Les changements de pH sont détectés et convertis en séquences. D'après Voelkerding et al. (2010)<sup>45</sup>.

## 2) Séquençage par technique conventionnelle ou séquençage Sanger

Les exons 1 à 13 du gène *GNAS*, y compris les jonctions intron/exon, sont analysés par séquençage classique (séquençage Sanger) à l'aide du kit de séquen-

çage cyclique BigDye ® Terminator v.1.1 (Life Technologies) et par séquençage des produits sur un analyseur génétique ABI 3500 (Life Technologies).

En cas de nouvelles variations, la ségrégation avec le phénotype a été étudiée et des scores de prédiction ont été utilisés afin de les interpréter et de les classer comme mutations délétères, conformément aux recommandations de l'American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)<sup>46</sup>.

Toutes les mutations qui n'étaient pas décrites auparavant dans la littérature ont été implémentées dans la base de données Leiden Open Variation Database ([www.lovd.nl/GNAS](http://www.lovd.nl/GNAS)).

### 3) Classification des mutations

Les mutations ont été classées en deux groupes en fonction de leur type et de leur localisation<sup>32,34,47,48</sup>.

- (i) Les mutations sévères : les mutations non-sens, les mutations des sites consensus d'épissage ou prédites comme modifiant l'épissage, et les mutations entraînant un décalage du cadre de lecture ;
- (ii) Les mutations non-sévères : les mutations faux-sens et les insertions et délétions ne décalant pas le cadre de lecture, prédites comme ayant un impact partiel sur l'activité de  $G_s\alpha$ .

## III. Calcul des ratios

Les rapports de distribution des allèles mutés ont été calculés à partir des génotypes observés des descendants de familles nucléaires et comparés aux ratios attendus selon les lois de Mendel.

Pour une maladie à transmission autosomique dominante, 50% des enfants devraient hériter de l'allèle muté, les fréquences de transmission maternelle et paternelle devraient être similaires.

De même, les quatre allèles grand-parentaux devraient être distribués de manière équivalentes avec des ratios proches de 25% pour chaque allèle parmi les petits-enfants. L'origine grand-parentale des allèles mutés pouvait être déterminée dans les familles à trois générations ou plus ainsi que dans les familles à seulement deux générations mais pour lesquelles le phénotype du parent transmetteur était connu : lorsque celui-ci avait une PHP1A, l'allèle délétère était d'origine grand-maternelle, d'origine grand-paternelle dans le cas d'une PPHP.

Le sex ratio (SR) devrait également être équilibré parmi les fratries et entre les frères et les sœurs porteurs de la mutation<sup>49</sup>. Le sex ratio est calculé par le rapport du nombre d'hommes sur le nombre d'hommes et de femmes. Un sex ratio équilibré est donc égal à ou non-significativement différent de 1.

#### **IV. Biais de constatation**

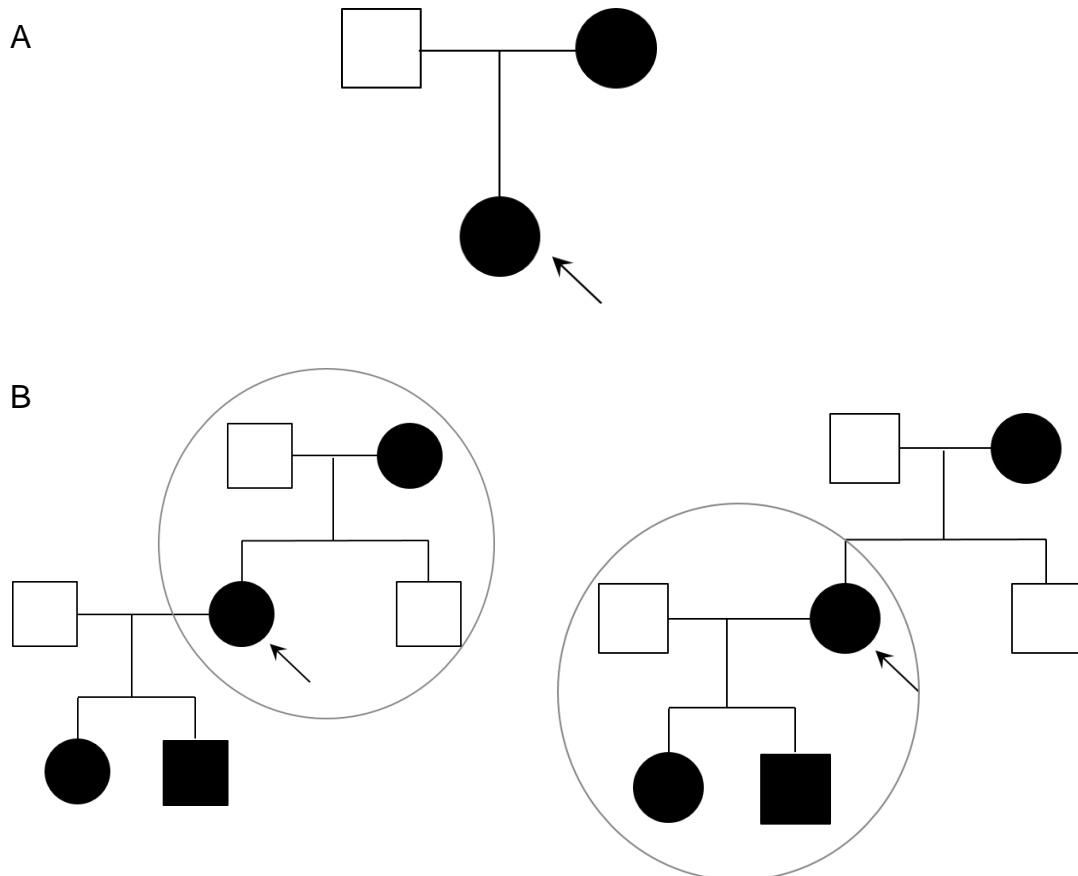
Le déséquilibre de transmission des allèles observé empiriquement dans nos familles pourrait être dû à un biais de recrutement induit par la manière dont sont recueillies les données dans cette étude. Parce que la pseudohypoparathyroïdie est une maladie rare et mal connue avec parfois un phénotype modéré, elle peut n'être reconnue que lorsque plusieurs individus d'une même famille sont atteints en orientant les soignants vers une maladie génétique. Ainsi, dans plusieurs de nos familles, le diagnostic de PHP n'a été fait chez un parent qu'après l'orientation vers un généticien d'un ou plusieurs enfants atteints.

Le risque est donc d'inclure une plus grande proportion de familles avec plusieurs enfants atteints que dans la population générale, et de sous-estimer la proportion de familles avec un seul enfant atteint parmi une fratrie plus large ou avec uniquement des enfants sains.

Afin de corriger ce biais (ascertainment bias), les fratries de descendants comprenant les cas index ont été prises en considération. Dans ce contexte, le cas index qui a été adressé au généticien n'est souvent pas le premier cas de la famille (il y a déjà plusieurs cas dans la famille, le ou les premiers cas étant alors le parent transmetteur ou un frère ou une sœur plus âgé par exemple) avec un risque de su-

restimer le nombre de cas. Le cas index a alors été exclu de l'analyse de transmission.

En pratique, seuls les cas index faisant partie des descendants des familles nucléaires ont été exclus (FIGURE 19). Les descendants des cas index ainsi exclus étaient eux inclus dans l'analyse.



**FIGURE 19 : CORRECTION DU BIAIS DE CONSTATATION**

(A) Le cas index est le seul enfant. C'est un descendant, il est donc exclu de l'analyse, et par là-même toute la famille est exclue.

(B) Une famille à 3 générations. Le cas index fait partie de la deuxième génération et appartient donc à deux familles nucléaires. Dans la première famille nucléaire (gauche), il fait partie de la descendance. Il est donc exclu de l'analyse de transmission. Cette famille est donc considérée comme n'ayant qu'un seul descendant sain. Dans la seconde famille nucléaire (droite), le cas index est le parent transmetteur. L'inclusion de cette famille n'est pas biaisée par le fait qu'un grand nombre de membres sont atteints. Les descendants sont donc tous inclus dans l'analyse, ici deux enfants atteints sur 2.

## V. Analyse statistique

Un z-test à un échantillon a été utilisé afin de comparer les distributions observées aux proportions attendues selon des lois de Mendel. Ce test est un équivalent du test de Chi-deux à un degré de liberté mieux adapté à la comparaison d'un ratio observé à un ratio attendu.

Le logiciel en ligne Epitools<sup>50</sup> a été utilisé pour réaliser les calculs.

Toutes les valeurs de  $P$  étaient bilatérales. Une valeur de  $P$  inférieure à 0,05 a été utilisée pour indiquer une signification statistique.

# RESULTATS

## I. Cohorte de patients

### 1) Effectifs

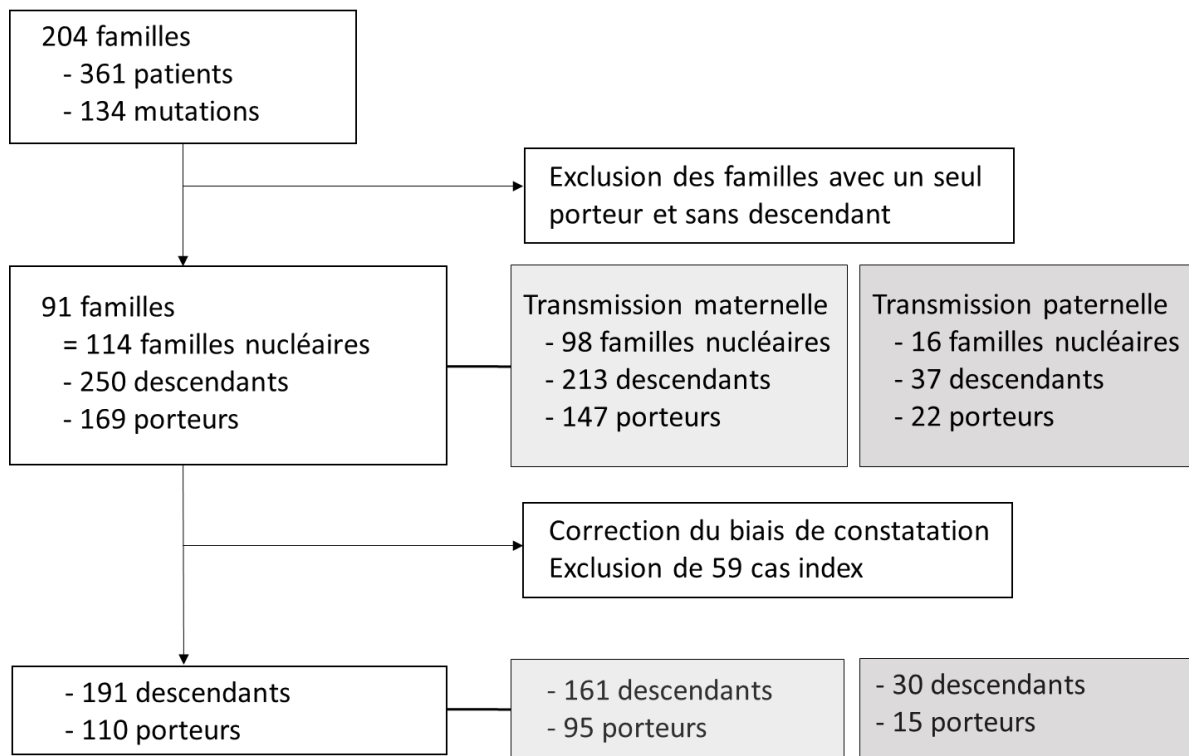
La majorité des patients provenaient de centres français. Quelques patients provenaient d'autres pays européens (Suisse, Belgique, Grèce, République Tchèque) ou du reste du monde (Australie notamment). La plupart des patients étaient d'origine caucasienne.

La population de l'étude comprenait 204 familles non apparentées et 361 patients (FIGURE 20). 113 d'entre eux étaient des cas sporadiques et n'avaient pas de descendance. L'âge moyen de ces 113 patients exclus était de 13,3 ans, l'âge médian de 11 ans.

91 familles ont été incluses dans l'étude de transmission, réparties en 114 familles nucléaires. Parmi ces familles, 385 membres au total ont été génotypés et 247 étaient porteurs de mutations *GNAS*.

Au sein de ces 114 familles nucléaires, 250 descendants ont été identifiés, dont 169 porteurs.





**FIGURE 20 : DIAGRAMME DE FLUX DE L'ANALYSE DE TRANSMISSION**

## 2) Sporadique/familial

Parmi les 204 cas index des 204 familles explorées au laboratoire, les deux parents (ou le parent transmetteur : la mère pour un cas index avec une PHP1A, le père pour une PPHP) ont été génotypés dans 133 cas.

Un parent était positif dans 63 cas, soit 46,3% de formes familiales, dont un parent avec une mosaïque et un parent sans phénotype pathologique.

Dans le cas des PHP1A, la mère était porteuse de la mutation dans 54 cas sur 98 (55,1% de formes familiales).

Dans le cas des PPHP, le père était porteur dans 7 cas sur 35 (20,0%).

### 3) Nombre d'enfants par parent atteint

Le nombre d'enfant par parent atteint était similaire chez les hommes et les femmes : les mères atteintes avaient 2,17 enfants (2,00 pour les mères PHP1A et 2,95 pour les mères PPHP) ; les conjointes d'hommes atteints avaient 2,31 enfants.

*NB* : Le taux de fécondité dans la population française était compris entre 1,89 et 2,03 entre 2000 et 2017 (données World Bank<sup>51</sup>).

### 4) Mutations

134 mutations causales différentes ont été retrouvées. En dehors d'une large délétion emportant les exons 1 et 2 de *GNAS*, il s'agissait de mutations ponctuelles ou de petites délétions et/ou insertions (voir ANNEXE 3).

Concernant les familles incluses dans l'analyse de transmission, sur les 71 mutations observées, 42 ont été classées comme sévères. Treize familles (14%) présentaient la mutation c.568\_571delGACT (p.Asp190Metfs\*14), la mutation perte de fonction *GNAS* la plus fréquente (30 familles dans la population totale)<sup>31,33,36,52</sup>.

### 5) Diagnostic prénatal

Onze diagnostics prénatals (DPN) ont été réalisés au laboratoire de génétique moléculaire. La mère était porteuse de la mutation dans 10 cas sur 11. Dans 7 cas, la mutation familiale a été retrouvée chez le fœtus. Les résultats en fonction du sexe du parent transmetteur et de son phénotype sont détaillés dans le TABLEAU 2. Aucun de ces DPN positifs n'a donné lieu à une demande d'interruption médicale de grossesse.

On peut remarquer que toutes les mères PHP1A ont eu un DPN positif (n=5) alors que toutes les mères PPHP ont eu un DPN négatif (n=4).

**TABEAU 2 : RESULTATS DES DPN**

S : mutation sévère ; NS : mutation non sévère ; +/- : présence ou absence de la mutation familiale chez le fœtus ; Sexe : sexe du parent transmetteur (♂ : homme, ♀ : femme) ; *Phénotype* : phénotype du parent transmetteur ; NA : information non disponible

	Sévérité de la mutation	Sexe	Phénotype	Résultat
1	S	♀	PPHP	-
2	S	♀	PPHP	-
3	S	♀	PPHP	-
4	NS	♀	PHP1A	+
5	NS	♀	PHP1A	+
6	S	♀	PHP1A	+
7	S	♀	NA	+
8	NS	♀	PHP1A	+
9	NS	♀	PPHP	-
10	NS	♀	PHP1A	+
11	NS	♂	PPHP	+

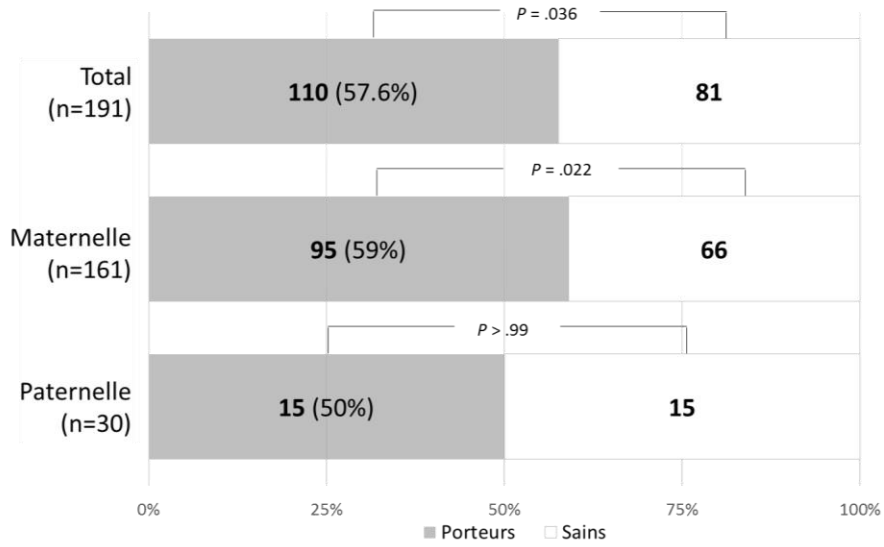
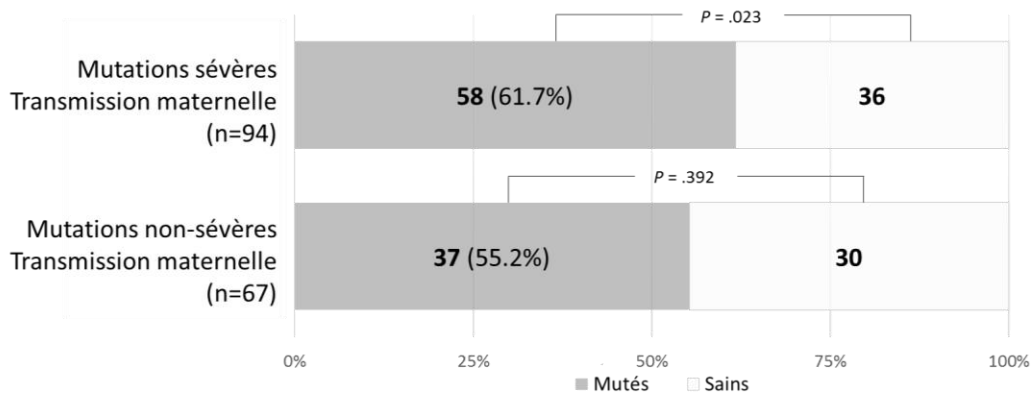
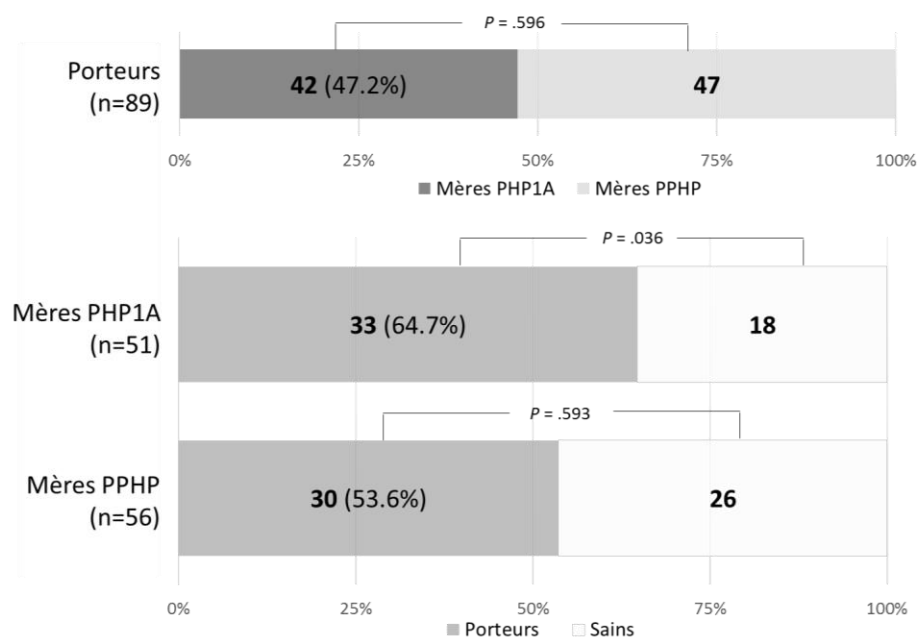
## II. Ratios de transmission

### 1) Transmission maternelle/paternelle

Parmi les 114 familles nucléaires étudiées, 98 étaient des familles à transmission maternelle et 16 à transmission paternelle (86%,  $P < 0,001$ , intervalle de confiance à 95% IC95 [79,6%-92,3%]). L'allèle délétère a été hérité de la mère chez 147 enfants contre 22 du père.

En ce qui concerne les 250 descendants, 169 d'entre eux étaient porteurs d'une mutation de *GNAS*, soit un ratio de 67,6% ( $P > 0,001$ , IC95 [61,8%-73,4%]).

L'élimination du biais de constatation a conduit à l'exclusion de 59 cas index de l'analyse. Parmi les 191 frères et sœurs restants, 110 étaient porteurs, ce qui représente une proportion significativement supérieure à 50% (57,6%,  $P = 0,036$ , IC95 [50,6%-64,6%], FIGURE 21A).

**A****B****C**

## FIGURE 21 : ANALYSE DE TRANSMISSION APRES CORRECTION DU BIAIS

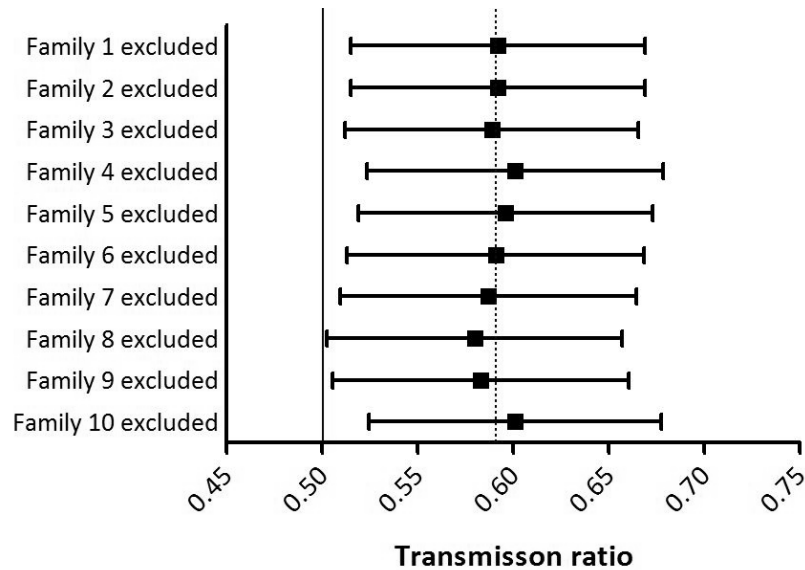
(A) Analyse de la transmission dans toutes les familles nucléaires (haut), dans les familles nucléaires avec transmission maternelle (milieu) et avec transmission paternelle (bas).

(B) Analyse de la transmission dans les familles avec transmission maternelles avec une mutation sévère (haut) et une mutation non-sévère (bas).

(C) Origine grand-parentale de l'allèle muté dans les familles nucléaires avec transmission maternelle (haut) et analyse de la transmission dans les familles nucléaires avec des mères PHP1A (origine grand-maternelle de l'allèle muté, milieu) et des mères PPHP (origine grand-paternelle de l'allèle muté, en bas).

Dans les familles nucléaires à transmission maternelle, la proportion de porteurs était de 69,0% (147 porteurs sur 213 descendants,  $P < 0,001$ , IC95 [62,8%-75,2%]). Après correction du biais de constatation, la proportion était de 59% (95 frères et sœurs sur 161,  $P = 0,022$ , IC95 [51,4%-66,6%]). En revanche, dans les familles nucléaires à transmission paternelle, le ratio était de 50% avec 15 porteurs sur 30 descendants (FIGURE 21A).

Afin de vérifier si ce résultat n'était pas dû à une seule grande famille, une étude de sensibilité a été réalisée : l'analyse de transmission a été répétée en excluant à chaque fois une des familles comprenant deux familles nucléaires ou plus. Les résultats étaient similaires, statistiquement significatifs et avec des IC95 n'incluant pas 50%. Ces résultats ont été représentés sous forme de graphique en forêt (FIGURE 22) : cette analyse correspond à l'analyse de sensibilité effectuée dans les méta-analyses, chaque famille étant l'équivalent d'une étude différente.



**FIGURE 22 : DIAGRAMME EN FORET REPRESENTANT LES RESULTATS DE L'ANALYSE DE SENSIBILITE**

Ligne pleine : ratio de 0,5 ; ligne en pointillée : ratio de 0,59 correspondant au ratio de transmission maternelle après correction du biais ; les moustaches représentent les IC95.

En raison du faible nombre de familles et de descendants présentant une transmission paternelle, les analyses subséquentes de la transmission ont été réalisées soit sur l'ensemble de la population étudiée, soit uniquement sur les familles nucléaires à transmission maternelle.

## 2) Sévérité des mutations

La relation entre distorsion observée et sévérité de la mutation a fait l'objet d'une évaluation.

Les mutations sévères étaient associées à une tendance à la TRD, avec 70 porteurs sur 119 descendants ( $P=0,054$ ). Cette distorsion a atteint une significativité statistique lorsque seules les familles nucléaires à transmission maternelle ont été prises en compte (58 porteurs sur 94 descendants, 61,7%,  $P=0,023$ , IC95 [51,9%-71,5%], FIGURE 21B).

A l'opposé, dans les familles avec une mutation classée comme non sévère, aucun déséquilibre de la transmission n'a été observée, si l'ensemble de la population (40 porteurs sur 72 descendants,  $P=0,346$ ), ou seulement les familles nucléaires avec une transmission maternelle (37 des porteurs sur 67,  $P=0,392$ ) ont été pris en compte (FIGURE 21B).

### 3) Origine grand-parentale des mutations et phénotype du parent transmetteur

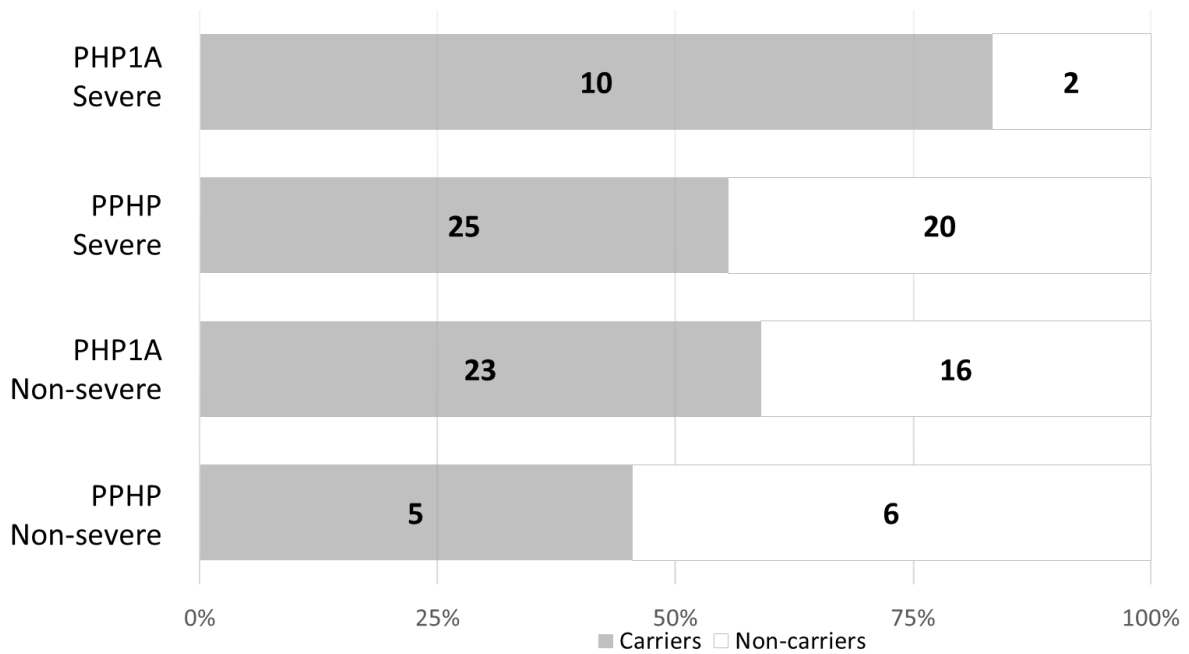
*GNAS* est un locus soumis à empreinte et l'origine grand-parentale des allèles – c'est-à-dire le phénotype parental – pourrait avoir une influence sur la TRD.

Selon les lois de Mendel, les ratios attendus des allèles de chaque grand-parent sont de 0,25. Encore une fois, en raison du faible nombre de transmissions paternelles, seules les familles nucléaires à transmission maternelle ont été incluses et uniquement les allèles transmis par la grand-mère maternelle (**mères avec une PHP1A**) et le grand-père maternel (**mères avec une PPHP**) ont donc été examinés. En conséquence, le ratio attendu est de 0,5.

L'origine grand-parentale de l'allèle délétère était connue (phénotype de la mère connu ou grands-parents génotypés) chez 89 descendants porteurs d'une mutation : 42 provenaient de la grand-mère maternelle, *i.e.* leurs mères avaient une PHP1A, et 47 du grand-père maternel, *i.e.* leurs mères avaient une PPHP ( $P=0,596$ , Figure 21C).

Une analyse de transmission a été effectuée après correction du biais de constatation. Les petits-enfants présentaient un excès d'allèles mutés lorsque ceux-ci provenaient de la grand-mère maternelle (mère PHP1A), avec 64,7% de porteurs (33 descendants sur 51,  $P=0,036$ , IC95 [51,6%-77,8%]). Lorsque l'allèle délétère était d'origine grand-paternelle (mère PPHP), 53,6% étaient porteurs (30 sur 56 descendants,  $P=0,593$ ).

Une distorsion plus importante était également observée chez les mères PHP1A dans les familles avec une mutation sévère de *GNAS* (FIGURE 23). Cependant, à cause de la petite taille des différents groupes, l'analyse statistique n'a pas été réalisée.



**FIGURE 23 : ANALYSE DE TRANSMISSION APRES CORRECTION DU BIAIS EN FONCTION DU PHENOTYPE DU PARENT TRANSMETTEUR ET DE LA SEVERITE DE LA MUTATION**

#### 4) Sex ratio

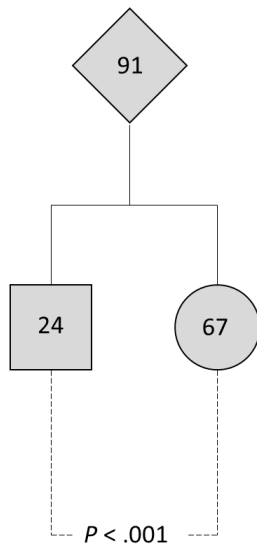
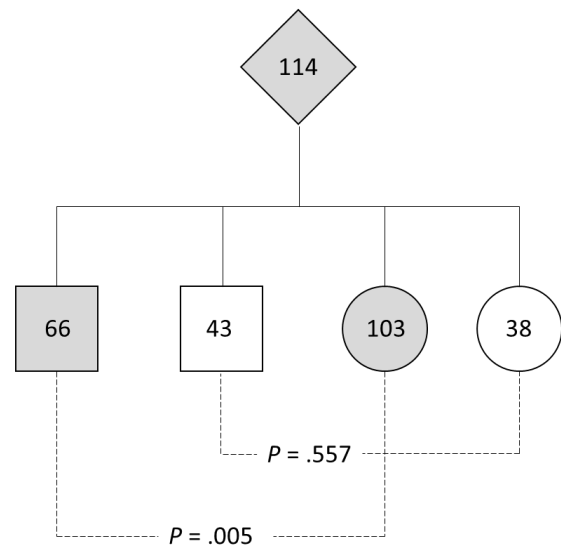
Parmi la population totale de patients avec mutation perte de fonction de *GNAS*, 225 étaient des femmes et 136 des hommes (sex ratio  $SR=0,6$ ,  $P<0,001$ ).

Parmi les familles incluses dans l'analyse de transmission, 141 descendants étaient des femmes et 109 des hommes ( $SR=0,77$ ,  $P=0,043$ ).

Parmi les 91 cas index, 67 étaient des femmes et 24 des hommes ( $P<0,001$ , FIGURE 24A).

Sur les 169 porteurs de mutations des 114 familles nucléaires, 103 étaient des femmes et 66 des hommes ( $SR=0,64$ ,  $P=0,005$ , FIGURE 24B). Les non-porteurs présentaient un SR équilibré avec 38 femmes et 43 hommes ( $RS=1,13$ ,  $P=0,577$ ).



**A****B**

**FIGURE 24 : PREDOMINANCE FEMININE PARMIS LES DESCENDANTS MUTES**

(A) Prédominance féminine parmi les cas index, et (B) parmi les 114 familles nucléaires incluses dans l'analyse de la transmission. Les losanges grisés représentent les parents transmetteurs, les cercles et les carrés grisés les descendants femmes et hommes atteints, les cercles et les carrés blancs les descendants femmes et hommes sains.

## DISCUSSION

Dans cette étude rétrospective la ségrégation des mutations de *GNAS* dans un large groupe de patients PHP1A et PPHP/POH et leurs familles a été analysée afin de déterminer les ratios de transmission des allèles mutés. Un écart statistiquement significatif par rapport aux ratios de transmission attendus selon les lois de Mendel a été mis en évidence, avec une proportion plus élevée d'enfants touchés que prévue. Le déséquilibre de la transmission allélique se produit de manière sexe-spécifique avec un excès de la transmission mère-enfant des allèles mutés non observé chez les pères. La distorsion du ratio de transmission est retrouvée sur trois générations. Au sein de notre cohorte, le sex ratio était déséquilibré en faveur des femmes parmi les malades, ce qui n'était pas le cas des membres indemnes.

### I- Distorsion du ratio de transmission : discussion des résultats

#### 1) Stratégie d'inclusion

Une distorsion du ratio de transmission maternelle a été mise en évidence. Cet effet est significatif malgré le fait qu'il existe un risque d'avoir sous-estimé le nombre de patients PHP1A. En effet, le choix a été fait de considérer comme indemne les descendants pour lesquels il manquait des données cliniques, biologiques ou génotypiques, ou qui étaient décrits comme asymptomatiques. Or, chez les jeunes enfants PHP1A, la brachydactylie et les résistances hormonales peuvent être absentes et ne se développer que plus tard. Cette attitude contraignante a permis d'inclure des familles pour lesquelles des informations étaient manquantes.

## 2) Biais de constatation

Dans la littérature relative aux TRD, un déséquilibre de transmission artificiel a été mis en évidence. En effet, dans le cas de maladies génétiques rares, une famille comptant plusieurs cas serait plus susceptible d'être portée à l'attention des chercheurs ou des médecins et donc d'être incluse dans une étude, avec un risque de surreprésentation des patients et donc de conclusion fallacieuse<sup>53</sup>. Ainsi, pour effectuer l'analyse de la transmission, la réduction de ce biais de constatation a été tentée par l'exclusion des cas index des fratries incluses dans notre étude afin d'éviter de conclure à tort à une distorsion du ratio de transmission<sup>54</sup>.

Une autre source de biais aurait pu être la modification du planning familial après un premier enfant atteint. Cependant, cela ne semble pas être le cas dans notre population. Le nombre d'enfants par parent atteint était proche (voire supérieur) au taux de fertilité en France et ce malgré un grand nombre de familles avec un enfant aîné atteint (dans 80 familles nucléaires sur les 101 pour lesquelles les dates de naissance de tous les frères et sœurs étaient disponibles) et un nombre faible de demande de diagnostic prénatal (seulement 11 en 10 ans), aucun n'ayant débouché sur une demande d'interruption médicale de grossesse. Dans le cas des familles nucléaires avec un enfant unique atteint, 14 sur 28 ont été exclues de l'analyse après correction pour le biais de constatation.

## 3) Transmissions maternelles et paternelles

Il y avait un grand déséquilibre entre les familles nucléaires avec transmission maternelle et les familles avec transmission paternelle dans notre population. Des résultats similaires ont été mis en évidence dans une grande cohorte multicentrique récemment publiée, avec 242 PHP1A et 64 PPHP incluses<sup>47</sup>.

Ce nombre plus élevé de patients atteints de PHP1A est probablement dû à un sous-diagnostic des patients PPHP : l'absence de signes hormonaux ou métaboliques, des symptômes cliniques ou biologiques discrets qui ne sont pas rapportés par les médecins (une brachymétacarpie modérée ou une ossification isolées peu-

vent souvent être ignorées). Ceci a pour conséquence un moindre nombre de familles avec transmission paternelle portées à l'attention d'un généticien<sup>55</sup>.

Ce déséquilibre, se traduisant par un petit nombre de patients descendants de pères atteints, n'a pas permis d'analyser statistiquement le ratio de transmission dans les fratries avec PPHP.

#### 4) Déséquilibre du sex ratio

Une prédominance de femmes atteintes a été observée. Ceci est conforme à la littérature, avec des sex ratios allant de 0,49 à 0,79<sup>33,34,37,47,56</sup>. Un biais de sélection entre hommes et femmes peut a priori être exclu puisque les symptômes de pseudohypoparathyroïdie ne diffèrent pas entre les deux sexes, les ossifications pouvant même être plus communes chez les hommes<sup>34</sup>.

Cette prédominance pourrait être due en partie à un excès de familles nucléaires à transmission maternelle, car plus de mères transmettrices signifie plus de femmes atteintes dans les familles avec mutation de *GNAS*.

#### 5) Fertilité

Fait intéressant : bien que la résistance aux gonadotrophines soit décrite dans la PHP1A, le taux de fécondité ne paraissait pas altéré, le nombre d'enfants par femme étant similaire pour les femmes mutées et les conjointes d'hommes mutés (qui sont donc indemnes).

Cependant, comme il s'agissait d'une étude de transmission, les patients ne pouvant pas avoir d'enfant ne sont pas pris en compte ici.

#### 6) Autres cas dans la littérature

Bien qu'il s'agisse d'un phénomène rare, la TRD a déjà été décrite dans d'autres maladies autosomiques dominantes, telles que le syndrome du QT long<sup>40,57</sup>

et les expansions de triplets<sup>41,58</sup>, mais également dans des maladies récessives<sup>59,60</sup> et liées à l'X<sup>61</sup>.

Les ratios de transmission dans ces études étaient similaires à celui mis en évidence ici : 57% pour le syndrome du QT long<sup>40</sup>, 61% pour la dystrophie myotonique<sup>58</sup>, 60% pour les mutations du gène *ARX*<sup>61</sup>.

## II- Distorsion du ratio de transmission : mécanismes et hypothèses

### 1) Mécanismes biologiques contribuant à la TRD

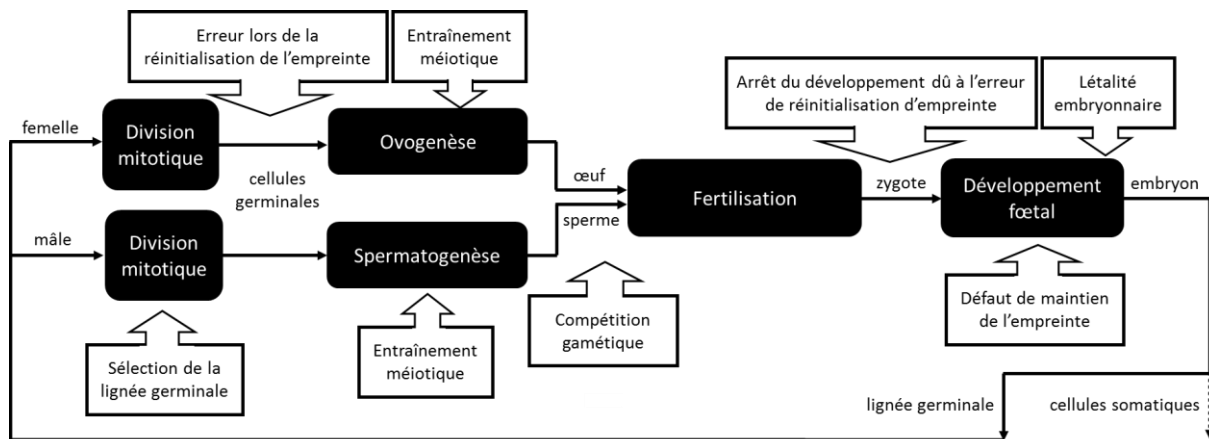
Plusieurs mécanismes biologiques peuvent contribuer à la TRD au cours des différents stades des développements gamétique et embryonnaire et ont été décrits par Huang, *et al.* (2013)<sup>62</sup> (FIGURE 25) :

- Sélection de la lignée germinale
- Entraînement méiotique (*meiotic drive*)
- Compétition gamétique
- Létalité embryonnaire due à un génotype délétère, à un défaut de réinitialisation de l'empreinte ou à un défaut de son maintien

Dans le cas des mutations perte de fonction de *GNAS*, une sélection positive du génotype pathologique a lieu, avec une distorsion du ratio de transmission maternelle en faveur des porteurs de la mutation.

Étant donné que la compétition gamétique pour obtenir une fécondation concerne le sperme et que la létalité des embryons entraîne une sélection négative des génotypes pathologiques, ces deux mécanismes pourraient être exclus ici.

La sélection de la lignée germinale a lieu pendant la mitose des cellules germinales, qui sont sexuellement bipotentielles<sup>63</sup>. La différence de rapports de transmission entre hommes et femmes, avec une TRD maternelle et un ratio de transmission paternel neutre, pourrait donc être plus cohérente avec l'entraînement méiotique de l'ovogenèse<sup>64,65</sup>.



**FIGURE 25 : MECANISMES BIOLOGIQUES CONTRIBUANT A LA TRD**

Sélection de la lignée germinale : au cours de la mitose, des mécanismes tels que la mutation, la recombinaison et la conversion génique, appelés collectivement mécanismes de sélection de la lignée germinale, entraînent la production de cellules germinales présentant certains génotypes dans une proportion plus élevée que d'autres. Par conséquent, les cellules germinales entrant dans la phase de méiose, présentent un rapport de génotype déséquilibré.

Entraînement méiotique : l'ovogenèse étant par nature asymétrique, le gamète fonctionnel ne contient qu'une seule des quatre chromatides, les autres étant éliminées dans les corps polaires. La chromatide de l'haplotype présentant un avantage structurel pour faciliter l'orientation et la réplication au cours de la méiose a tendance à être davantage transmise. Bien que rare, l'entraînement méiotique peut également se produire chez les mâles. Il existe également un entraînement des chromosomes sexuels qui se produit pendant la spermatogenèse, ce qui conduit à une production inégale de gamètes à avec un chromosome X ou Y.

Compétition gamétique : chez certains organismes, les spermatozoïdes peuvent se faire concurrence pour la fécondation. C'est ce qu'on appelle la sélection gamétique. Des modèles bien étudiés de sélection gamétique incluent le système t-haplotype chez la souris et la distorsion de ségrégation chez la drosophile.

Défauts d'empreinte : une erreur de réinitialisation de l'empreinte au stade post-implantatoire peut être incompatible avec la survie de l'embryon. Par ailleurs, un défaut de maintien de l'empreinte peut entraîner un arrêt du développement embryonnaire.

Létalité embryonnaire : après la formation de l'embryon, il existe d'autres mécanismes de sélection. Un exemple est le système rhésus positif où les groupes sanguins de la mère et du fœtus sont incompatibles. Le fœtus meurt pendant l'accouchement, lors de la rupture du placenta ou lors du mélange du sang maternel avec le flux sanguin du fœtus.

D'après Huang *et al.* (2013)<sup>66</sup>.

## 2) Entraînement méiotique de l'ovogenèse

L'entraînement méiotique de l'ovogenèse peut être le résultat de différents processus.

Il peut être dû à l'entraînement chromosomique, au cours duquel une propriété de la structure générale ou de la taille d'un chromosome lui donne un avantage de réplication ou d'orientation sur le fuseau de division méiotique<sup>64</sup>. La plupart des mutations perte de fonction de *GNAS* étant des mutations ponctuelles ou de petites insertions/délétions, il semble peu plausible qu'elles puissent avoir un effet sur la ségrégation du chromosome. L'effet d'un allèle spécifique à un autre locus proche du gène étudié, comme c'est le cas dans les effets fondateurs, pourrait également être écarté car de nombreuses mutations décrites sont des mutations *de novo*, sans aucun lien avec un allèle voisin<sup>65</sup>.

L'entraînement méiotique chez la femme pourrait également être initié par un effet direct ou indirect de la mutation sur la méiose dans les ovocytes. Récemment, les taux d'AMPc et la voie AMPc – PKA ont été impliqués dans la régulation de la méiose chez les mammifères. Il a été montré qu'ils ont un rôle dans les ovocytes et les ovaires, en contrôlant la prophase I, la folliculogenèse primordiale et la division asymétrique<sup>67-70</sup>.  $G_s\alpha$  est exprimé à partir de l'allèle maternel dans les ovaires<sup>71</sup> et, par conséquent, la perturbation de la sous-unité  $G_s\alpha$  par une mutation d'origine maternelle entraîne la perturbation ultérieure de la formation d'AMP cyclique. La TRD statistiquement significative lorsque la mère a un phénotype PHP1A, c'est-à-dire une mutation de *GNAS* sur son allèle maternel, et la TRD maternelle accrue lorsque les mutations sont sévères observés dans notre étude suggèrent un rôle dans la sélection des ovocytes.

D'autres investigations seraient nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes spécifiques impliqués chez l'humain.

### 3) Rôle de l'empreinte

Enfin, on ne peut exclure un effet de l'empreinte. Certaines TRD sont décrites dans des régions soumises à empreinte. Par exemple, dans le syndrome du QT long, une maladie autosomique dominante dans laquelle une TRD spécifique au sexe du parent a été bien caractérisée, le locus principal impliqué (*KCNQ1*) est soumis à empreinte<sup>40,57</sup>.

Le locus *GNAS* a un impact sur la croissance du fœtus, principalement via le transcrit alternatif *XL $\alpha$ s* qui est exclusivement exprimé à partir de l'allèle paternel<sup>72,73</sup>. Lorsque l'embryon hérite de l'allèle muté de son père, un RCIU sévère et un placenta hypotrophique sont observés<sup>25</sup>. A l'inverse, dans la PHP1A, alors que c'est l'allèle maternel qui est biologiquement déficient, *XL $\alpha$ s* pourrait jouer un rôle dans la croissance fœtale et être impliqué dans un effet positif sur le développement embryonnaire.

### 4) Prédominance féminine

Notre étude, avec d'autres dans la littérature, souligne une prédominance féminine dans les pseudohypoparathyroïdies alors que le SR est normal parmi les descendants sains de notre population. La raison pour laquelle plus de femmes que d'hommes sont touchées reste inconnue, mais pourrait suggérer une compétition gamétique au stade de la fécondation entre les spermatozoïdes contenant les chromosomes X ou Y, ou des différences de ségrégation des chromosomes chez le zygote, dans un contexte d'une voie de l'AMP cyclique perturbée<sup>67,74,75</sup>.

## **III- Limites de l'étude**

En raison de sa conception rétrospective, cette étude pourrait être soumise à des biais dans la sélection de la population.



Il est malheureusement impossible d'exclure un biais de constatation résiduel inhérent aux études sur la transmission de maladies génétiques très rares, malgré l'utilisation de méthodes appropriées pour limiter ses effets.

Un protocole qui n'étudierait que les résultats de diagnostic prénatal permettrait de s'affranchir totalement du biais de constatation<sup>76</sup>. Mais nous avons vu que peu de familles choisissent d'effectuer un tel test dans le cadre des pseudohypoparathyroïdies. Ce type d'étude n'est donc pas faisable dans ce cadre-là.

La taille de l'échantillon, l'un des groupes de patients les plus nombreux disponibles dans les centres européens, est toutefois suffisante pour atteindre une signification statistique et la TRD a été observée dans deux ou trois générations.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous avons montré un excès de porteurs d'allèles *GNAS* mutés avec une distorsion du ratio de transmission maternelle, un phénomène rare et mal compris. Cet excès a des implications importantes pour le conseil génétique. Notre étude, avec d'autres dans la littérature, met également en évidence une prédominance féminine.

Nos données suggèrent un rôle de *GNAS* dans la biologie des ovocytes.

L'étude de la méiose féminine et de la maturation de l'ovocyte repose sur l'étude de modèles pour lesquels les gamètes sont plus facilement accessibles, tel que chez les champignons, chez qui les produits de la méiose sont rassemblés, ou encore chez la souris, ou sur l'étude de modèles *in vitro*<sup>77</sup>. Ces derniers présentent malheureusement d'importantes limites puisqu'ils diffèrent des modèles *in vivo* en terme de maturation du follicule<sup>78</sup>, de profil d'expression génique, d'apoptose et de développement embryonnaire précoce<sup>79</sup>.

Chez l'humain, les études génétiques de la méiose féminine ne caractérisent typiquement qu'un seul des produits (l'ovocyte), sans avoir accès aux autres produits (les globules polaires). Ce manque d'information entraîne un manque de compréhension des modes de ségrégation des chromosomes. Des avancées technologiques et techniques ont permis de biopsier les globules polaires et d'ainsi caractériser génétiquement tous les produits de la méiose féminine, révélant des résultats inattendus. Par exemple, l'anomalie de ségrégation la plus fréquente est la méiose inversée où les chromatides sœurs, au lieu des chromosomes homologues, se séparent lors de la première division. Autre exemple dans le cadre de la méiose classique, les chromatides recombinés sont favorisés et ségrégent dans l'ovocyte.

La biologie de l'ovocyte est un champ de recherche complexe. Malgré les limites des systèmes *in vitro* de reproduction humaine et des systèmes *in vivo* chez les animaux, l'étude de ces modèles reste indispensable afin de mieux appréhender les mécanismes sous-jacents pouvant expliquer une distorsion du ratio de transmission.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Zoom sur le chromosome humain. Available at: <https://expertadn.fr/zoom-sur-le-chromosome-humain/>. (Accessed: 12th August 2019)
2. Planet Vie ENS. Available at: <https://planet-vie.ens.fr/content/traits-heritent-transforment>. (Accessed: 7th August 2019)
3. Borel, C. *La traque aux maladies génétiques s'intensifie*. (2017).
4. Centrum Medische Genetica UZ Brussel. Available at: <http://www.brusselsgenetics.be/heredite>. (Accessed: 7th August 2019)
5. Allgrove, J. Physiology of Calcium, Phosphate, Magnesium and Vitamin D. in *Calcium and Bone Disorders in Children and Adolescents* **28**, 7–32 (2015).
6. Kronenberg, H. M. *et al.* Functional analysis of the PTH/PTHrP network of ligands and receptors. *Recent Prog. Horm. Res.* **53**, 283–301 (1998).
7. Wysolmerski, J. J. & Stewart, A. F. The physiology of parathyroid hormone-related protein: An emerging role as a developmental factor. *Annu. Rev. Physiol.* **60**, 431–460 (2002).
8. Simmons, M. A. *Pharmacology : an illustrated review*. (Thieme, 2012).
9. Silve, C. & Jüppner, H. Récepteur PTH/PTHrP et maladies génétiques. *médecine/sciences* **15**, 1310–2 (2013).
10. Lebon, G. & Tate, C. Les récepteurs couplés aux protéines G dans la lumière. *Medecine/Sciences* **28**, 876–882 (2012).
11. Lundstrom, K. An Overview on GPCRs and drug discovery: structure-based drug design and structural biology on GPCRs. *Methods Mol Biol* **552**, 51–66 (2009).
12. Spiegel, A. M. Defects in G protein-coupled signal transduction in human disease. *Annu. Rev. Physiol* **58**, 143–170 (1995).
13. Duc, N. M., Kim, H. R. & Chung, K. Y. Structural mechanism of G protein activation by G protein-coupled receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **763**, 214–222 (2015).
14. Preininger, A. M. & Hamm, H. E. G protein signaling: insights from new structures. *Sci. Signal.* **218**, 1–9 (2004).
15. Yan, K., Gao, L. N., Cui, Y. L., Zhang, Y. & Zhou, X. The cyclic AMP signaling pathway: Exploring targets for successful drug discovery. *Mol. Med. Rep.* **13**, 3715–3723 (2016).
16. Mantovani, G. *et al.* Diagnosis and management of pseudohypoparathyroidism and related disorders: First international Consensus Statement. *Nat. Rev. Endocrinol.* **14**, 476–500 (2018).

17. Weinstein, L. S., Liu, J., Sakamoto, A., Xie, T. & Chen, M. Minireview: GNAS: Normal and abnormal functions. *Endocrinology* **145**, 5459–5464 (2004).
18. Turan, S. & Bastepe, M. The GNAS complex locus and human diseases associated with loss-of-function mutations or epimutations within this imprinted gene. *Horm Res Paediatr* **80**, 229–241 (2013).
19. Richard, N., Abéguilé, G., Coudray, N. & Kottler, M.-L. Épigénétique et pseudohypoparathyroïdies. *Pathol. Biol.* **58**, 367–371 (2010).
20. Pignolo, R. J., Ramaswamy, G., Fong, J. T., Shore, E. M. & Kaplan, F. S. Progressive osseous heteroplasia: Diagnosis, treatment, and prognosis. *Application of Clinical Genetics* **8**, 37–48 (2015).
21. Turan, S. & Bastepe, M. GNAS spectrum of disorders. *Curr. Osteoporos. Rep.* **13**, 146–158 (2015).
22. Albright, F., Burnett, C., Smith, P. & Parson, W. Pseudohypoparathyroidism - an example of 'Seabright' syndrome. *Endocrinology* **30**, 922–932 (1942).
23. Temtamy, S. A. & Aglan, M. S. Brachydactyly. *Orphanet J. Rare Dis.* **3**, 15 (2008).
24. Mantovani, G., Postdoctoral, M. & Spada, A. Mutations in the Gs alpha gene causing hormone resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **20**, 501-513 (2006).
25. Richard, N. *et al.* Paternal GNAS mutations lead to severe intrauterine growth retardation (IUGR) and provide evidence for a role of XLalphas in fetal development. *J Clin Endocrinol Metab* **98**, E1549–E1556 (2013).
26. Xie, T. *et al.* The alternative stimulatory G protein  $\alpha$ -subunit XL $\alpha$ s is a critical regulator of energy and glucose metabolism and sympathetic nerve activity in adult mice. *J. Biol. Chem.* **281**, 18989–18999 (2006).
27. Plagge, A. *et al.* The imprinted signaling protein XL $\alpha$ s is required for postnatal adaptation to feeding. *Nat. Genet.* **36**, 818–826 (2004).
28. Kaplan, F. S. *et al.* Progressive osseous heteroplasia: a distinct developmental disorder of heterotopic ossification. Two new case reports and follow-up of three previously reported cases. *J. bone Jt. Surg.* **76**, 425–36 (1994).
29. Dumitrescu, C. E. & Collins, M. T. McCune-Albright syndrome. *Orphanet J. Rare Dis.* **3**, 12 (2008).
30. Lebrun, M. *et al.* Progressive osseous heteroplasia: A model for the imprinting effects of GNAS inactivating mutations in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **95**, 3028–3038 (2010).
31. Ahrens, W. *et al.* Analysis of the GNAS1 gene in albright's hereditary osteodystrophy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**, 4630–4634 (2001).
32. Thiele, S. *et al.* A positive genotype-phenotype correlation in a large cohort of

- patients with Pseudohypoparathyroidism Type Ia and Pseudo-pseudohypoparathyroidism and 33 newly identified mutations in the GNAS gene. *Mol. Genet. genomic Med.* **3**, 111–20 (2015).
33. Elli, F. M. *et al.* Pseudohypoparathyroidism type Ia and pseudo-pseudohypoparathyroidism: The growing spectrum of GNAS inactivating mutations. *Hum. Mutat.* **34**, 411–416 (2013).
  34. Salemi, P., Skalamera Olson, J. M., Dickson, L. E. & Germain-Lee, E. L. Ossifications in Albright Hereditary Osteodystrophy: role of genotype, inheritance, sex, age, hormonal status, and BMI. *J Clin Endocrinol Metab* **103**, 158–168 (2018).
  35. Weinstein, L. S., Yu, S., Warner, D. R. & Liu, J. Endocrine Manifestations of Stimulatory G Protein  $\alpha$ - Subunit Mutations and the Role of Genomic Imprinting. *Endocr. Rev.* **22**, 675–705 (2001).
  36. Fernández-Rebollo, E. *et al.* Endocrine Profile and Phenotype-(Epi)Genotype Correlation in Spanish Patients with Pseudohypoparathyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, E996–E1006 (2013).
  37. Elli, F. M. *et al.* The prevalence of GNAS deficiency-related diseases in a large cohort of patients characterized by the EuroPHP network. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **101**, 3657–3668 (2016).
  38. Elli, F. M. *et al.* Quantitative Analysis of Methylation Defects and Correlation With Clinical Characteristics in Patients With Pseudohypoparathyroidism Type I and GNAS Epigenetic Alterations. *E508 jcem.endojournals.org J Clin Endocrinol Metab* **99**, 508–517 (2014).
  39. Lyon, M. F. Transmission ratio distortion in mice. *Annu. Rev. Genet* **37**, 393–408 (2003).
  40. Imboden, M. *et al.* Female Predominance and Transmission Distortion in the Long-QT Syndrome. *N. Engl. J. Med.* **355**, 2744–2751 (2006).
  41. Chakraborty, R. *et al.* Segregation distortion of the CTG repeats at the myotonic dystrophy locus. *Am. J. Hum. Genet* **59**, 109–118 (1996).
  42. Bureau, A. & Duchesne, T. On the validity of within-nuclear-family genetic association analysis in samples of extended families. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* **14**, 533–49 (2015).
  43. den Dunnen, J. & Antonarakis, S. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum. Genet.* **109**, 121–124 (2001).
  44. Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0. Available at: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4475345>. (Accessed: 13th August 2019)
  45. Voelkerding, K. V, Dames, S. & Durtschi, J. D. Review Next Generation Sequencing for Clinical Diagnostics-Principles and Application to Targeted Resequencing for Hypertrophic Cardiomyopathy. *J. Mol. Diagnostics* **12**, 539–

- 551 (2010).
46. Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D. & Das, S. ACMG Standards and Guidelines Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants : a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* **17**, 405–424 (2015).
  47. Hanna, P. *et al.* Genetic and epigenetic defects at the GNAS locus lead to distinct patterns of skeletal growth but similar early-onset obesity. *J. Bone Miner. Res.* **33**, 1–9 (2018).
  48. Lemos, M. C. & Thakker, R. V. GNAS Mutations in Pseudohypoparathyroidism Type 1a and Related Disorders. *Hum Mutat* **36**, 11–19 (2015).
  49. Schacherer, J. Beyond the simplicity of Mendelian inheritance. *C. R. Biol.* **339**, 284–288 (2016).
  50. Sergeant, E. S. G. Epitools epidemiological calculators. *Ausvet Pty Ltd* (2018). Available at: <http://epitools.ausvet.com.au>.
  51. Fertility rate, total (births per woman) | Data. Available at: <https://data.worldbank.org/indicator/SP.DYN.TFRT.IN?locations=FR>. (Accessed: 3rd August 2019)
  52. Weinstein, L. S., Gejman, P. V., de Mazancourt, P., American, N. & Spiegel, A. M. A heterozygous 4-bp deletion mutation in the Gsa gene (GNAS1) in a patient with Albright Hereditary Osteodystrophy. *Genomics* **13**, 1319–1321 (1992).
  53. Teague, J. W. *et al.* FRAXA and FRAXE: Evidence against segregation distortion and for an effect of intermediate alleles on learning disability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 719–724 (1998).
  54. Espinosa, C. & Macdonald, A. A correction for ascertainment bias in estimating rates of onset of highly penetrant genetic disorders. *Astin Bull.* **37**, 429–452 (2007).
  55. Kottler, M. L. Mutations paternelles de GNAS: Quels phénotypes? Quel conseil génétique? *Ann. Endocrinol. (Paris)*. **76**, 105–109 (2015).
  56. De Sanctis, L. *et al.* Genetic and epigenetic alterations in the GNAS locus and clinical consequences in pseudohypoparathyroidism: Italian common healthcare pathways adoption. *Ital. J. Pediatr.* **42**, (2016).
  57. Itoh, H. *et al.* Asymmetry of parental origin in long QT syndrome: preferential maternal transmission of KCNQ1 variants linked to channel dysfunction. *Eur. J. Hum. Genet.* **24**, 1160–1166 (2015).
  58. Magee, A. C. & Hughes, A. E. Segregation distortion in myotonic dystrophy. *J. Med. Genet.* **35**, 1045–1046 (1998).
  59. Schollen, E. *et al.* Increased recurrence risk in congenital disorders of

- glycosylation type Ia (CDG-Ia) due to a transmission ratio distortion. *J. Med. Genet.* **41**, 877–880 (2004).
60. Alias, L. *et al.* Evidence of a segregation ratio distortion of SMN1 alleles in spinal muscular atrophy. *Eur. J. Hum. Genet.* **15**, 1090–1093 (2007).
  61. Shoubridge, C. *et al.* Is there a Mendelian transmission ratio distortion of the c.429\_452dup(24bp) polyalanine tract ARX mutation? *Eur. J. Hum. Genet.* **20**, 1311–1314 (2012).
  62. Huang, L. O., Labbe, A. & Infante-Rivard, C. Transmission ratio distortion: Review of concept and implications for genetic association studies. *Hum. Genet.* **132**, 245–263 (2013).
  63. Hastings, I. M. Germline selection: Population genetic aspects of the sexual/asexual life cycle. *Genetics* **129**, 1167–1176 (1991).
  64. Lyttle, T. Cheaters sometimes prosper: distortion of mendelian segregation by meiotic drive. *Trends Genet.* **9**, 205–210 (1993).
  65. Jeffreys, A. J. & Neumann, R. Reciprocal crossover asymmetry and meiotic drive in a human recombination hot spot. *Nat. Genet.* **31**, 267–271 (2002).
  66. Huang, L. O., Labbe, A. & Infante-Rivard, C. Transmission ratio distortion: review of concept and implications for genetic association studies. *Hum. Genet.* **132**, 245–263 (2013).
  67. Chen, D. *et al.* Regulation of asymmetrical cytokinesis by cAMP during meiosis I in mouse oocytes. *PLoS One* **7**, e29735 (2012).
  68. Rose, R. D., Gilchrist, R. B., Kelly, J. M., Thompson, J. G. & Sutton-McDowall, M. L. Regulation of sheep oocyte maturation using cAMP modulators. *Theriogenology* **79**, 142–148 (2013).
  69. Wang, Y. *et al.* Cyclic AMP in oocytes controls meiotic prophase I and primordial folliculogenesis in the perinatal mouse ovary. *Development* **142**, 343–351 (2015).
  70. Conti, M., Hsieh, M., Musa Zamah, A. & Oh, J. S. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Mol. Cell. Endocrinol.* **356**, 65–73 (2012).
  71. Mantovani, G., Ballare, E., Giammona, E., Beck-Peccoz, P. & Spada, A. The Gs $\alpha$  gene: Predominant maternal origin of transcription in human thyroid gland and gonads. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 4736–4740 (2002).
  72. Hayward, B. E., Moran, V., Strain, L. & Bonthron, D. T. Bidirectional imprinting of a single gene: GNAS1 encodes maternally, paternally, and biallelically derived proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 15475–15480 (1998).
  73. Yu, S. *et al.* Variable and tissue-specific hormone resistance in heterotrimeric Gs protein alpha-subunit (Gsa) knockout mice is due to tissue-specific imprinting of the Gsa gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 8715–8720 (1998).

74. Zhang, S., Kaplan, F. S. & Shore, E. M. Different Roles of GNAS and cAMP Signaling During Early and Late Stages of Osteogenic Differentiation. *Horm Metab Res* **44**, 724–731 (2012).
75. Mantovani, G., Spada, A. & Elli, F. M. Pseudohypoparathyroidism and Gs $\alpha$ -cAMP-linked disorders: current view and open issues. *Nat. Rev. Endocrinol.* **12**, 345–354 (2016).
76. Zunz, E., Abeliovich, D., Halpern, G. J., Magal, N. & Shohat, M. Myotonic dystrophy - no evidence for preferential transmission of the mutated allele: A prenatal analysis. *Am. J. Med. Genet.* **127A**, 50–53 (2004).
77. Zanders, S. E. & Malik, H. S. Chromosome segregation: human female meiosis breaks all the rules. *Curr. Biol.* **25**, R654-6 (2015).
78. Cadoret, V. *et al.* Molecular evidence that follicle development is accelerated in vitro compared to in vivo. *Reproduction* **153**, 493–508 (2017).
79. Arias-Álvarez, M. *et al.* In vivo and in vitro maturation of rabbit oocytes differently affects the gene expression profile, mitochondrial distribution, apoptosis and early embryo development. *Reprod. Fertil. Dev.* **29**, 1667 (2017).



## **ANNEXES**

ANNEXE 1 – Article « Maternal transmission ratio distortion of *GNAS* loss-of-function mutations » soumis au *Journal of Bone and Mineral Research* (JBMR).

ANNEXE 2 – Feuille de demande de génotypage de *GNAS*

ANNEXE 3 – Liste des mutations

## **ANNEXE 1 – Article**

### **Maternal transmission ratio distortion of *GNAS* loss-of-function mutations**

Sarah Snanoudj<sup>1</sup>, Arnaud Molin<sup>1</sup>, Cindy Colson<sup>1</sup>, Nadia Coudray<sup>1</sup>, Sylvie Paulien<sup>1</sup>, Hervé Mitre<sup>1</sup>, Marion Gérard<sup>1</sup>, Elise Schaefer<sup>2</sup>, Alice Goldenberg<sup>3</sup>, Justine Bacchetta<sup>4</sup>, Sylvie Odent<sup>5</sup>, Sophie Naudion<sup>6</sup>, Bénédicte Demeer<sup>7</sup>, Laurence Faivre<sup>8</sup>, Nicolas Gruchy<sup>1</sup>, Nicolas Richard<sup>1\*</sup>, Marie-Laure Kottler<sup>1\*</sup>

- 1- Normandie Univ, UNICAEN, CHU de Caen Normandie, Department of Genetics, Reference Center for Rare Diseases of Calcium and Phosphorus Metabolism, EA7450 BioTARGen, Caen, France
- 2- Department of Genetics, CHU de Strasbourg, Strasbourg, France
- 3- Department of Genetics, CHU de Rouen, Rouen, France
- 4- Department of Pediatric Nephrology, Rheumatology and Dermatology, CHU de Lyon, Bron, France
- 5- Department of Genetics, CHU de Rennes, Rennes, France
- 6- Department of Genetics, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France
- 7- Department of Genetics, CHU d'Amiens, Amiens, France
- 8- Department of Genetics, CHU de Dijon, Dijon, France

\* These authors contributed equally to this work.

#### Corresponding author:

Nicolas Richard  
Service de Génétique, Lab. Génétique Moléculaire  
Avenue Georges Clémenceau  
14033 Caen – France  
[richard-n@chu-caen.fr](mailto:richard-n@chu-caen.fr)  
+33231272417

Supplemental data: three supplemental figures (Supplemental Figure S1, S4 and S5) and two supplemental tables (Supplemental Table S2 and S3).

The authors have no conflicts of interest to disclose.

## ABSTRACT

PseudoHypoParathyroidism Type 1A (PHP1A) and PseudoPseudoHypoParathyroidism (PPHP) are two rare autosomal dominant disorders caused by loss-of-function mutations in the imprinted *GNAS* gene, coding  $G_s\alpha$ . PHP1A is caused by mutations in the maternal allele and results in Albright's Hereditary Osteodystrophy (AHO) and hormonal resistance, mainly to the parathormone (PTH), whereas PPHP, with AHO features and no hormonal resistance, is linked to mutations in the paternal allele. This study sought to investigate parental transmission of *GNAS* mutations. We conducted a retrospective study in a population of 204 families with 361 patients harboring *GNAS* mutations. To prevent ascertainment bias towards a higher proportion of affected children due to the way in which data were collected, we excluded from transmission analysis all probands in the ascertained sibships. After bias correction, the distribution ratio of the mutated alleles was calculated from the observed genotypes of the offspring of nuclear families and was compared to the expected ratio of 50% according to Mendelian inheritance (one-sample z-test). Sex ratio, phenotype of the transmitting parent and transmission depending on the severity of the mutation were also analyzed. Transmission analysis was performed in 114 nuclear families and included 250 descendants. The fertility rates were similar between male and female patients. We showed an excess of transmission from mother to offspring of mutated alleles (59%,  $P=0.022$ ), which was greater when the mutations were severe (61.7%,  $P=0.023$ ). Similarly, an excess of transmission was found when the mother had a PHP1A phenotype (64.7%,  $P=0.036$ ). By contrast, a Mendelian distribution was observed when the mutations were paternally inherited. Higher numbers of females within the carriers, but not in non-carriers, were also observed. The mother-specific transmission ratio distortion and the sex ratio imbalance associated to PHP1A point to a role of  $G_s\alpha$  in oocyte biology or embryogenesis, with implications for genetic counselling.

**KEY WORDS:** PHP1A, PPHP, POH, PSEUDOHYPOPARATHYROIDISM; *GNAS*; TRANSMISSION RATIO DISTORTION; MUTATIONS

## INTRODUCTION

Pseudohypoparathyroidism type 1A (PHP1A, MIM #103580) is a rare disorder characterized by hormonal resistance and variable developmental features referred to as Albright's Hereditary Osteodystrophy (AHO):<sup>(1)</sup> a round shaped face, short stature, ectopic ossifications, brachymetacarpia type E, and global developmental delay. PHP1A is caused by heterozygous loss-of-function mutations in the maternal allele of the *GNAS* gene (*Guanine Nucleotide Binding Protein, Alpha Stimulating Activity*).<sup>(2)</sup> *GNAS* encodes the ubiquitous alpha-subunit of a heterotrimeric stimulatory G protein ( $G_s\alpha$ ) that couples many G Protein-Coupled Receptors, including the parathyroid hormone receptor (PTHr1) and TSH receptor, and which stimulates adenylyl cyclase and cyclic AMP (cAMP) formation.<sup>(3)</sup> A related disorder, pseudopseudohypoparathyroidism (PPHP, MIM #612463), is caused by inactivating mutations on the paternal allele of *GNAS*. PPHP is characterized by some, but not all, AHO features, subcutaneous ossification – or Progressive Osseous Heteroplasia (POH) – and intrauterine growth retardation (IUGR) with no hormonal resistance observed.<sup>(4,5)</sup>

Those discrepancies in the phenotype depending on the transmitting parent are explained by a tissue specific imprinting of *GNAS*.<sup>(6,7)</sup> In most tissues, *GNAS* is expressed in a biallelic manner: a loss-of-function mutation leads to haploinsufficiency, causing AHO features. In some endocrine tissues (renal proximal tubules, thyroid, gonads and pituitary gland) *GNAS* is paternally imprinted.<sup>(8)</sup> When the mutation is carried by the maternal allele, there is a partial to complete deficit in  $G_s\alpha$  depending on the severity of the mutation, resulting mainly in PTH resistance with hypocalcemia, hyperphosphatemia, high or ill-adapted PTH, and TSH resistance with hypothyroidism.<sup>(7,9–11)</sup> Previous studies of PHP1A- and PPHP-causing mutations have focused on the correlations between phenotype and genotype, showing a more severe clinical and laboratory phenotype in the case of more deleterious mutations, in relation to the parental inheritance.<sup>(5,11–18)</sup> Because of their singular mode of transmission, the two diseases can be observed in the same family, but never in the same sibship, and the parental origin of the mutated allele can be inferred from the patient's phenotype. In our experience, carriers appear to represent a high proportion of the descendants in large pedigrees (Supplemental Figure S1). In addition, our attention was drawn to a higher number of positive prenatal diagnoses than expected. These data prompted us to study the transmission of *GNAS* mutations in a systematic manner.

In a retrospective study, we investigated the transmission and distribution of the mutated alleles in a large number of families with PHP1A and PPHP, genotyped in our reference center, after correction for ascertainment bias. We aimed to determine whether the autosomal mutations that cause PHP1A and PPHP follow classical Mendelian inheritance and sex ratio.

## MATERIALS AND METHODS

All family members that were genotyped, or the parents or legal guardians in the case of children, gave written informed consent before the genetic investigations, in accordance with the French bioethics laws and the Declaration of Helsinki.

This retrospective study involves pedigrees of patients with a molecular diagnosis of PHP1A or PPHP established in our National Reference Center for rare calcium and phosphate metabolism disorders. Most patients were Caucasian. To differentiate between PHP1A and PPHP, we relied on clinical information provided by the prescribing physician. A questionnaire was sent out in case of relevant information lacking. It included serum and urinary calcium and phosphate levels, PTH and TSH values, biologic activity of the Gs protein where available, treatments, birth weight and length, current height and weight, and inquiries about the clinical presentation: moon face, intellectual deficit, subcutaneous ossifications. Hand X-rays were also requested to evaluate for brachymetacarpia. In case of hormone resistance (elevated TSH, hypocalcemia, hyperphosphatemia, high or inappropriate PTH levels) and/or of maternal transmission, a PHP1A diagnosis was made. When patients exhibited AHO features with no sign of hormone resistance (normal TSH and PTH, normocalcemia and normophosphatemia without treatment), subcutaneous ossifications or POH, IUGR, a low birth weight, and/or when the father was the transmitting parent, a PPHP was diagnosed.

Family members without available DNA who were described as asymptomatic, or for whom clinical data was lacking, were considered free of *GNAS* mutations.

*GNAS* exons 1 to 13 (RefSeq NM\_8001077488.2) including intron/exon boundaries were analyzed by conventional dideoxy sequencing (Sanger sequencing) using the BigDye® Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and application of sequencing products onto an ABI 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies), or by NGS with a custom Ampliseq™ panel for genes involved in calcium and phosphate metabolism covering *GNAS* exons 2 to 13 using an Ion Torrent PGM™ Sequencer (Life Technologies). In case of novel variants, the segregation with the phenotype was studied and prediction scores were used to interpret and classify them as disease causing mutations, according to ACMG guidelines.<sup>(19)</sup>

*GNAS* mutation, variants were classified into two groups according to their type and location. (i) Severe mutations included nonsense mutations, mutations of canonical splicing sites or predicted to modify splicing, and mutations leading to a frameshift; (ii) Non-severe mutations included missense mutations and insertions and deletions within the reading frame predicted to have a milder impact on Gs $\alpha$  function.<sup>(12,14,20,21)</sup>

All mutations that were not previously described in the literature were implemented into the Leiden Open Variation Database ([www.lovd.nl/GNAS](http://www.lovd.nl/GNAS)).

All pedigrees with an identified *GNAS* mutation were included. Pedigrees of patients with *de novo* mutations or with no family history (sporadic cases), and with no offspring were excluded, as it was a transmission analysis. The smallest families were therefore composed of one

parent with a *GNAS* mutation and his or her offspring. The larger pedigrees were divided into nuclear families, consisting of a parent, with a *GNAS* mutation or an obligate carrier, and its offspring.<sup>(22)</sup>

To prevent ascertainment bias towards a higher proportion of affected children due to the way in which data were collected, we excluded from transmission analysis all probands in the ascertained sibships.<sup>(23)</sup> This leads to calculating ratios from analysis of the relatives who are assumed to be ascertained with less bias.

The distribution ratio of the mutated alleles was calculated from the observed genotypes of the offspring of nuclear families and was compared to the expected ratios under Mendel's second law of inheritance. For autosomal dominant inheritance, 50% of children of carriers should inherit the mutated allele, the frequencies of maternal and paternal transmission should be similar, and the sex ratio balanced among the affected siblings.<sup>(24)</sup> Statistically significant departure from the Mendelian inheritance ratio with a preferential transmission of alleles defines transmission ratio distortion (TRD).<sup>(25,26)</sup>

We also evaluated the transmission ratios according to the phenotype of the transmitting parent (PHP1A or PPHP) by looking at 2-generation families where the information was available and at 3-generation families: the transmitted parent was deduced to have a PHP1A phenotype when the deleterious allele was the grand maternal one, PPHP when it was the grand paternal one.<sup>(27)</sup>

For the statistical analysis, we used the one-sample z-test to compare the observed distributions with the expected population proportions under Mendel's laws.<sup>(28)</sup> All *P*-values were two-sided. A *P*-value of less than 0.05 was used to indicate statistical significance.

## RESULTS

The study population comprised 204 unrelated-families with 361 patients carrying 134 different mutations causing PHP1A or PPHP/POH, including a deletion of exons 1 and 2 (Figure 1, Supplemental Table S2). 113 patients presenting as sporadic cases and with no offspring, who were on average 13.3 years old, were excluded. Ninety-one pedigrees were included in the transmission study, divided into 114 nuclear families. A total of 385 family members were genotyped, and 247 were carriers. 250 descendants were identified, including 169 carriers. The number of children per affected parent was similar between male and female patients: *GNAS* mutated mothers had 2.17 children (2.00 for mothers with PHP1A; 2.35 for mothers with PPHP); spouses of *GNAS* mutated fathers had 2.31 children. Eleven prenatal diagnoses were performed, 7 were positive (Supplemental table S3). It should be mentioned that all PHP1A mothers that underwent prenatal diagnosis had a positive result (n=5) whereas all PPHP mothers had a negative one (n=4).

Among the 114 nuclear families studied, 98 were families with a maternal transmission and 16 with a paternal transmission (86.0%,  $P < 0.001$ , 95% CI [79.6%-92.3%]). The deleterious allele was inherited from the mother in 147 children as opposed to 22 from the father.

With regards to the 250 descendants, 169 carried a *GNAS* mutation, with a ratio of 67.6% ( $P < 0.001$ , 95% CI [61.8%-73.4%]). Correction of ascertainment bias led to the exclusion of 59 probands from the analysis (Figure 1). Among the 191 remaining siblings, 110 were carriers, which was a higher proportion than expected (57.6%,  $P = 0.036$ , 95% CI [50.6%-64.6%], Figure 2A).

In nuclear families with maternal transmission, the proportion of carriers was 69.0% (147 out of 213 siblings,  $P < 0.001$ , 95% CI [62.8%-75.2%]). After bias correction the proportion was 59.0% (95 out of 161 siblings,  $P = 0.022$ , 95% CI [51.4%-66.6%], Figure 2A). To verify if this result was not driven by a single large family, we re-analyzed maternal transmission after ascertainment bias correction, after excluding the descendants of one large family (pedigree with more than one nuclear family) after another. We found similar results in each case, with statistical significance and 95% CI that did not include 50% (Supplemental Figure S4). In contrast, in nuclear families with paternal transmission, the ratio was of 50.0% with 15 carriers out of 30 descendants (Figure 2A).

Because of the low number of families and offspring with paternal transmission, further transmission analyses were performed either on the entire study population or on the nuclear families with a maternal transmission.

Out of the 71 observed mutations in the families included in the transmission study, 42 were classified as severe (Supplemental Table S2). Thirteen pedigrees (14.8%) were carrying c.568\_571delGACT mutation (p.Asp190Metfs\*14), the most common loss-of-function *GNAS* mutation.<sup>(11,13,16,29)</sup>

We aimed to evaluate whether the observed distortion depended on the severity of the mutation. Severe mutations were associated with a tendency to TRD, with 70 carriers out of 119 descendants ( $P = 0.054$ ). This distortion reached statistical significance when only nuclear families with a maternal transmission were considered (58 carriers out of 94 descendants, 61.7%,  $P = 0.023$ , 95% CI [51.9%-71.5%], Figure 2B). By contrast, when the mutations were classified as non-severe mutations, no imbalance of transmission was observed, whether the whole population (40 carriers out of 72 descendants,  $P = 0.346$ ), or only the nuclear families with a maternal transmission (37 carriers out of 67,  $P = 0.392$ , Figure 2B) were observed.

*GNAS* is an imprinted locus and phenotypes vary depending on the sex of the transmitting parent. Grandparental origin of alleles could have an influence on TRD. Under Mendel's law, the expected allele ratios from each grandparent are 0.25. Again, because of the low number of paternal transmissions, we only included nuclear families with a maternal transmission, and therefore only looked at alleles transmitted by the maternal grandmother and the maternal grandfather. As a result, the expected ratios were 0.5. The grandparental origin of the deleterious allele was known for 89 descendants with a mutation: 42 were from the maternal grandmother, *i.e.* their mothers had PHP1A, and 47 from the maternal grandfather, *i.e.* their mothers had PPHP ( $P = 0.596$ , Figure 2C). We performed a transmission analysis after correction of ascertainment bias. When the mother had PHP1A, there was an excess of transmission

of the mutated allele with 64.7% of carriers (33 out of 51 descendants,  $P=0.036$ , 95% CI [51.6%-77.8%]). When the mother had PPHP, 53.6% of descendants were carriers (30 out of 56 descendants,  $P=0.593$ ).

A greater distortion was also seen in families with a severe mutation and where the mother has PHP1A, albeit statistical analysis was not performed because of the small size of the groups (Supplemental Figure S5).

In the over whole population of patients, 225 patients were females and 136 were males (Sex Ratio (SR) =0.6,  $P<0,001$ ). Within the families included in the transmission analysis, 141 descendants were females and 109 were males (SR=0.77,  $P=0.043$ ). Among the 91 probands, 67 were women, 24 men ( $P<0.001$ , Figure 3A). Out of the 169 mutation carriers in the 114 nuclear families, 103 were females and 66 males (SR=0.64,  $P=0.005$ , Figure 3B). However, non-carriers showed a balanced SR with 38 females and 43 males (SR=1.13,  $P=0.577$ ).

## DISCUSSION

In this retrospective study, we analyzed the segregation of *GNAS* mutations in a large group of PHP1A and PPHP/POH patients and their families to assess transmission of the mutated allele from parents to offspring. We showed a statistically significant departure from Mendelian transmission ratios with a higher proportion of affected children than expected. The allelic transmission imbalance occurs in a sex-specific manner with an excess of transmission of mutated alleles from mothers to offspring not observed in fathers. The TRD is consistent over three generations. Globally, a higher number of females within the carriers, but not in non-carriers, was observed.

The effect seen in families with a maternal transmission is significant despite the fact that PHP1A patients might have been missed within the sibships, with a risk of underestimating the distortion, as family members for whom clinical, biological or genotypic data lacked were assumed to be free of *GNAS* mutations. In fact, in young children with PHP1A, hormonal resistance and brachymetacarpia can be absent and not develop until later. We chose this stringent conduct in order to be able to include families for which information was missing.

In the literature pertaining to TRD, artificial transmission imbalance has been shown. Indeed, in the case of rare genetic disorders, a family with multiple cases would be more likely to come to the attention of researchers or physician (to be ascertained), and are therefore expected to be overrepresented, with the risk of spurious conclusion.<sup>(30)</sup> Therefore, to perform the transmission analysis, we examined the nuclear families of pedigrees with a *GNAS* mutation after correction for single ascertainment bias.<sup>(23)</sup> By excluding all probands in the ascertained sibships, we corrected for selection bias due to the non-random fashion in which families were included.

Another source of bias could have been an alteration of family planning after having an affected child. This, however, doesn't seem to be the case in our population as the number of children per affected parent was close to the national fertility rate<sup>(31)</sup> despite a high number of



families with a first child affected (80 out of 101 in which all dates of birth were available), and a low number of prenatal diagnoses (only 11 spanning over 10 years) with no termination of pregnancy for medical reason as a result. In the cases of nuclear families with only one affected child at the time of the diagnosis, 14 out of 28 were excluded for the analysis when we corrected for ascertainment bias.

There was a large imbalance between nuclear families with a maternal transmission and families with a paternal one in our population, resulting in PHP1A and PPHP/POH respectively. Similar results were found in a large multicentric cohort recently published, with 242 PHP1A and 64 PPHP patients included.<sup>(20)</sup> Those larger numbers of PHP1A patients are probably due to an underdiagnosis of PPHP patients: the absence of hormonal and metabolic features in PPHP patients, subtle clinical signs or findings that are not considered significant enough to be recorded by a physician (mild brachymetacarpia or an occasional ossification can often be ignored), with less families with a paternal transmission brought to a geneticist's attention.<sup>(4)</sup> This imbalance, with a small number of descendants from fathers with *GNAS* mutations prevented us from statistically analyzing transmission ratios from fathers with *GNAS* mutations to offspring.

Interestingly, while resistance to gonadotropin is described in PHP1A, fertility rates did not seem impaired, with similar rates for mutated women and mutated men. But as this was a transmission study, patients that are unable to have children are not factored in.

We observed a predominance of affected females. This is consistent with the literature, with SR ranging from 0.49 to 0.79.<sup>(13,14,17,20,32)</sup> We can exclude a selection bias between males and females as symptoms do not differ between the two sexes, ossifications may even be more common in males.<sup>(14)</sup> It could be due in part to an excess of nuclear families with a maternal transmission, as more transmitting mothers would mean more affected females in the *GNAS* pedigrees.

Although a rare phenomenon, TRD has already been described in other autosomal dominant disorders such as the long-QT syndrome<sup>(25,33)</sup> and trinucleotide repeat expansions,<sup>(26,34)</sup> but also in recessive,<sup>(35)</sup> and X-linked disorders.<sup>(36)</sup> Similar transmission ratios were found: 57% for the long-QT syndrome,<sup>(25)</sup> 63% for myotonic dystrophy,<sup>(34)</sup> 60% for mutations on the *ARX* gene.<sup>(36)</sup>

Several biological mechanisms can contribute to TRD during the gametic or embryonic development stages and were reviewed by Huang, *et al.* (2013):<sup>(37)</sup> Germline selection, meiotic gametic competition, and embryo lethality due to a deleterious genotype, an imprint resetting error, or a faulty imprint maintenance.

In the case of *GNAS* loss-of-function mutations, a positive selection towards the pathologic genotype occurs, with a maternal transmission ratio distortion towards carriers. Because gametic competition to achieve fertilization concerns sperm, and because embryo lethality results in a negative selection of the pathological genotypes, those two mechanisms could be excluded. Germline selection occurs during mitosis of germ cells, which are sexually bipotential.<sup>(38)</sup> The difference of transmission ratios between males and females, with a maternal TRD

and a neutral paternal transmission ratio, could therefore be more consistent with meiotic drive in oogenesis.<sup>(39,40)</sup>

Female meiotic drive can be the result of different processes. It can be due to chromosomal drive, in which some property of the general structure or size of a chromosome gives it a replication or orientation advantage on the meiotic spindle.<sup>(39)</sup> As most *GNAS* mutations are point mutations or small insertions/deletions, it doesn't seem plausible that they could have any effect on chromosome segregation. A specific allele at another locus close to the studied gene such as in the case of founder effects could be eliminated as many *GNAS* mutations described are *de novo* mutations, and no linkage to a neighboring allele.<sup>(40)</sup>

Female meiotic drive could also be initiated by a direct or indirect effect of the mutation on meiosis in the oocytes. Recently, cAMP levels and the cAMP-protein kinase A (PKA) pathway have been implicated in the regulation of mammalian female meiosis. They were shown to have a role in both the oocytes and the ovaries, by controlling meiotic prophase I, primordial folliculogenesis, and asymmetrical division.<sup>(41-44)</sup> *GNAS* is maternally expressed in the ovaries<sup>(8)</sup> and therefore disruption of the G $\alpha$  protein subunit result in the subsequent perturbation of cAMP formation. The statistically significant TRD when the mother has a PHP1A phenotype, *i.e.* a *GNAS* mutation on her maternal allele and the increased maternal TRD when *GNAS* mutations are severe supported a role in oocytes selection. Further investigations are required to better understand the specific mechanisms in humans.

Lastly, we cannot exclude an imprinting effect. In fact, some TRD are described in imprinted region. For example, in long-QT syndrome, an autosomal dominant disorder where sex-of-parent specific TRD has been well characterized, the main implicated locus *KCNQ1* is imprinted.<sup>(25,33)</sup> *GNAS* locus has an impact on fetal growth mainly through the alternative extra-large transcript XL $\alpha$ s which is exclusively paternally expressed.<sup>(6,7)</sup> When the embryo inherits the mutated allele from its father, severe IUGR and hypotrophic placenta have been observed.<sup>(45)</sup> Conversely, in PHP1A, as the maternal allele is biologically deficient, XL $\alpha$ s could play a role in fetal growth and be involved in a positive effect on embryonic development.

Our study, with others in the literature, points to a female predominance in pseudohypoparathyroidism disorders while the SR is normal when the descendants from the same pedigrees are not affected. The reason why more females than males are affected remains unknown, but could suggest a gametic competition at the fertilization stage between X- and Y-containing spermatozoids, or differences in chromosome segregation in the zygote, in the context of a disrupted cAMP pathway.<sup>(41,46,47)</sup>

Because of its retrospective design, this study could be subjected to bias in population selection. The sample size, one of the largest groups of patients available in European centers, is however sufficient to achieve statistical significance and we observed TRD within two and three generations. We cannot exclude residual ascertainment bias inherent to retrospective transmission studies in rare genetic disorders, despite the use of appropriate methods to limit its effect.

In conclusion, we showed an excess of carriers of mutated *GNAS* alleles with a maternal transmission ratio distortion, which has important implications for genetic counselling. Our data suggest a role of  $G_s\alpha$  in oocyte biology. Our study, with others in the literature, also points to a female predominance in pseudohypoparathyroidism disorders, requiring further investigations.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the patients and their families for their cooperation in this study; we thank the physicians who have contributed to collect DNA samples, and clinical and laboratory data. We thank Charles Shyng, PhD, Paul Fontaine, PhD, and Antoine Resbeut for their help with the drafting of this manuscript, and Jean-Jacques Parienti, MD, PhD for his help with the statistical analysis.

Authors' roles: Study design: NR, MLK and SS. Study conduct: SS. Data collection: NC, CC, MG, ES, AG, JB, SO, SN, BD, LF, HM, NG, SP. Data analysis: SS. Data interpretation: NR, MLK, AM and SS. Drafting manuscript: SS. Revising manuscript content: AM, NR, MLK. Approving final version of manuscript: NR and MLK. SS takes responsibility for the integrity of the data analysis.

## REFERENCES

1. Albright F, Burnett C, Smith P, Parson W. Pseudohypoparathyroidism - an example of "Seabright" syndrome. *Endocrinology*. 1942;30:922–32.
2. Spiegel AM. Albright's Hereditary Osteodystrophy and Defective G Proteins. *N. Engl. J. Med.* 1990 May 17;322(20):1461–2.
3. Spiegel AM, Weinstein LS. Inherited diseases involving G proteins and G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Med.* 2004;55:27–39.
4. Kottler ML. Mutations paternelles de GNAS: Quels phénotypes? Quel conseil génétique? *Ann. Endocrinol.* 2015;76(2):105–9.
5. Lebrun M, Richard N, Abeguilé G, et al. Progressive osseous heteroplasia: A model for the imprinting effects of GNAS inactivating mutations in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2010;95(6):3028–38.
6. Hayward BE, Moran V, Strain L, Bonthron DT. Bidirectional imprinting of a single gene: GNAS1 encodes maternally, paternally, and biallelically derived proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998;95(26):15475–80.
7. Yu S, Yu D, Lee E, et al. Variable and tissue-specific hormone resistance in heterotrimeric Gs protein alpha-subunit (Gsa) knockout mice is due to tissue-specific imprinting of the Gsa gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998;95:8715–20.
8. Mantovani G, Ballare E, Giammona E, Beck-Peccoz P, Spada A. The Gs $\alpha$  gene: Predominant maternal origin of transcription in human thyroid gland and gonads. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002;87(10):4736–40.
9. Levine MA, Downs RW, Arnold Moses MM, et al. Resistance to multiple hormones in patients with pseudohypoparathyroidism. *Am. J. Med.* 1983;74:545–56.
10. Linglart A, Carel JC, Garabédian M, Tran LC, Mallet E, Kottler ML. GNAS1 Lesions in Pseudohypoparathyroidism Ia and Ic: Genotype Phenotype Relationship and Evidence of the Maternal Transmission of the Hormonal Resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002;87(1):189–97.
11. Ahrens W, Hiort O, Staedt P, Kirschner T, Marschke C, Kruse AK. Analysis of the GNAS1 gene in Albright's Hereditary Osteodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:4630–4.
12. Thiele S, Werner R, Grötzinger J, et al. A positive genotype-phenotype correlation in a large cohort of patients with Pseudohypoparathyroidism Type Ia and Pseudopseudohypoparathyroidism and 33 newly identified mutations in the GNAS gene. *Mol. Genet. genomic Med.* 2015 Mar;3(2):111–20.

13. Elli FM, DeSanctis L, Ceoloni B, et al. Pseudohypoparathyroidism type Ia and pseudo-pseudohypoparathyroidism: The growing spectrum of GNAS inactivating mutations. *Hum. Mutat.* 2013;34(3):411–6.
14. Salemi P, Skalamera Olson JM, Dickson LE, Germain-Lee EL. Ossifications in Albright Hereditary Osteodystrophy: role of genotype, inheritance, sex, age, hormonal status, and BMI. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(1):158–68.
15. Weinstein LS, Yu S, Warner DR, Liu J. Endocrine Manifestations of Stimulatory G Protein  $\alpha$ - Subunit Mutations and the Role of Genomic Imprinting. *Endocr. Rev.* 2001;22(5):675–705.
16. Fernández-Rebollo E, Lecumberri B, Gaztambide S, Martinez-Indart L, Perez De Nanclares G, Castaño L. Endocrine Profile and Phenotype-(Epi)Genotype Correlation in Spanish Patients with Pseudohypoparathyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013;98(5):E996–1006.
17. Elli FM, Linglart A, Garin I, et al. The prevalence of GNAS deficiency-related diseases in a large cohort of patients characterized by the EuroPHP Network. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2016;101(10):3657–68.
18. Elli FM, De Sanctis L, Bollati V, et al. Quantitative Analysis of Methylation Defects and Correlation With Clinical Characteristics in Patients With Pseudohypoparathyroidism Type I and GNAS Epigenetic Alterations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(3):508–17.
19. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S. ACMG Standards and Guidelines Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants : a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* 2015;17(5):405–24.
20. Hanna P, Grybek V, Perez de Nanclares G, et al. Genetic and epigenetic defects at the GNAS locus lead to distinct patterns of skeletal growth but similar early-onset obesity. *J. Bone Miner. Res.* 2018;33:1–9.
21. Lemos MC, Thakker R V. GNAS Mutations in Pseudohypoparathyroidism Type 1a and Related Disorders. *Hum Mutat.* 2015;36:11–9.
22. Bureau A, Duchesne T. On the validity of within-nuclear-family genetic association analysis in samples of extended families. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* 2015 Jan 1;14(6):533–49.
23. Espinosa C, Macdonald A. A correction for ascertainment bias in estimating rates of onset of highly penetrant genetic disorders. *Astin Bull.* 2007;37(02):429–52.
24. Schacherer J. Beyond the simplicity of Mendelian inheritance. *C. R. Biol.* 2016 Jul;339(7–8):284–8.

25. Imboden M, Swan H, Denjoy I, et al. Female Predominance and Transmission Distortion in the Long-QT Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2006;355(26):2744–51.
26. Chakraborty R, Stivers DN, Deka R, Yu LM, Shriver MD, Ferreli RE. Segregation distortion of the CTG repeats at the myotonic dystrophy locus. *Am. J. Hum. Genet.* 1996;59:109–18.
27. Editorial: The Stimulatory G Protein  $\alpha$ -Subunit Gene: Mutations and Imprinting Lead to Complex Phenotypes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001;86(10):4622–6.
28. Sergeant ESG. Epitools epidemiological calculators. Ausvet Pty Ltd. 2018. Available from: <http://epitools.ausvet.com.au>
29. Weinstein LS, Gejman P V., de Mazancourt P, American N, Spiegel AM. A heterozygous 4-bp deletion mutation in the  $Gs\alpha$  gene (GNAS1) in a patient with Albright Hereditary Osteodystrophy. *Genomics.* 1992;13(4):1319–21.
30. Teague JW, Morton NE, Dennis NR, et al. FRAXA and FRAXE: Evidence against segregation distortion and for an effect of intermediate alleles on learning disability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998;95:719–724.
31. Fertility rate, total (births per woman) Available from : <https://data.worldbank.org/indicator/SP.DYN.TFRT.IN?locations=FR>
32. De Sanctis L, Giachero F, Mantovani G, et al. Genetic and epigenetic alterations in the GNAS locus and clinical consequences in pseudohypoparathyroidism: Italian common healthcare pathways adoption. *Ital. J. Pediatr.* 2016;42(101).
33. Itoh H, Berthet M, Fressart V, et al. Asymmetry of parental origin in long QT syndrome: preferential maternal transmission of KCNQ1 variants linked to channel dysfunction. *Eur. J. Hum. Genet.* 2015;24(10):1160–6.
34. Magee AC, Hughes AE. Segregation distortion in myotonic dystrophy. *J. Med. Genet.* 1998;35:1045–6.
35. Schollen E, Kjaergaard S, Martinsson T, et al. Increased recurrence risk in congenital disorders of glycosylation type Ia (CDG-Ia) due to a transmission ratio distortion. *J. Med. Genet.* 2004;41(11):877–80.
36. Shoubridge C, Gardner A, Schwartz CE, Hackett A, Field M, Gecz J. Is there a Mendelian transmission ratio distortion of the c.429\_452dup(24bp) polyalanine tract ARX mutation? *Eur. J. Hum. Genet.* 2012;20(10):1311–4.
37. Huang LO, Labbe A, Infante-Rivard C. Transmission ratio distortion: review of concept and implications for genetic association studies. *Hum. Genet.* 2013;132(3):245–63.
38. Hastings IM. Germline selection: Population genetic aspects of the sexual/asexual life cycle. *Genetics.* 1991;129(4):1167–76.

39. Lyttle T. Cheaters sometimes prosper: distortion of mendelian segregation by meiotic drive. *Trends Genet.* 1993;9(6):205–10.
40. Jeffreys AJ, Neumann R. Reciprocal crossover asymmetry and meiotic drive in a human recombination hot spot. *Nat. Genet.* 2002;31(3):267–71.
41. Chen D, Zhang Y, Yi Q, et al. Regulation of asymmetrical cytokinesis by cAMP during meiosis I in mouse oocytes. *PLoS One.* 2012;7(1):e29735.
42. Rose RD, Gilchrist RB, Kelly JM, Thompson JG, Sutton-McDowall ML. Regulation of sheep oocyte maturation using cAMP modulators. *Theriogenology.* 2013;79(1):142–8.
43. Wang Y, Teng Z, Li G, et al. Cyclic AMP in oocytes controls meiotic prophase I and primordial folliculogenesis in the perinatal mouse ovary. *Development.* 2015;142:343–51.
44. Conti M, Hsieh M, Musa Zamah A, Oh JS. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2012;356(1–2):65–73.
45. Richard N, Molin A, Coudray N, Rault-Guillaume P, Jüppner H, Kottler ML. Paternal GNAS mutations lead to severe intrauterine growth retardation (IUGR) and provide evidence for a role of XL $\alpha$ s in fetal development. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(9):E1549–E1556.
46. Zhang S, Kaplan FS, Shore EM. Different Roles of GNAS and cAMP Signaling During Early and Late Stages of Osteogenic Differentiation. *Horm Metab Res.* 2012;44(10):724–31.
47. Mantovani G, Spada A, Elli FM. Pseudohypoparathyroidism and Gs $\alpha$ -cAMP-linked disorders: current view and open issues. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2016;12(6):345–54.

## FIGURE LEGENDS

**FIGURE 1** Selection of nuclear families for the transmission analysis.

**FIGURE 2** Transmission analysis after correction of ascertainment bias. **(A)** Transmission analysis in all nuclear families (top), in nuclear families with a maternal transmission (middle) and with a paternal transmission (bottom). **(B)** Transmission analysis in maternal nuclear families with a severe mutation (top) and a non-severe mutation (bottom). **(C)** Grandparental origin of mutated alleles in nuclear families with a maternal transmission (top) and transmission analysis in nuclear families with a PHP1A mother (middle) and a PPHP mother (bottom).

**FIGURE 3** Female predominance among mutated descendants **(A)** among the probands and **(B)** in the 114 nuclear families included in the transmission analysis. Shaded diamonds represent parental carriers of *GNAS* mutations, shaded circles female and shaded squares male descendants who are carriers, white circles female and white squares male descendants who are non-carriers.

**SUPPLEMENTAL FIGURE S1** Family pedigrees showing a high proportion of affected descendants in the case of maternal transmission. Shaded diamonds represent parental carriers of *GNAS* mutations, shaded circles female and shaded squares male offspring who are carriers, white circles female and white squares male offspring who are non-carriers.

**SUPPLEMENTAL TABLE S2** List of *GNAS* mutations at the coding DNA and protein levels (reference sequence: NM\_001077488.2). In bold are the mutations found in families included in the transmission analysis. *X/spl/fs*: Nonsense, splicing, frameshift mutations; *del/ins*: deletion/insertion without frameshift; *M*: missense mutations.

**SUPPLEMENTAL TABLE S3** Results of prenatal diagnoses in our reference center, including the severity of the mutation in the family and the sex and the phenotype of the transmitting parent. *S*: Severe mutation; *NS*: Non-severe mutation; *F/M*: sex of the transmitting parent; *NA*: not available.

**SUPPLEMENTAL FIGURE S4** Forest diagram representing the results of the maternal transmission analysis after ascertainment bias correction and after excluding the descendants of one large family (pedigree with multiple nuclear families) in turn. The whiskers represent the 95% CI. The solid line represents the expected ratio of 50%, the dotted line the ratio of 59% found in the overall analysis.

**SUPPLEMENTAL FIGURE S5** Transmission analysis after correction of ascertainment bias depending on the phenotype of the transmitting parent (PHP1A or PPHP) and the severity of the mutation.



FIGURE 1

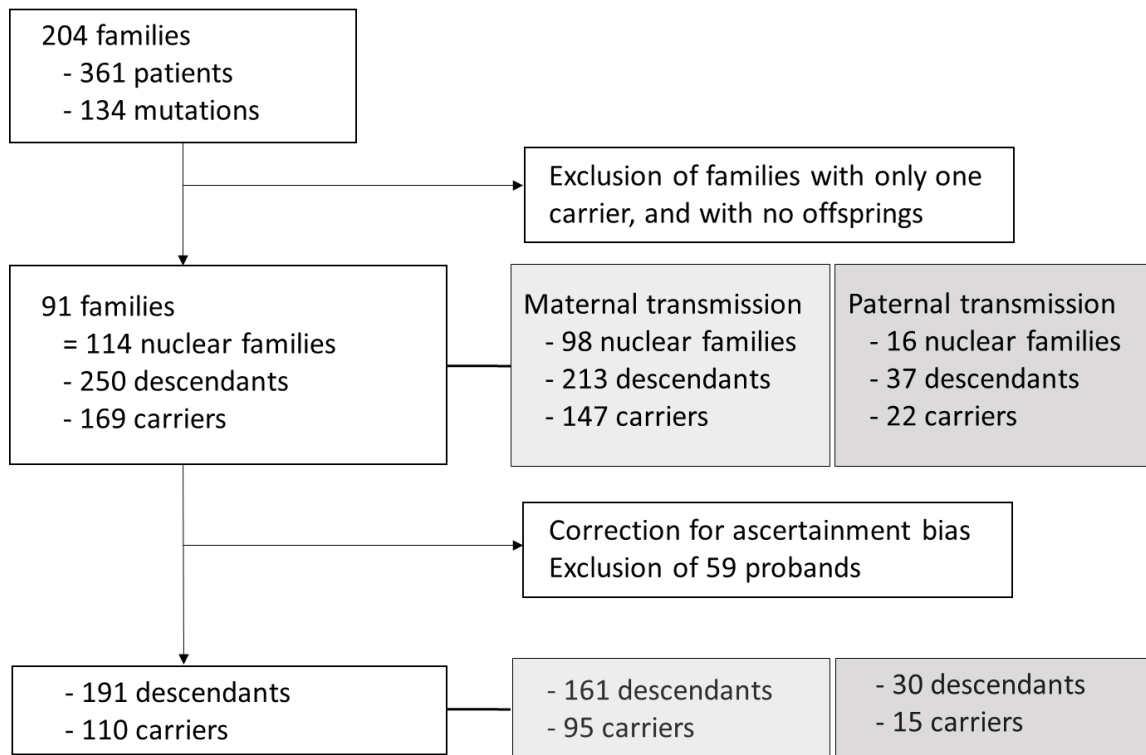
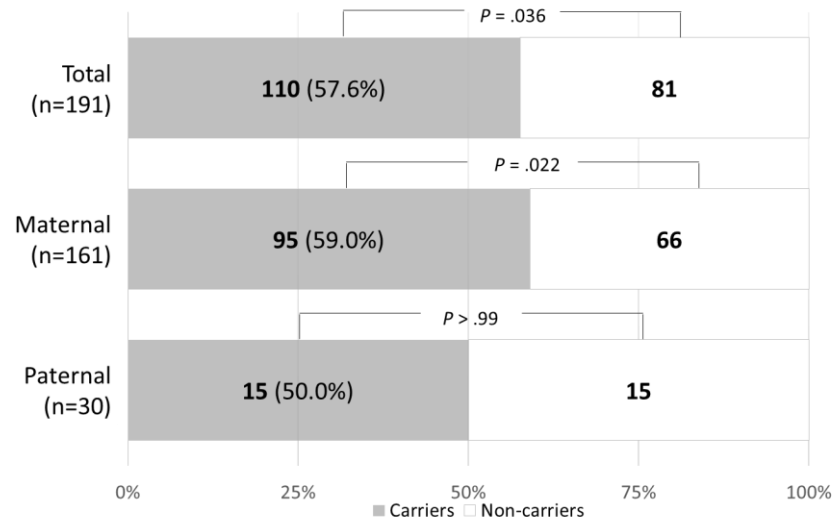
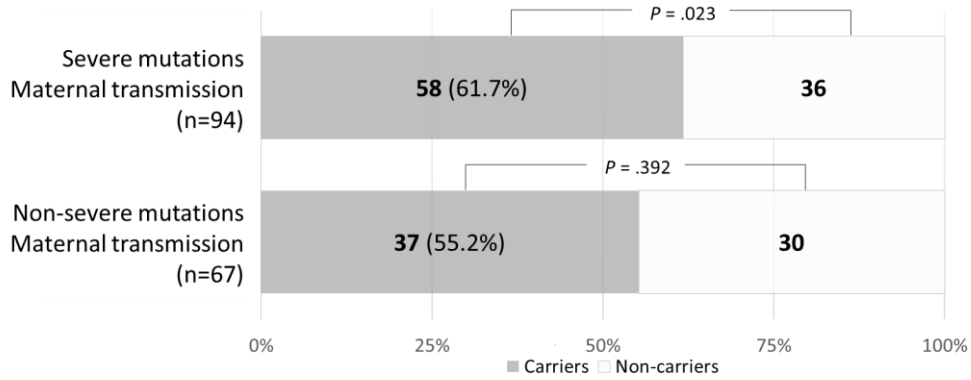


FIGURE 2 A



B



C

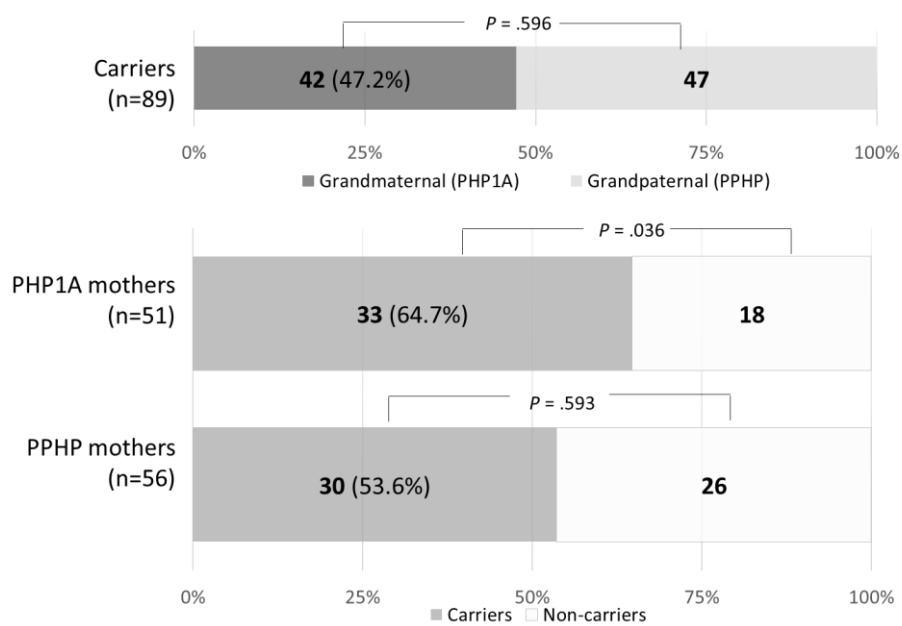
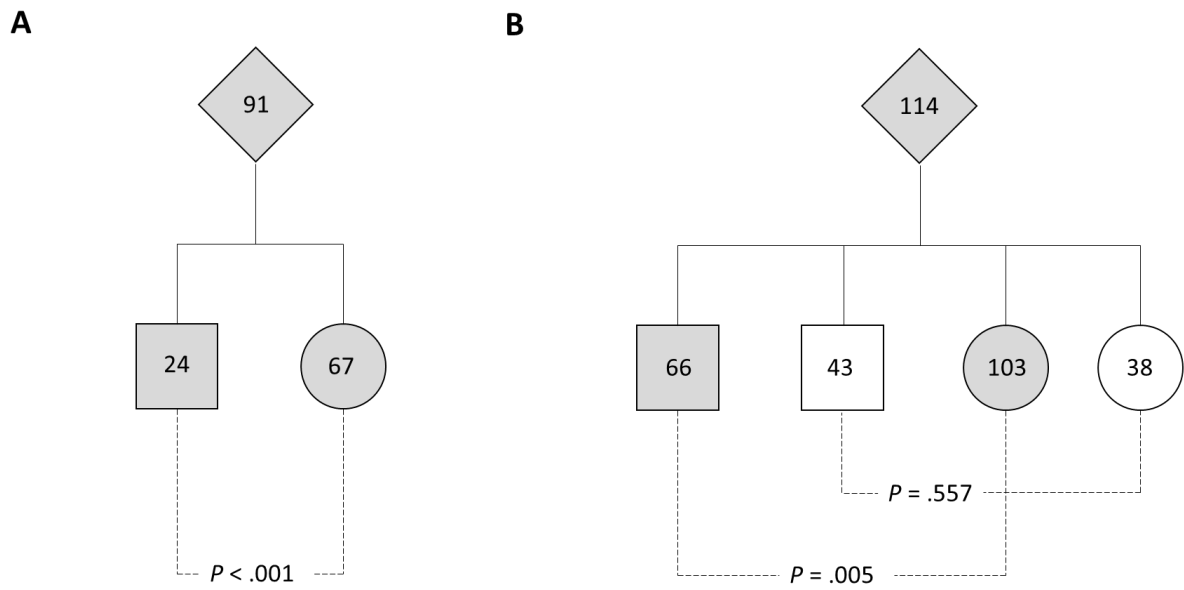
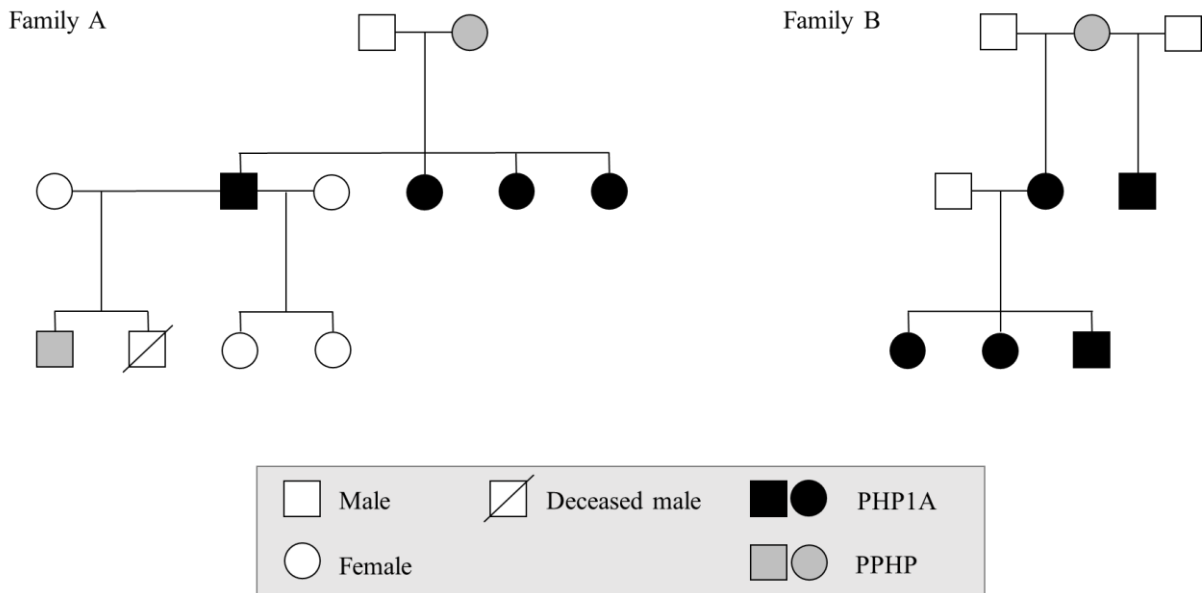


FIGURE 3



SUPPLEMENTAL FIGURE S1

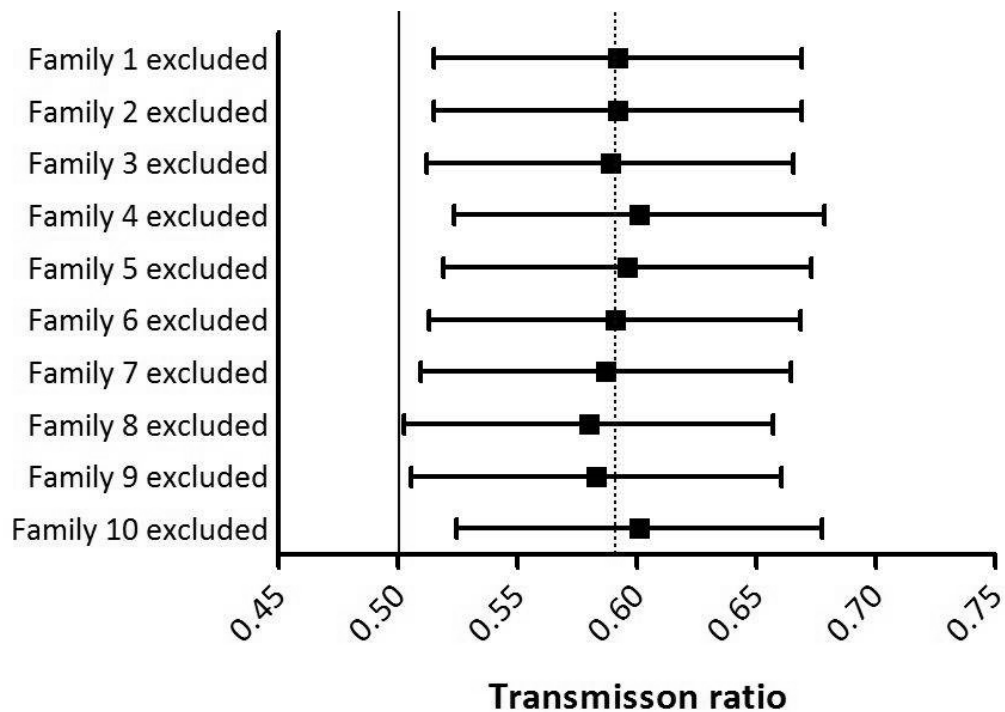


SUPPLEMENTAL TABLE S2 [voir annexe 3]

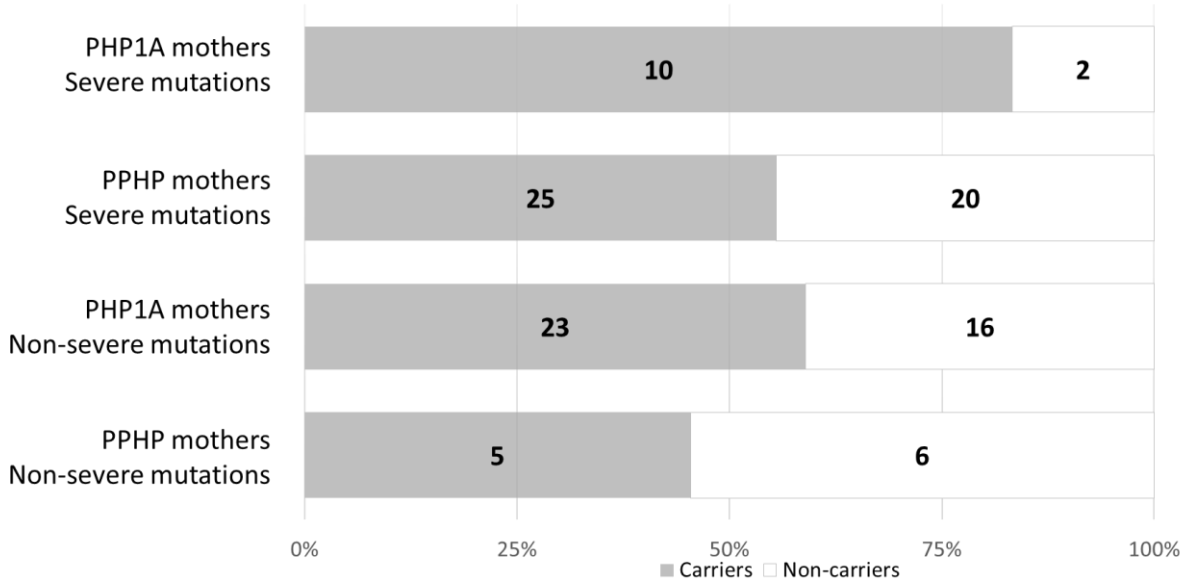
SUPPLEMENTAL TABLE S3

	Severity of mutation	Sex	Phenotype	Result
1	S	F	PPHP	-
2	S	F	PPHP	-
3	S	F	PPHP	-
4	NS	F	PHP1A	+
5	NS	F	PHP1A	+
6	S	F	PHP1A	+
7	S	F	NA	+
8	NS	F	PHP1A	+
9	NS	F	PPHP	-
10	NS	F	PHP1A	+
11	NS	M	PPHP	+

SUPPLEMENTARY FIGURE S4



SUPPLEMENTARY FIGURE S5



## ANNEXE 2 – Feuille de demande de génotypage de GNAS

**CHU**Caen

**CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE CAEN**  
Avenue G. Clemenceau – 14032 CAEN CEDEX  
**POLE DE BIOLOGIE - SERVICE DE GENETIQUE** – Chef de Service : Pr.M.L. KOTTLER  
**LABORATOIRE DE GENETIQUE MOLECULAIRE** (Tél. : 02 31 27 24 17 - Fax : 02 31 27 26 58)  
M.L. KOTTLER (PU-PH) - H. MITTRE (MCU-PH) - N. RICHARD (PH)

*Centre de référence des maladies du métabolisme du calcium et du phosphore*

N° IEP : NOM DU PATIENT : Nom de Naissance : Prénom : Date de Naissance :                      Sexe : <input type="radio"/> M <input type="radio"/> F  Adresse : ..... ..... N° S.S. : Nom de l'Assuré : Adresse de la Caisse : ..... .....	NOM DU MEDECIN                      SIGNATURE  UF demandeur :  Hôpital :  Service :  Tél :
--	--

PRELEVEMENT			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>sur EDTA (tubes à bouchon violet)</i></li> <li>- <i>10 ml de sang pour un adulte, 5 ml pour un enfant</i></li> <li>- <i>étiqueter chacun des tubes</i></li> <li>- <i>bien agiter après le prélèvement</i></li> </ul>	Conserver à température ambiante <i>Envoi à température ambiante, en début de semaine</i>  Délai d'acheminement : 72 heures maximum		
Date de prélèvement :	Heure :	Préleveur :	Lieu :
Incidents (remarques) :			
Réception du prélèvement dans le laboratoire le : __/__/____ à __h__min			

### ETUDE DU LOCUS GNAS<sub>1</sub>

- |                                    |                              |
|------------------------------------|------------------------------|
| - Pseudohypoparathyroïdie 1a       | - Pseudohypoparathyroïdie 1b |
| - Hétéroplasie progressive osseuse |                              |

**Formulaire à faire remplir par le médecin prescripteur et à joindre à tout prélèvement, obligatoirement accompagné du consentement du patient et d'une copie de l'attestation de consultation. L'analyse ne pourra être réalisée sans ces documents.**

<b>Biologie</b> Calcémie :                      Calcicurie : Phosphorémie :              Phosphaturie : PTH : Test à la PTH exogène :                      :	<b>Thyroïde</b> TSH : T 4 libre : Calcitonine :	<b>Fonction gonadotrope</b> LH :                      Activité biologique de la protéine Gs : FSH :  Vitamine D :
<b>Données cliniques et paracliniques</b> Poids (exprimé en déviation standard) :                      Taille :                      BMI : Faciès arrondi : <input type="radio"/> OUI <input type="radio"/> NON                      Retard mental : <input type="radio"/> OUI <input type="radio"/> NON Brachymétabolisme : <input type="radio"/> OUI <input type="radio"/> NON                      Autres signes cliniques : Calcifications sous cutanées : <input type="radio"/> OUI <input type="radio"/> NON		
<b>Arbre généalogique si antécédents familiaux</b>		<b>Origine Ethno-géographique :</b>

### ANNEXE 3 – Liste des mutations

Liste des mutations de *GNAS* au niveau de l'ADN codant et au niveau protéique (transcrit de référence : NM\_001077488.2).  
*X/spl/fs* : mutations non-sens, d'épissage (*splicing*), avec décalage du cadre de lecture (frameshift) ; *del/ins* : délétions/insertions sans décalage du cadre de lecture ; *M* : mutations faux-sens (*missense*) ; *F* : familiales ; *S* : sporadiques

Mutation		Récurrences	Type de mutation	F/S	Localisation
c.	p.				
c.-?_212+?del	p.?	1	X/spl/fs	S	Exon 1-Intron 2
c.-9_-1dup	p.(0?)	1	X/spl/fs	S	Exon 1
c.-4_2delCGCCAT	p.(0?)	1	X/spl/fs	F	Exon 1
c.1A>G	p.?	2	X/spl/fs	F	Exon 1
c.8G>A	p.(Cys3Tyr)	1	M	S	Exon 1
c.14_18delinsT	p.(Gly5Valfs*52)	1	X/spl/fs	S	Exon 1
c.28G>T	p.(Glu10*)	1	X/spl/fs	F	Exon 1
c.34C>T	p.(Gln12*)	1	X/spl/fs	S	Exon 1
c.43G>T	p.(Glu15*)	1	X/spl/fs	S	Exon 1
c.55C>T	p.(Gln19*)	1	X/spl/fs	F	Exon 1
c.69del	p.(Asn23Lysfs*35)	1	X/spl/fs	F	Exon 1
c.70A>T	p.(Lys24*)	1	X/spl/fs	F	Exon 1
c.74del	p.(Lys25Argfs*33)	1	X/spl/fs	F	Exon 1
c.85C>T	p.(Gln29*)	3	X/spl/fs	S	Exon 1
c.89T>C	p.(Leu30Pro)	1	M	F	Exon 1
c.94_96del	p.(Lys32del)	1	del/ins	S	Exon 1
c.100A>T	p.(Lys34*)	1	X/spl/fs	S	Exon 1
c.103C>T	p.(Gln35*)	4	X/spl/fs	F/S	Exon 1
c.113G>C	p.(Arg38Pro)	2	M	F/S	Exon 1

<b>c.122A&gt;G</b>	p.(His41Arg)	1	M	S	Exon 1
<b>c.124C&gt;T</b>	p.(Arg42Cys)	1	M	S	Exon 1
<b>c.125G&gt;A</b>	p.(Arg42His)	1	M	F	Exon 1
<b>c.125G&gt;T</b>	p.(Arg42Leu)	1	M	F	Exon 1
<b>c.134T&gt;C</b>	p.(Leu45Pro)	1	M	S	Exon 1
<b>c.136_137delinsGG</b>	p.(Leu46Gly)	1	M	F	Exon 1
<b>c.137_139del</b>	p.(Leu46_Gly47delinsArg)	1	del/ins	S	Exon 1
<b>c.138_139insCTG</b>	p.(Leu46_Gly47insLeu)	1	del/ins	S	Exon 1
<b>c.139G&gt;T</b>	p.(Gly47Cys)	1	M	S	Exon 1
<b>c.138_139+2del</b>	r.spl?	1	X/spl/fs	S	Exon 1-Intron 1
<b>c.139+1G&gt;C</b>	r.slp?	3	X/spl/fs	F/S	Intron 1
<b>c.139+2T&gt;G</b>	r.spl?	1	X/spl/fs	F	Intron 1
<b>c.140-2A&gt;C</b>	r.spl?	1	X/spl/fs	F	Intron 1
<b>c.155G&gt;A</b>	p.(Gly52Asp)	1	M	S	Exon 2
<b>c.157A&gt;G</b>	p.(Lys53Glu)	2	M	S	Exon 2
<b>c.161G&gt;A</b>	p.(Ser54Asn)	1	M	S	Exon 2
<b>c.167_168delinsG</b>	p.(Ile56Argfs*2)	1	X/spl/fs	S	Exon 2
<b>c.167T&gt;C</b>	p.(Ile56Thr)	2	M	S	Exon 2
<b>c.175C&gt;T</b>	p.(Gln59*)	1	X/spl/fs	S	Exon 2
<b>c.212+3dup</b>	r.spl?	1	X/spl/fs	S	Intron 2
<b>c.245G&gt;A</b>	p.(Ser82Asn)	1	M	S	Exon 3
<b>c.258-12A&gt;G</b>	r.spl?	1	X/spl/fs	S	Intron 3
<b>c.287T&gt;A</b>	p.(Ile96Asn)	2	M	F/S	Exon 4
<b>c.308C&gt;T</b>	p.(Ala103Val)	5	M	F/S	Exon 4
<b>c.313G&gt;A</b>	p.(Glu105Lys)	1	M	F	Exon 4
<b>c.315+5G&gt;A</b>	r.slp?	3	X/spl/fs	F/S	Intron 4
<b>c.316-29_316-14del</b>	r.spl?	1	X/spl/fs	S	Intron 4
<b>c.316-11A&gt;G</b>	r.spl?	1	X/spl/fs	S	Intron 4
<b>c.320T&gt;C</b>	p.(Ile107Thr)	2	M	S	Exon 5



<b>c.328_330del</b>	p.(Ala110del)	2	del/ins	S	Exon 5
<b>c.343dup</b>	p.(Val115Glyfs*26)	1	X/spl/fs	S	Exon 5
<b>c.346_347delinsA</b>	p.(Pro116Thrfs*18)	1	X/spl/fs	F	Exon 5
<b>c.346C&gt;T</b>	p.(Pro116Ser)	1	M	F	Exon 5
<b>c.347C&gt;T</b>	p.(Pro116Leu)	1	M	F	Exon 5
<b>c.348_349insT</b>	p.(Pro117Serfs*24)	3	X/spl/fs	F/S	Exon 5
<b>c.351del</b>	p.(Val118Trpfs*16)	3	X/spl/fs	F/S	Exon 5
<b>c.351dup</b>	p.(Val118Argfs*23)	2	X/spl/fs	F	Exon 5
<b>c.394_395insT</b>	p.(Leu133Profs*8)	1	X/spl/fs	S	Exon 5
<b>c.429_430insTCC</b>	p.(Phe143_Pro144insSer)	1	M	F	Exon 5
<b>c.432dup</b>	p.(Pro145Serfs*5)	1	X/spl/fs	F	Exon 5
<b>c.433del</b>	p.(Asp145Asnfs*27)	1	X/spl/fs	S	Exon 5
<b>c.435del</b>	p.(Glu146Asnfs*27)	1	X/spl/fs	S	Exon 5
<b>c.435+1G&gt;A</b>	r.spl?	2	X/spl/fs	S	Intron 5
<b>c.435+2T&gt;G</b>	r.spl?	1	X/spl/fs	S	Intron 5
<b>c.435+6C&gt;G</b>	r.spl?	1	X/spl/fs	F	Intron 5
<b>c.436-2A&gt;G</b>	r.spl	1	X/spl/fs	F	Intron 5
<b>c.465G&gt;A</b>	p.(Trp155*)	1	X/spl/fs	F	Exon 6
<b>c.470A&gt;G</b>	p.(Asp157Gly)	2	M	F/S	Exon 6
<b>c.472_474del</b>	p.(Glu158del)	1	del/ins	S	Exon 6
<b>c.473_475del</b>	p.(Glu158del)	1	del/ins	S	Exon 6
<b>c.481C&gt;T</b>	p.(Arg161Cys)	2	M	F	Exon 6
<b>c.496C&gt;T</b>	p.(Arg166Cys)	1	M	F	Exon 6
<b>c.497G&gt;A</b>	p.(Arg166His)	2	M	F/S	Exon 6
<b>c.501dup</b>	p.(Asn168Glnfs*7)	1	X/spl/fs	S	Exon 6
<b>c.510C&gt;G</b>	p.(Tyr170*)	1	X/spl/fs	F	Exon 6
<b>c.529C&gt;T</b>	p.(Gln177*)	1	X/spl/fs	S	Exon 6
<b>c.533+1_533+4del</b>	r.spl?	1	X/spl/fs	S	Intron 6
<b>c.533+1_533+3dup</b>	r.spl?	1	X/spl/fs	S	Intron 6

<b>c.533+11G&gt;A</b>	r.spl?	1	X/spl/fs	F	Intron 6
<b>c.534-18_534-15del</b>	r.spl?	1	X/spl/fs	S	Intron 6
<b>c.534-1G&gt;C</b>	r.spl	2	X/spl/fs	F/S	Intron 6
<b>c.568_571del</b>	p.(Asp190Metfs*14)	30	X/spl/fs	F/S	Exon 7
<b>c.572A&gt;G</b>	p.(Tyr191Cys)	1	M	S	Exon 7
<b>c.574_575del</b>	p.(Val192Alafs*18)	1	X/spl/fs	S	Exon 7
<b>c.586C&gt;T</b>	p.(Gln196*)	1	X/spl/fs	F	Exon 7
<b>c.588+1G&gt;C</b>	r.spl?	3	X/spl/fs	F/S	Intron 7
<b>c.588+2T&gt;G</b>	r.spl?	2	X/spl/fs	F/S	Intron 7
<b>c.613_619del</b>	p.(Thr205Glu fs*36)	1	X/spl/fs	S	Exon 8
<b>c.627dup</b>	p.(Glu210*)	1	X/spl/fs	S	Exon 8
<b>c.640C&gt;T</b>	p.(Glu214*)	1	X/spl/fs	F	Exon 8
<b>c.663-1G&gt;T</b>	r.spl?	1	X/spl/fs	S	Intron 8
<b>c.665del</b>	p.(Met222Serfs*21)	1	X/spl/fs	F	Exon 9
<b>c.682C&gt;T</b>	p.(Gln228*)	1	X/spl/fs	S	Exon 9
<b>c.685C&gt;A</b>	p.(Arg229Ser)	1	M	S	Exon 9
<b>c.691G&gt;T</b>	p.(Glu231*)	1	X/spl/fs	F	Exon 9
<b>c.694C&gt;T</b>	p.(Arg232Cys)	3	M	S	Exon 9
<b>c.695G&gt;A</b>	p.(Arg232His)	2	M	F/S	Exon 9
<b>c.704G&gt;A</b>	p.(Trp235*)	1	X/spl/fs	F	Exon 9
<b>c.724G&gt;A</b>	p.(Val242Met)	1	M	F	Exon 10
<b>c.731C&gt;G</b>	p.(Ala244Gly)	1	M	F	Exon 10
<b>c.740T&gt;C</b>	p.(Phe247Ser)	1	M	S	Exon 10
<b>c.742G&gt;A</b>	p.(Val248Met)	2	M	F	Exon 10
<b>c.775C&gt;T</b>	p.(Ar259Trp)	1	M	S	Exon 10
<b>c.797G&gt;A</b>	p.(Arg266His)	1	M	F	Exon 10
<b>c.802C&gt;T</b>	p.(Gln268*)	1	X/spl/fs	F	Exon 10
<b>c.805G&gt;T</b>	p.(Glu269*)	1	X/spl/fs	F	Exon 10
<b>c.817C&gt;T</b>	p.(Leu273Phe)	1	M	S	Exon 10

<b>c.838A&gt;G</b>	p.(Asn280Asp)	1	M	F	Exon 10
<b>c.842+2T&gt;A</b>	r.spl?	1	X/spl/fs	S	Intron 10
<b>c.843-2del</b>	r.spl?	1	X/spl/fs	F	Intron 10
<b>c.845G&gt;A</b>	p.(Trp281*)	1	X/spl/fs	S	Exon 11
<b>c.854C&gt;T</b>	p.(Thr285Ile)	1	M	F	Exon 11
<b>c.863delT</b>	p.(Val288Glyfs*48)	1	X/spl/fs	F	Exon 11
<b>c.874_876del</b>	p.(Leu292del)	1	del/ins	S	Exon 11
<b>c.920C&gt;A</b>	p.(Ser307*)	2	X/spl/fs	F/S	Exon 11
<b>c.974-2A&gt;G</b>	r.spl?	1	X/spl/fs	F	Intron 11
<b>c.982G&gt;A</b>	p.(Glu328Lys)	1	M	F	Exon 12
<b>c.1000C&gt;T</b>	p.(Arg334Cys)	1	M	F	Exon 12
<b>c.1009C&gt;T</b>	p.(Arg337Trp)	2	M	F/S	Exon 12
<b>c.1027C&gt;T</b>	p.(Arg343*)	2	X/spl/fs	F/S	Exon 12
<b>c.1028G&gt;A</b>	p.(Arg343Gln)	1	M	F	Exon 12
<b>c.1028G&gt;C</b>	p.(Arg343Pro)	1	M	S	Exon 12
<b>c.1031A&gt;G</b>	p.(Asp344Gly)	1	M	S	Exon 12
<b>c.1042-1G&gt;A</b>	r.spl?	1	X/spl/fs	F	Intron 12
<b>c.1042-1G&gt;C</b>	r.spl?	1	X/spl/fs	F	Intron 12
<b>c.1068dup</b>	p.(Arg357Alafs*15)	1	X/spl/fs	S	Exon 13
<b>c.1099G&gt;A</b>	p.(Ala367Thr)	2	M	F/S	Exon 13
<b>c.1128_1129del</b>	p.(Phe377Gluufs*5)	1	X/spl/fs	F	Exon 13
<b>c.1145A&gt;T</b>	p.(Asp382Val)	1	M	S	Exon 13
<b>c.1157G&gt;A</b>	p.(Arg386His)	1	M	F	Exon 13
<b>c.1165C&gt;G</b>	p.(Leu389Val)	1	M	F	Exon 13
<b>c.1167del</b>	p.(Arg390Valfs*15)	1	X/spl/fs	S	Exon 13
<b>c.1176C&gt;G</b>	p.(Tyr392*)	1	X/spl/fs	S	Exon 13
<b>c.1177G&gt;T</b>	p.(Glu393*)	1	X/spl/fs	F	Exon 13
<b>c.1177G&gt;A</b>	p.(Glu393Lys)	1	M	S	Exon 13

« Par délibération de son Conseil en date du 10 Novembre 1972, l'Université n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ou mémoires. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs ».

VU, le Président de Thèse  
Professeur Michel BOULOUARD

VU, le Doyen de l'UFR Santé

VU et permis d'imprimer  
en référence à la délibération  
du Conseil d'Université  
en date du 14 Décembre 1973

Pour le Président  
de l'Université de CAEN-NORMANDIE et P.O

Le Doyen

ANNEE DE SOUTENANCE : 2018/2019

NOM ET PRENOM DE L'AUTEUR : SNANOUDJ-VERBER Sarah

**TITRE DE LA THESE : Pseudohypoparathyroïdie : Distorsion du ratio de transmission maternelle des mutations perte de fonction de GNAS**

**RESUME DE LA THESE EN FRANÇAIS :**

La PseudoHypoParathyroïdie de type 1A (PHP1A) et la PseudoPseudoHypoParathyroïdie (PPHP) sont deux maladies rares à transmission autosomique dominante provoquées par des mutations perte de fonction du gène *GNAS* soumis à empreinte, codant la protéine  $G_s\alpha$ . La PHP1A est causée par des mutations sur l'allèle maternel et entraîne une Ostéodystrophie Hériditaire d'Albright (AHO) et une résistance à la PTH, tandis que la PPHP avec AHO et sans résistance hormonale est liée à des mutations de l'allèle paternel. Cette étude visait à étudier la transmission des mutations de *GNAS*. Nous avons mené une étude rétrospective sur un grand nombre de familles mutées *GNAS*. Pour éviter un biais de constatation en faveur d'une proportion plus élevée d'enfants affectés, les cas index faisant partie des descendants ont été exclus. Le ratio de distribution des allèles mutés a été calculé à partir des génotypes observés chez des descendants de familles nucléaires et a été comparé au ratio attendu de 50% selon l'héritage mendélien (z-test à un échantillon). La transmission en fonction de la sévérité et du phénotype du parent transmettant de la mutation a également été analysée. L'étude a été réalisée sur 114 familles nucléaires et a inclus 250 descendants. Nous avons montré un excès de transmission maternelle d'allèles mutés (59%,  $P=0,022$ ), d'autant plus important que les mutations étaient sévères (61,7%,  $P=0,023$ ) et que l'allèle provenait de la grand-mère (64,7%,  $P=0,036$ ). Une distribution mendélienne a été observée lorsque les mutations étaient héritées du père. Notre étude suggère un rôle de  $G_s\alpha$  dans la biologie des ovocytes ou dans l'embryogenèse, avec des implications pour le conseil génétique.

**MOTS CLES :** PSEUDOHYPOPARATHYROÏDIE ; PHP1A ; PPHP ; *GNAS* ; DISTORSION DU RATIO DE TRANSMISSION ; MUTATIONS PERTE DE FONCTION

**TITRE DE LA THESE EN ANGLAIS : Pseudohypoparathyroidism : Maternal transmission ratio distortion of *GNAS* loss-of-function mutations**

**RESUME DE LA THESE EN ANGLAIS :**

*PseudoHypoParathyroidism Type 1A (PHP1A) and PseudoPseudoHypoParathyroidism (PPHP) are two rare autosomal dominant disorders caused by loss-of-function mutations in the imprinted *GNAS* gene, coding  $G_s\alpha$ . PHP1A is caused by mutations in the maternal allele and results in Albright's Hereditary Osteodystrophy (AHO) and PTH resistance, whereas PPHP, with AHO features and no hormonal resistance, is linked to mutations in the paternal allele. This study sought to investigate parental transmission of *GNAS* mutations. We conducted a retrospective study in a large population harboring *GNAS* mutations. To prevent ascertainment bias towards a higher proportion of affected children, we excluded from transmission analysis all probands in the ascertained sibships. The distribution ratio of the mutated alleles was calculated from the observed genotypes of the offspring of nuclear families and was compared to the expected ratio of 50% according to Mendelian inheritance (one-sample z-test). Transmission depending on the severity and phenotype of the transmitting parent of the mutation was also analyzed. The analysis was performed in 114 nuclear families and included 250 descendants. We showed an excess of transmission from mother to offspring of mutated alleles (59.0%,  $P=0.022$ ), which was greater when the mutations were severe (61.7%,  $P=0.023$ ), and when the allele originated from the grandmother (64.7%,  $P=0.036$ ). A Mendelian distribution was observed when the mutations were paternally inherited. The mother-specific transmission ratio distortion associated to PHP1A points to a role of  $G_s\alpha$  in oocyte biology or embryogenesis, with implications for genetic counselling.*

**KEY WORDS:** PSEUDOHYPOPARATHYROIDISM; PHP1A; PPHP; *GNAS*; TRANSMISSION RATIO DISTORTION; LOSS OF FUNCTION MUTATIONS