



**HAL**  
open science

# Caractérisation clinique et moléculaire d'un nouveau syndrome causé par des mutations du gène PITX1

Godelieve Morel

► **To cite this version:**

Godelieve Morel. Caractérisation clinique et moléculaire d'un nouveau syndrome causé par des mutations du gène PITX1. Médecine humaine et pathologie. 2019. dumas-02391941

**HAL Id: dumas-02391941**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02391941>**

Submitted on 3 Dec 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.



Faculté de médecine  
Université Nice Sophia Antipolis

THESE D'EXERCICE DE MEDECINE

MOREL Godelieve  
Née le 23/04/1990 à Reims

Caractérisation clinique et moléculaire d'un nouveau  
syndrome causé par des mutations du gène *PITX1*

Soutenance publique le 21 juin 2019 à la faculté de médecine de Nice

Jury

Directeur de thèse : Dr Massimiliano ROSSI

Présidente du jury : Pr Véronique PAQUIS-FLUCKLINGER

Dr Véronique BREUIL

Dr Nicolas BRONSARD

Dr Damien HAYE

**UNIVERSITE NICE SOPHIA ANTIPOLIS**  
**FACULTÉ DE MÉDECINE**

**Liste des professeurs de la faculté au 1<sup>er</sup> septembre 2018**

<b>Doyen</b>	M. BAQUÉ Patrick
<b>Vice-Doyen</b>	M. BOILEAU Pascal
<b>Assesseurs</b>	M. ESNAULT Vincent
	M DELLAMONICA Jean
	Mme BREUIL Véronique
	M. MARTY Pierre
<b>Conservateur de la bibliothèque</b>	Mme AMSELLE Danièle
<b>Directrice administrative des services</b>	Mme CALLEA Isabelle
<b>Doyens Honoraires</b>	M. AYRAUD Noël
	M. RAMPAL Patrick
	M. BENCHIMOL Daniel
<b>Professeurs Honoraires</b>	
M ALBERTINI Marc	M. GRELLIER Patrick
M. BALAS Daniel	M. GRIMAUD Dominique
M. BATT Michel	M. HARTER Michel
M. BLAIVE Bruno	M. INGLESAKIS Jean-André
M. BOQUET Patrice	M. JOURDAN Jacques
M. BOURGEON André	M. LALANNE Claude-Michel
M. BOUTTÉ Patrick	M. LAMBERT Jean-Claude
M. BRUNETON Jean-Noël	M. LAZDUNSKI Michel
Mme BUSSIERE Françoise	M. LEFEBVRE Jean-Claude
M. CAMOUS Jean-Pierre	M. LE FICHOUX Yves

M. CANIVET Bertrand  
 M. CASSUTO Jill-patrice  
 M. CHATEL Marcel  
 M. COUSSEMENT Alain  
 Mme CRENESSE Dominique  
 M. DARCOURT Guy  
 M. DELLAMONICA Pierre  
 M. DELMONT Jean  
 M. DEMARD François  
 M. DESNUELLE Claude  
 M. DOLISI Claude  
 M. FRANCO Alain  
 M. FREYCHET Pierre  
 M. GÉRARD Jean-Pierre  
 M. GILLET Jean-Yves M. ZIEGLER Gérard

**M.C.A. Honoraire**

**M.C.U. Honoraires**

M. ARNOLD Jacques  
 M. BASTERIS Bernard  
 Mlle CHICHMANIAN Rose-Marie  
 Mme DONZEAU Michèle  
 M. EMILIOZZI Roméo  
 M. FRANKEN Philippe  
 M. GASTAUD Marcel  
 M. GIUDICELLI Jean  
 M. MAGNÉ Jacques  
 Mme MEMRAN Nadine

Mme LEBRETON Elisabeth  
 M. LOUBIERE Robert  
 M. MARIANI Roger  
 M. MASSEYEFF René  
 M. MATTEI Mathieu  
 M. MOUIEL Jean  
 Mme MYQUEL Martine  
 M. ORTONNE Jean-Paul  
 M. PRINGUEY Dominique  
 M. SAUTRON Jean Baptiste  
 M. SCHNEIDER Maurice  
 M. TOUBOL Jacques  
 M. TRAN Dinh Khiem  
 M VAN OBBERGHEN Emmanuel

Mlle ALLINE Madeleine

M. MENGUAL Raymond

M. PHILIP Patrick

M. POIRÉE Jean-Claude

Mme ROURE Marie-Claire

### **PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

M. AMIEL Jean	Urologie (52.04)
M. BERNARDIN Gilles	Réanimation Médicale (48.02)
M. BOILEAU Pascal	Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (50.02)
M. DAR COURT Jacques	Biophysique et Médecine Nucléaire (43.01)
M. ESNAULT Vincent	Néphrologie (52-03)
Mme EULLER-ZIEGLER Liana	Rhumatologie (50.01)
M. FENICHEL Patrick	Biologie du Développement et de la Reproduction (54.05)
M. FUZIBET Jean-Gabriel	Médecine Interne (53.01)
M. GASTAUD Pierre	Ophthalmologie (55.02)
M. GILSON Éric	Biologie Cellulaire (44.03)
M. HASSEN KHODJA Reda	Chirurgie Vasculaire (51.04)
M. HÉBUTERNE Xavier	Nutrition (44.04)
M. HOFMAN Paul	Anatomie et Cytologie Pathologiques (42.03)
Mme ICHAI Carole	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
M. LACOUR Jean-Philippe	Dermato-Vénérologie (50.03)
M. LEFTHERIOTIS Georges	Physiologie- médecine vasculaire
M. MARQUETTE Charles-Hugo	Pneumologie (51.01)
M. MARTY Pierre	Parasitologie et Mycologie (45.02)
M. MICHIELS Jean-François	Anatomie et Cytologie Pathologiques (42.03)
M. MOUROUX Jérôme	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire (51.03)
Mme PAQUIS Véronique	Génétique (47.04)
M. PAQUIS Philippe	Neurochirurgie (49.02)

M. QUATREHOMME Gérald	Médecine Légale et Droit de la Santé (46.03)
M. RAUCOULES-AIMÉ Marc	Anesthésie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
M. ROBERT Philippe	Psychiatrie d'Adultes (49.03)
M. SANTINI Joseph	O.R.L. (55.01)
M. THYSS Antoine	Cancérologie, Radiothérapie (47.02)
M. TRAN Albert	Hépatogastro-entérologie (52.01)

### **PROFESSEURS PREMIERE CLASSE**

Mme ASKENAZY-GITTARD Florence	Pédopsychiatrie (49.04)
M. BAQUÉ Patrick	Anatomie - Chirurgie Générale (42.01)
M. BARRANGER Emmanuel	Gynécologie Obstétrique (54.03)
M. BÉRARD Étienne	Pédiatrie (54.01)
Mme BLANC-PEDEUTOUR Florence	Cancérologie – Génétique (47.02)
M. BONGAIN André	Gynécologie-Obstétrique (54.03)
Mme BREUIL Véronique	Rhumatologie (50.01)
M. CASTILLO Laurent	O.R.L. (55.01)
M. DE PERETTI Fernand	Anatomie-Chirurgie Orthopédique (42.01)
M. DRICI Milou-Daniel	Pharmacologie Clinique (48.03)
M. FERRARI Émile	Cardiologie (51.02)
M. FERRERO Jean-Marc	Cancérologie ; Radiothérapie (47.02)
M. GIBELIN Pierre	Cardiologie (51.02)
M. GUGENHEIM Jean	Chirurgie Digestive (52.02)
M. HANNOUN-LEVI Jean-Michel	Cancérologie ; Radiothérapie (47.02)
M. LONJON Michel	Neurochirurgie (49.02)
M. MOUNIER Nicolas	Cancérologie, Radiothérapie (47.02)
M. PADOVANI Bernard	Radiologie et Imagerie Médicale (43.02)
M. PICHE Thierry	Gastro-entérologie (52.01)
M. PRADIER Christian	Épidémiologie, Économie de la Santé et Prévention (46.01)

Mme RAYNAUD Dominique	Hématologie (47.01)
M. ROSENTHAL Éric	Médecine Interne (53.01)
M. SCHNEIDER Stéphane	Nutrition (44.04)
M. STACCINI Pascal	Biostatistiques et Informatique Médicale (46.04)
M. THOMAS Pierre	Neurologie (49.01)

### **PROFESSEURS DEUXIEME CLASSE**

Mme ALUNNI Véronique	Médecine Légale et Droit de la Santé (46.03)
M. ANTY Rodolphe	Gastro-entérologie (52.01)
M. BAHADORAN Philippe	Cytologie et Histologie (42.02)
Mme BAILLIF Stéphanie	Ophthalmologie (55.02)
M. BENIZRI Emmanuel	Chirurgie Générale (53.02)
M. BENOIT Michel	Psychiatrie (49.03)
M. BREAUD Jean	Chirurgie Infantile (54-02)
M. CARLES Michel	Anesthésiologie Réanimation (48.01)
M. CHEVALIER Nicolas	Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques (54.04)
M. CHEVALLIER Patrick	Radiologie et Imagerie Médicale (43.02)
Mme CHINETTI Giulia	Biochimie-Biologie Moléculaire (44.01)
M. CLUZEAU Thomas	Hématologie (47.01)
M. DELLAMONICA Jean	Réanimation médicale (48.02)
M. DELOTTE Jérôme	Gynécologie-obstétrique (54.03)
M. FONTAINE Denys	Neurochirurgie (49.02)
M. FOURNIER Jean-Paul	Thérapeutique (48-04)
Mlle GIORDANENGO Valérie	Bactériologie-Virologie (45.01)
M. GUÉRIN Olivier	Gériatrie (48.04)
M. IANNELLI Antonio	Chirurgie Digestive (52.02)
M JEAN BAPTISTE Elixène	Chirurgie vasculaire (51.04)
M. LEVRAUT Jacques	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale (48.01)

M. PASSERON Thierry	Dermato-Vénérologie (50-03)
M. ROGER Pierre-Marie	Maladies Infectieuses ; Maladies Tropicales (45.03)
M. ROHRLICH Pierre	Pédiatrie (54.01)
M. ROUX Christian	Rhumatologie (50.01)
M. RUIMY Raymond	Bactériologie-virologie (45.01)
Mme SACCONI Sabrina	Neurologie (49.01)
M. SADOUL Jean-Louis	Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques (54.04)
M. TROJANI Christophe	Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (50.02)
M. VENISSAC Nicolas	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire (51.03)

### **PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS**

M. HOFLIGER Philippe	Médecine Générale (53.03)
----------------------	---------------------------

### **MAITRE DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS**

M. DARMON David	Médecine Générale (53.03)
-----------------	---------------------------

### **PROFESSEURS AGRÉGÉS**

Mme LANDI Rebecca	Anglais
-------------------	---------

### **MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS**

M. AMBROSETTI Damien	Cytologie et Histologie (42.02)
Mme BANNWARTH Sylvie	Génétique (47.04)
M. BENOLIEL José	Biophysique et Médecine Nucléaire (43.01)
Mme BERNARD-POMIER Ghislaine	Immunologie (47.03)



M. BRONSARD Nicolas	Anatomie Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (42.01)
Mme BUREL-VANDENBOS Fanny	Anatomie et Cytologie pathologiques (42.03)
M. DOGLIO Alain	Bactériologie-Virologie (45.01)
M DOYEN Jérôme	Radiothérapie (47.02)
M FAVRE Guillaume	Néphrologie (52.03)
M. FOSSE Thierry	Bactériologie-Virologie-Hygiène (45.01)
M. GARRAFFO Rodolphe	Pharmacologie Fondamentale (48.03)
Mme GIOVANNINI-CHAMI Lisa	Pédiatrie (54.01)
Mme HINAULT Charlotte	Biochimie et biologie moléculaire (44.01)
M. HUMBERT Olivier	Biophysique et Médecine Nucléaire (43.01)
Mme LAMY Brigitte	Bactériologie-virologie (45.01)
Mme LEGROS Laurence	Hématologie et Transfusion (47.01)
Mme LONG-MIRA Elodie	Cytologie et Histologie (42.02)
Mme MAGNIÉ Marie-Noëlle	Physiologie (44.02)
Mme MOCERI Pamela	Cardiologie (51.02)
Mme MUSSO-LASSALLE Sandra	Anatomie et Cytologie pathologiques (42.03)
M. NAÏMI Mourad	Biochimie et Biologie moléculaire (44.01)
Mme POMARES Christelle	Parasitologie et mycologie (45.02)
Mme SEITZ-POLSKI Barbara	Immunologie (47.03)
M. TESTA Jean	Épidémiologie
M. TOULON Pierre	Économie de la Santé et Prévention (46.01) Hématologie et Transfusion (47.01)

### **PRATICIENS HOSPITALIERS UNIVERSITAIRES**

M. DURAND Matthieu	Urologie (52.04)
M. ILIE Marius	Anatomie et Cytologie pathologiques (42.03)

**PROFESSEURS ASSOCIÉS**

M. GARDON Gilles	Médecine Générale (53.03)
Mme HURST Samia	Thérapeutique (48.04)
M. PAPA Michel	Médecine Générale (53.03)

**MAITRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS**

M BALDIN Jean-Luc	Médecine Générale (53.03)
Mme CASTA Céline	Médecine Générale (53.03)
M. HOGU Nicolas	Médecine Générale (53.03)
Mme MONNIER Brigitte	Médecine Générale (53.03)

**PROFESSEURS CONVENTIONNÉS DE L'UNIVERSITÉ**

M. BERTRAND François	Médecine Interne
M. BROCKER Patrice	Médecine Interne Option Gériatrie
M. CHEVALLIER Daniel	Urologie
Mme FOURNIER-MEHOUAS Manuella	Médecine Physique et Réadaptation
M. JAMBOU Patrick	Coordination prélèvements d'organes
M. ODIN Guillaume	Chirurgie maxillo-faciale
M. PEYRADE Frédéric	Onco-Hématologie
M. PICCARD Bertrand	Psychiatrie
M. QUARANTA Jean-François	Santé Publique

A Madame le Professeur Véronique PAQUIS-FLUCKLINGER,

Vous me faites l'honneur de juger ce travail et de présider ce jury de thèse.

Je vous remercie pour votre accompagnement tout au long de mon internat ainsi que pour votre bienveillance.

Soyez assurée de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Massimiliano ROSSI,

Merci beaucoup d'avoir accepté de m'encadrer pour ce travail de thèse.

Soyez assurée de ma sincère gratitude.

A Madame le Docteur Véronique BREUIL, à Monsieur le Docteur Nicolas BRONSARD et à Monsieur le Docteur Damien HAYE,

Je suis honorée que vous ayez accepté de faire partie de ce jury de thèse,

Votre savoir, votre expérience pour votre discipline rendaient votre présence très intéressante pour l'évaluation de cette thèse.

Je tiens à ce que vous soyez assuré de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur David GENEVIEVE, à Madame le Docteur Florence PETIT, à Madame le Docteur LABALME,

Je vous remercie pour vos échanges constructifs qui m'ont été précieux pour la rédaction de ce travail.

*Aux patients qui m'ont déjà fait confiance tout au long de mon internat.*

*A tous les patients qui me seront confiés.*

A Jean-Etienne sans qui je n'aurais pas eu le courage de tenter l'aventure de la P1.

A toutes les personnes qui m'ont formées. Aux techniciens du laboratoire de génétique de Nice qui m'ont appris à tenir une pipette et à ceux qui m'ont encadrée lors de mon master 2. Aux généticiens de Nice et en particulier Cécile, Annabelle, Morgane et Sylvie. Aux médecins des différents services de médecine, généticiens ou non. A mes co-internes.

Un immense merci Annik pour ta relecture bienveillante.

A ma famille, qui me soutient au quotidien et qui me supporte depuis le début. Mes parents et mes frères bien sûr, mais pensées toutes spéciales à Anna et Jean-Baptiste. A ceux qui me demandent à chaque réunion de famille quand est-ce que je serais enfin docteur !

A mes amis. Ceux des scouts, les piments verts et tous les autres de la bande. A mes amies d'enfance, du collège et du lycée. A l'équipage du Manava. Ceux rencontrés dans le cadre de mes études. Ceux de l'externat et les copains de galère (vive la sous conf) : Elodie, Orane, Dysmas, Marie, Mélanie, Luc et Nicolas. Spéciale dédicace pour toi Mélanie qui m'a beaucoup accompagné ces derniers mois lors de notre merveilleuse colocation. Et puis à tous ceux que j'ai rencontré plus récemment pendant mon internat, à Nice, à Paris et à Lyon (Aviva, Barbara, Etienne, Hélène...).

A ceux que je ne nomme pas mais qui se reconnaîtront.

## Table des matières

### I. PREMIERE PARTIE

- I.1. Introduction (page 14)
- I.2. Sujets et Méthodes (page 16)
- I.3. Résultats (page 19)
- I.4. Discussion (page 27)
- I.5. Bibliographie (page 42)

### II. DEUXIEME PARTIE

English article for submission

## I. PREMIERE PARTIE

### I.1. INTRODUCTION

Les quatre membres sont formés pendant l'embryogenèse à partir de bourgeons constitués de cellules issues du mésoderme latéral bornées par l'ectoderme (1). La croissance du bourgeon se fait selon trois axes et implique de très nombreuses voies de signalisation et facteurs de croissance :

- L'axe proximo-distal (croissance de la racine du membre aux orteils/doigts) : le pôle apical ectodermique et la zone de progression sous-jacente produisent des facteurs de croissance de la famille des FGF.
- L'axe dorso-ventral (différenciation du dos de la main/pied vers la face palmaire) : l'ectoderme dorsal produit WNT7A tandis que la face ventrale produit EN-1.
- L'axe antéro-postérieur (différenciation du pouce/gros orteil au 5<sup>e</sup> doigt) : la zone d'activité polarisante située dans le mésoderme postérieur produit SHH. La concentration décroissante de SHH vers le pôle antérieur produit un gradient morphogène.

En parallèle à cette croissance en trois dimensions des bourgeons de membres, d'autres facteurs interviennent spécifiquement au bourgeon supérieur ou inférieur afin de permettre l'identité du membre. Il s'agit principalement du facteur de transcription TBX5 pour le membre supérieur et de PITX1 et TBX4 pour le membre inférieur.

Dans un premier temps, *PITX1* permet l'induction du bourgeon inférieur et la croissance du membre inférieur par l'expression de *TBX4*. D'autre part, indépendamment de *TBX4*, *PITX1* participe à la morphogenèse globale du membre inférieur (2). En effet, PITX1 se lie à de nombreux enhanceurs de gènes nécessaires au développement osseux, musculaire et tendineux du membre inférieur, dont *SOX9* qui code pour un facteur de transcription impliqué dans la chondrogenèse (3).

Chez le poulet et la souris, l'expression ectopique de *Pitx1* au niveau du bourgeon supérieur induit une expression de *Tbx4* et conduit à la formation d'une aile/patte avant qui présente des caractéristiques similaires aux pattes arrière (4,5)

En plus de son rôle dans le développement et l'identité des membres inférieurs (4,6,7), *PITX1* est un gène exprimé dans l'hypophyse, dans le premier arc branchial et les structures qui en découlent (et plus particulièrement les os maxillaires) ainsi que dans le mésenchyme latéral et le bourgeon de membre (8).. Ce gène est très conservé parmi les espèces et sa régulation joue un rôle crucial dans l'évolution du pelvis, en particulier dans la phylogénèse des poissons (9).

*PITX1* fait partie, avec *PITX2* et *PITX3*, d'une famille de gènes codant pour des facteurs de transcription à homéodomaine de type bicoïde. La lysine en position 50 de l'homéodomaine reconnaît l'avant dernier C du motif TAATCC des gènes cibles (6). Le domaine OAR (pour *otp/aristaless/rax*) est un autre domaine fonctionnel très conservé situé à l'extrémité N-terminal de la protéine dont la fonction n'est pas encore pleinement comprise. Des mutations du gène *PITX2* causent le syndrome d'Axenfield-Rieger (OMIM 180500), des dysgénésies du segment antérieur (OMIM 137600) ou des dermoïdes en anneau de la cornée (OMIM 180550). Des mutations de *PITX3* sont décrites chez des patients avec cataracte, dysgénésie du segment antérieur ou encore des anomalies du développement oculaire variable (OMIM 107250 et 610623).

A ce jour, deux syndromes associés à *PITX1* sont connus : le syndrome de Liebenberg (OMIM 186550) et le syndrome « Pieds varus équins plus ou moins associés à une hémimélie tibiale et/ou une polydactylie préaxiale » (OMIM 119800). Pour ces deux syndromes, les atteintes malformatives ne concernent que les membres.

Les patients ayant un syndrome de Liebenberg ont une dysplasie des os du coude, des anomalies de la forme des os du carpe entraînant une déviation radiale des mains et une brachydactylie. Ces malformations sont localisées aux membres supérieurs dont les caractéristiques radiologiques rappellent celles des membres inférieurs (10,11).

Le syndrome « Pieds varus équins plus ou moins associés à une hémimélie tibiale et/ou une polydactylie préaxiale » est un syndrome très rare qui ne comporte que des malformations des membres inférieurs (12–15).

Nous présentons dans ce travail la caractérisation clinique et moléculaire de 3 patients présentant un syndrome jamais rapporté auparavant, lié à des mutations faux sens du gène *PITX1*.



## I.2. SUJETS ET METHODES

### Sujets

Les patients ont été évalués par un généticien au cours d'une consultation au sein d'un Centre Labélisé Anomalies du Développement (CLAD). Les patients 1 et 2 ont été vus au sein du CLAD du CHU de Lyon et le patient 3 a été pris en charge au CLAD du CHU de Montpellier. Nous avons obtenu un consentement valide pour la recherche et pour l'autorisation de la diffusion des données médicales pour les 3 patients de l'étude.

### Méthodes

#### *Exome*

Le génome est composé d'environ 3 milliards de nucléotides. L'ensemble des gènes représente environ 1 à 2% du génome (16). Le séquençage à haut débit (SHD) est une technique puissante, rapide, efficace et dont le coût est désormais abordable. Cette technologie permet de séquencer en une fois, non plus un ou plusieurs exons, mais plusieurs gènes (panel de gènes), les parties exoniques de tous les gènes d'un individu (exome), voire même le génome entier. Il est possible de proposer en routine diagnostique la réalisation de panel de gènes lorsque le phénotype clinique du patient est évocateur d'une entité nosologique bien définie. L'étude du génome, bien que techniquement possible, n'est actuellement pas encore disponible en routine dans la plupart des centres en France. Quant à la réalisation d'exome, cette analyse se démocratise progressivement mais reste pour l'instant réservée à un nombre restreint de patients sur le territoire français.

Le SHD suit plusieurs étapes dites analytiques successives qui comprend l'extraction d'ADN, la préparation de la librairie, l'amplification clonale et enfin, le séquençage. Puis, les données générées sont traitées par des outils bio-informatiques afin de permettre aux biologistes d'identifier le ou les variants pathogènes.

Les trois patients rapportés dans cette étude ont bénéficié d'une étude de l'exome, réalisée selon la méthode décrite ci-dessous :

- Extraction d'ADN : l'ADN des patients a été extrait à partir des globules blancs issus de prélèvements sanguins prélevés sur tube EDTA par extractions automatiques d'ADN sur colonne (Kit Macherey Nagel).
- Préparation de la librairie : l'ADN est fragmenté sous l'action d'une lyse mécanique par ultrasons à l'aide d'un sonicateur qui permet d'obtenir des brins d'environ 200 paires de bases. Les brins d'ADN ainsi générés sont réparés pour que leurs extrémités soient à bout franc. Puis l'étape d'A tealing consiste en l'ajout d'un nucléotide à l'extrémité afin de permettre la ligation d'un adaptateur puis d'un code barre. Ce code barre est spécifique pour un même patient permettant par la suite de mélanger les échantillons de plusieurs patients (multiplexage). Une étape de PCR permet de sélectionner les brins valides. Ces brins sont alors hybridés à la biotine puis capturés par liaison à la streptavidine couplée à des billes magnétiques. La capture d'exome a été réalisée avec les kits de recherche clinique SureSelect (Agilent). Les lavages successifs permettent de ne retenir que les fragments d'ADN d'intérêt et d'éliminer tous les autres fragments (purification).
- Amplification clonale de chaque fragment d'ADN : les brins, grâce à leur adaptateur, se fixent par complémentarité à une amorce située sur une « flow cell ». L'amplification se fait par une PCR dite « en pont ».
- Séquençage de tous les fragments amplifiés : les séquenceurs Illumina, NextSeq 500 pour le patient 1 et 2 et HiSEQ 2500 pour le patient 3, ont été utilisés. Les produits d'amplifications de chaque brin ont été séquencés par polymérisation de nucléotides marqués fluorescents. Ce signal lumineux est ensuite transformé en une données de séquence. Tous les brins sont séquencés en mode paired-end (2X150 bp ou 2X75 bp).

De très nombreuses données sont produites par le SHD et des outils bio-informatiques sont nécessaires pour traiter et interpréter ces résultats bruts. On parle alors du processus post analytique. Il faut notamment aligner les lectures de séquences générées sur une séquence de référence puis identifier les variants du patient (« variants calling »). Le séquençage d'exome génère pour chaque patient en moyenne 30 000 variants qu'il convient alors de filtrer pour ne retenir que le (ou les) variant(s) impliqué(s) dans la pathologie étudiée. Pour restreindre progressivement le nombre de variants, il convient d'annoter chaque variant, c'est-à-dire de compiler les informations disponibles pour chacun d'entre eux. Ainsi, il sera possible de les trier selon le mode d'hérédité suspecté, d'exclure les variants présents dans les bases de données de polymorphismes (GnomAD), de sélectionner les variants prédits comme pathogènes par les

logiciels de prédiction (SIFT, Mutation Taster, CADD score), de rechercher leur occurrence pour d'autres patients ou encore de connaître la conservation du nucléotide ou de l'acide aminé parmi les espèces (PhyloP). Pour cela, un logiciel bio-informatique interne développé par le service de génétique de Lyon est utilisé qui intègre entre autres la base de données Alamut.

Les variants candidats identifiés par séquençage à haut débit ont été confirmés par un séquençage Sanger selon un protocole classique (amplification par réaction polymérase en chaîne suivie d'une réaction de séquence).

### *GeneMatcher*

Le rendement diagnostique de l'exome est compris entre 10 et 40% selon les indications. Il est donc fréquent que l'exome ne permette pas d'emblée d'identifier un variant retenu comme pathogène. Toutefois, certains variants dans des gènes non connus en pathologie humaine ou connus en association à des phénotypes différents peuvent être de bons gènes candidats. GeneMatcher est un site internet gratuit (17) développé par une équipe américaine qui permet le partage, à l'échelle internationale, de ces gènes candidats (18). Les chercheurs et les cliniciens qui soumettent le même gène candidat sur le site sont mis en relation et peuvent alors comparer le phénotype de leur patient. Si leur phénotype est comparable, ceci conforte la pathogénicité des variants identifiés. GeneMatcher est donc un outil essentiel qui a déjà prouvé son efficacité pour l'identification de nouveaux gènes impliqués en pathologie humaine (19).

### I.3. RESULTATS

#### Description clinique

##### *Patient 1*

Le patient 1 est le premier enfant d'un couple non apparenté. Les échographies anténatales avaient mis en évidence un retard de croissance intra-utérin et un polyhydramnios. Le caryotype standard réalisé sur le liquide amniotique n'avait pas identifié de déséquilibre chromosomique. L'enfant était né à terme par césarienne. Son poids de naissance était de 2,440 kg (<3<sup>e</sup> percentile), sa taille de naissance était de 45,5 cm (<3<sup>e</sup> percentile) et le périmètre crânien de naissance était de 34,3 cm (30<sup>e</sup> percentile). L'examen clinique réalisé à la maternité retrouvait une micrognathie associée à des difficultés alimentaires, une cryptorchidie bilatérale et un flessum des genoux. Le développement psychomoteur était bon : il n'a pas eu de retard dans l'acquisition du langage, il a tenu assis à l'âge de 7 mois et la marche a été acquise à 17 mois. Il est à noter que, du fait du flessum des genoux, l'enfant avait développé une tendance à marcher sur la pointe des pieds avec une attitude en équinisme. Il a bénéficié de deux interventions d'abaissement testiculaire à l'âge de 15 mois et de 5 ans.

Lorsqu'il avait été revu à l'âge de 3 ans et 8 mois, il mesurait 89,5 cm (-2,5DS), pesait 12,400 kg (3<sup>e</sup> percentile) et avait un périmètre crânien de 50 cm (-0,5DS). L'examen clinique mettait en évidence un petite taille modérée, des fentes palpébrales étroites, un nez fin, des oreilles basses implantées et un rétromicrognathisme, une diminution de l'amplitude des genoux, une hyperlordose et des pieds équins. Il n'y avait pas d'anomalie évidente au niveau des membres supérieurs. Lorsqu'il a été revu à 7 ans et 5 mois, il mesurait 112cm (-2DS), pesait 19 kg (12<sup>e</sup> percentile) et son périmètre crânien était de 52,5 cm (M). Par ailleurs, il suit une scolarité normale.

Il y avait une hypoplasie rénale gauche à l'échographie abdominale. Le bilan de la fonction rénale réalisé dans les suites a révélé une insuffisance rénale modérée (créatinine plasmatique à 57 µmol/L pour une normale entre 25 et 42 µmol/L). L'échographie cardiaque était normale.

Du fait de sa petite taille et de la cryptorchidie, il avait bénéficié d'une consultation endocrinologique. Le bilan hormonal avait retrouvé un taux bas d'hormone anti-müllérienne

(300 pmol/L pour une norme entre 441 et 2352), évoquant une possible dysfonction testiculaire. Il n'y avait pas de cause hormonale retenue pour la petite taille.

A l'âge de 5 ans et 7 mois, l'âge osseux était retardé de 2 ans (évalué à environ 3 ans et ½). Les radiographies retrouvaient l'hypoplasie mandibulaire déjà évidente sur le plan clinique, des ailes iliaques étroites et un retard net d'ossification des rotules. A l'âge de 7 ans, une nouvelle radiographie des genoux montrait un seul point d'ossification rotulien (Figure 1 A, page 22).

Sur le plan génétique, l'Analyse Chromosomique sur Puce à ADN (ACPA) n'a pas mis en évidence de déséquilibre chromosomique cryptique pathogène.

### *Patient 2*

La patiente 2 est la mère du patient 1. Elle présente un phénotype similaire à celui de son fils. Elle avait aussi présenté un retard de croissance intra-utérin. A sa naissance à terme, elle pesait 2,200 kg (<3<sup>e</sup> percentile). Elle avait une micrognathie qui a nécessité un traitement orthodontique. Elle avait bénéficié d'un traitement par hormone de croissance de l'âge de 7 à 17 ans en raison d'une petite taille.

Sur le plan orthopédique, elle avait développé une hyperlordose qui avait été prise en charge par corset. De plus, une trochléoplastie du genou gauche avait été réalisée du fait d'une instabilité secondaire à une hypoplasie rotulienne. La naissance de son fils s'était faite par césarienne car son bassin était trop étroit pour permettre un accouchement par voie basse.

A l'âge de 30 ans, elle mesure 1,60 m. Les radiographies objectivent des ailes iliaques étroites et la micrognathie retrouvée à l'examen clinique (Figure 1 B, page 23).

### *Patient 3*

Le troisième patient est le seul enfant d'un couple non apparenté. Le couple avait eu deux fausses couches et a fait une interruption médicale de grossesse pour trisomie 21. La grossesse avait été obtenue après un parcours de fécondation in vitro avec injection de sperme du conjoint ; elle s'était déroulée sans particularité.

Le patient était né à 38SA + 3 jours par césarienne pour anomalie du rythme cardiaque fœtal. A la naissance, il mesurait 3,130 kg (47<sup>e</sup> percentile), mesurait 49 cm (47<sup>e</sup> percentile) et avait un périmètre crânien de 33 cm (17<sup>e</sup> percentile). Il présentait une séquence de Pierre Robin et un flessum sévère des genoux associés à une agénésie bilatérale des rotules confirmée à l'échographie.

La radiographie du bassin avait mis en évidence une hypoplasie des branches ischio-pubiennes. Il avait aussi un micropénis et une cryptorchidie bilatérale.

L'IRM des genoux, réalisée à l'âge de 2 ans et 10 mois, a confirmé l'agénésie patellaire bilatérale et a retrouvé une agénésie bilatérale du pivot central et du ménisque. De plus, l'appareil extenseur est exclusivement tendineux ; au genou droit, il est luxé latéralement tandis qu'au niveau du genou gauche, il est subluxé et en position antéro-latérale.

Au dernier examen clinique, à l'âge de 6 ans, il pesait 16,8 kg (1,5DS) pour une taille de 113 cm (M) et un périmètre crânien de 51,2 cm (-0,5DS).

Il a suivi une scolarité normale. Malgré de nombreuses interventions chirurgicales, il ne peut actuellement pas marcher en raison des limitations fonctionnelles liées au flessum.

L'échographie cardiaque et rénale ainsi que l'ACPA étaient normales.

Les photographies et les clichés radiographiques du patient 3 sont présentés dans la Figure 1C (page 24).

Les caractéristiques cliniques principales des trois patients sont synthétisées dans le Tableau 1 (page 25).

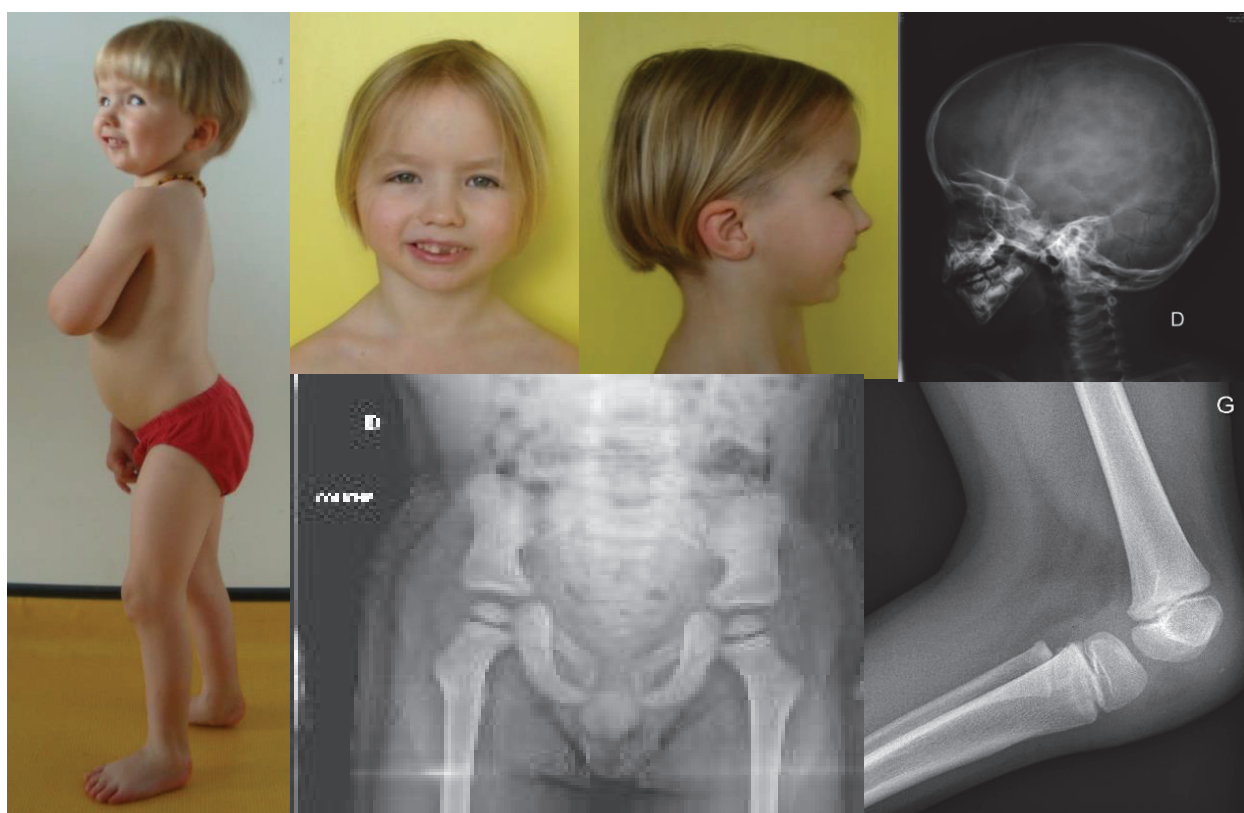
**Figure 1 : Phénotype clinique et radiologique des patients 1, 2 et 3.****(A) Phénotype du patient 1.**

Photographies corps entier de profil (3 ans et 8 mois) ; hyperlordose et flessum des genoux.

Photographies de face et de profil du visage (6 ans et ½) ; on note des fentes palpébrales étroites, un nez fin, des oreilles basses implantées et un rétromicrognathisme.

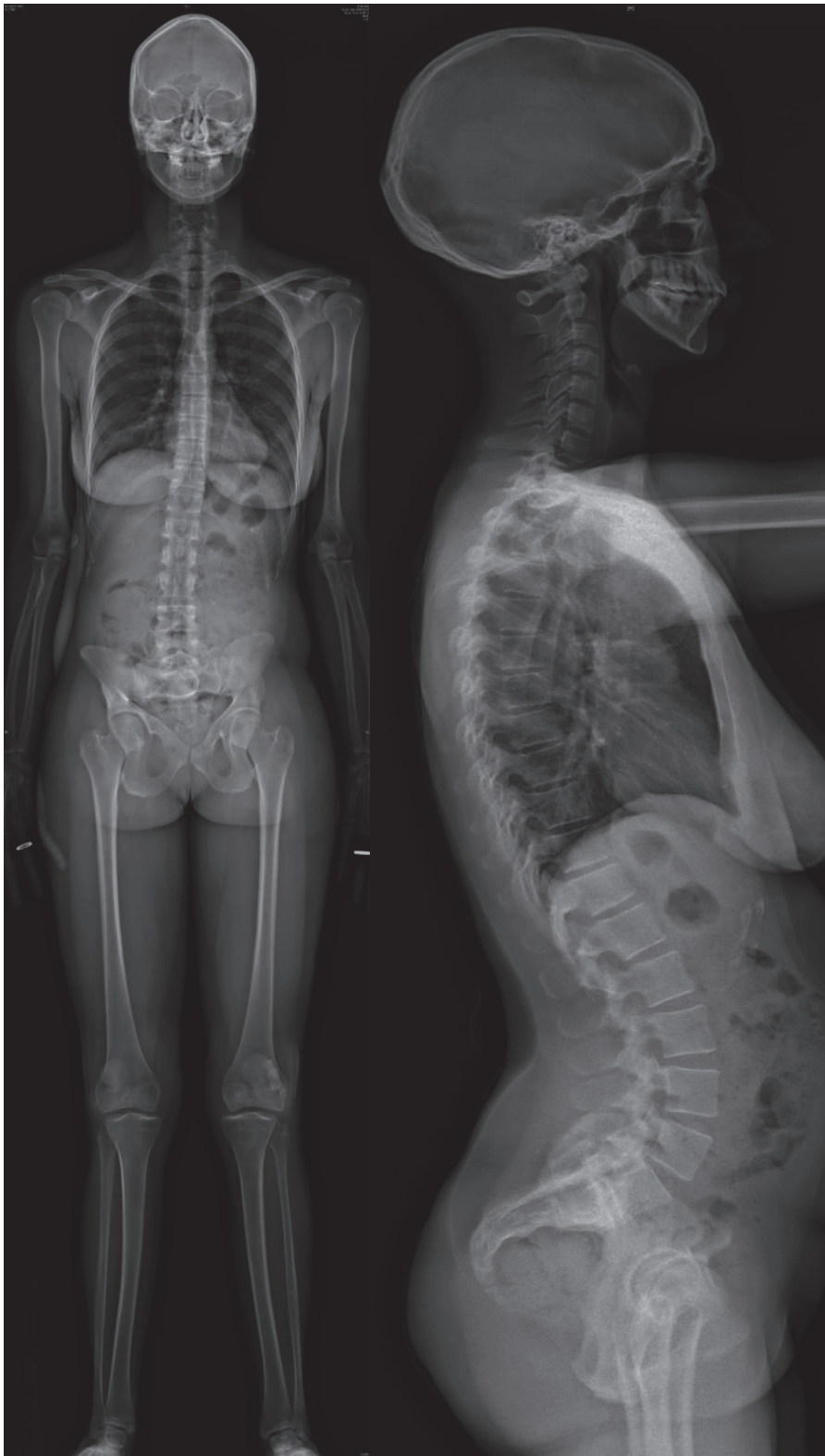
Radiographie du crâne de profil et du bassin de face (3 ans et 8 mois) ; on note l'hypoplasie mandibulaire et des ailes iliaques étroites.

Radiographie du genou de profil (7 ans) ; ossification ponctiforme de la rotule.



**(B) Phénotype de la patiente 2.**

Radiographie du squelette EOS, face et profil ; on note une discrète micrognathie, une hyperlordose et des ailes iliaques étroites.





**(C) Phénotype du patient 3.**

Photographies du visage (en période néonatale et à 6 ans) et du genou droit ; on note une fente palatine postérieure dans le cadre d'une séquence de Pierre-Robin, des fentes palpébrales étroites, un rétromicrognathisme et un flessum marqué des genoux.

Radiographie du bassin de face (période néonatale) ; retard d'ossification des branches ischio-pubiennes.

IRM du genou (2 ans et 10 mois) ; agénésie patellaire.



**Tableau 1 : Caractéristiques cliniques principales observées chez les patients rapportés.**

	Patient 1	Patiente 2 (mère du patient 1)	Patient 3	Total
Sexe, âge	Garçon, 7 ans	Femme, 35 ans	Garçon, 6 ans	1 fille, 2 garçons
Micrognathie	+	+	+	3/3
Séquence de Pierre Robin	-	-	+	1/3
Anomalies des genoux	Flessum, hypoplasie rotulienne	Hypoplasie et instabilité rotulienne	Flessum, agénésie rotulienne	3/3
Anomalies du bassin	Ailes iliaques étroites	Ailes iliaques étroites	Retard ossification branches ischio-pubiennes	3/3
Hyperlordose	+	+	-	2/3
Extrémités	Pieds équins, brachy-clinodactylie des orteils	Normales	Normales	1/3
Petite taille de début anténatal	+	+	-	2/3
Anomalies génito-urinaires	Cryptorchidie, hypoplasie rénale avec discrète insuffisance rénale	-	Cryptorchidie, micropénis	2/2 garçons

### Résultats d'exome

Chez les patients 1 et 2, l'étude en séquençage à haut débit d'exome a permis de mettre en évidence la mutation faux sens c.793G>T à l'état hétérozygote dans le gène *PITXI* (p.Gly265Cys) (Chr5(GRCh37):g.134364621C>A, NM\_002653). La mutation n'a pas été retrouvée chez les grands-parents maternels du patient 1 : elle est donc survenue *de novo* chez la patiente 2. Ce variant n'est pas situé sur un domaine fonctionnel connu.

Concernant le patient 3, la mutation c.412A>C (p.Lys138Gln) du gène *PITXI* a été identifiée (Chr5(GRCh37):g.134365002T>G, NM\_002653.4). Cette même mutation a été retrouvée chez son père asymptomatique en mosaïque (dans 6% des cellules sanguines). Ces deux variants n'ont pas été retrouvés en population générale sur GnomAD et sont prédits comme pathogènes sur les différents logiciels de prédictions : délétères sur SIFT (score à 0), Mutation Taster (score à 1) et Polyphen 2 (score à 1 pour la mutation c.793G>T et à 0,997 pour la mutation c.412A>C). Ces mutations changent des acides aminés qui sont conservés parmi les espèces. Tous ces arguments sont donc en faveur de la pathogénicité de ces variants.

Le gène *PITXI* ayant été identifié comme un gène candidat, il a été enregistré sur le site GeneMatcher par l'équipe de Lyon et de Montpellier. Ces deux équipes ont ainsi été mises en relation et la comparaison des tableaux cliniques des patients a permis de confirmer le rôle pathogène des variants retrouvés.

#### I.4. DISCUSSION

Le syndrome de Liebenberg et le syndrome « Pieds varus équins plus ou moins associés à une hémimélie tibiale et/ou une polydactylie préaxiale » sont à ce jour les deux syndromes connus en lien avec des anomalies de *PITX1*.

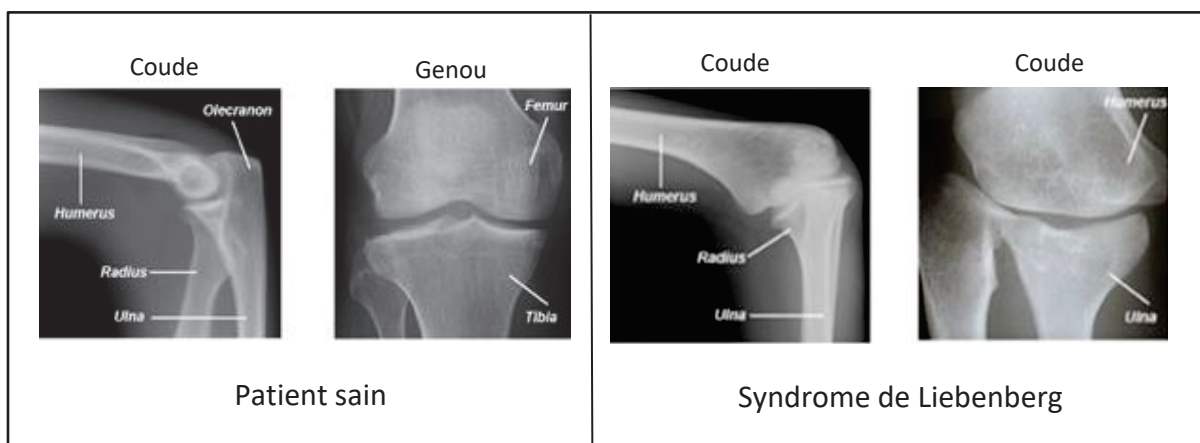
La première description clinique du syndrome de Liebenberg date de 1973 (10) et c'est en 2012 que l'anomalie moléculaire a été identifiée chez cette grande famille historique incluant 33 patients sur 7 générations. Le membre supérieur présente des caractéristiques cliniques et radiologiques rappelant celles des membres inférieurs (Figure 2 A, B et C, page 28). Au niveau du coude, l'extrémité distale de l'humérus est plus large et l'extrémité proximale de l'ulna est plus allongée. De plus, l'oléocrane est absent. Au niveau du carpe, le triquetrum et le pisiforme sont fusionnés en un seul os de forme comparable au calcanéum. La partie distale du scaphoïde ressemble à la tête du talus tandis que le lunatum prend une forme carrée et ressemble au cuboïde (11). A ce jour, au total 6 familles de patients ayant un syndrome de Liebenberg ont été caractérisées sur le plan moléculaire dans la littérature. Il y a quatre familles avec une délétion de 8,5 à 275 kb, toutes situées en amont de *PITX1* (11,20–22). Une duplication de 0,42 Mb incluant le gène *PITX1* a été retrouvée pour la cinquième famille (23). Et enfin, une translocation t(5;18)(q31.1;q12.3) *de novo* incluant le gène *PITX1* a été identifiée chez un enfant (20). Ces réarrangements chromosomiques perturbent les domaines topologiques de régulation de l'ADN en affectant un élément non codant *cis*-régulateur de *PITX1* : *H2AFY*. Aux membres supérieurs, *H2AFY* agit comme frontière qui permet d'isoler *PITX1* de Pan-limb enhancer (Pen), son promoteur principal. En l'absence de l'expression de *PITX1*, le membre supérieur se développe correctement. En cas de délétion, translocation ou duplication de *H2AFY*, l'environnement régulateur de *PITX1* est perturbé. *H2AFY* ne joue plus son rôle de barrière entre *PITX1* et son promoteur Pen : *PITX1* est donc exprimé de manière ectopique aux membres supérieurs par endoactivation (Figure 2 D et E, page 29). Les membres supérieurs acquièrent alors lors de la morphogenèse des caractéristiques propres aux membres inférieurs (24,25). Le syndrome de Liebenberg est donc un syndrome cliniquement très spécifique dont le mécanisme moléculaire sous-jacent est relativement bien compris.

**Figure 2 : Syndrome de Liebenberg : un syndrome cliniquement et radiologiquement reconnaissable, élucidé sur le plan moléculaire.**

(A) Photographies illustrant la malformation des membres supérieurs, tirées de l'article de Spielmann, 2012 (20) . Noter la déviation radiale des mains et l'élargissement des poignets.



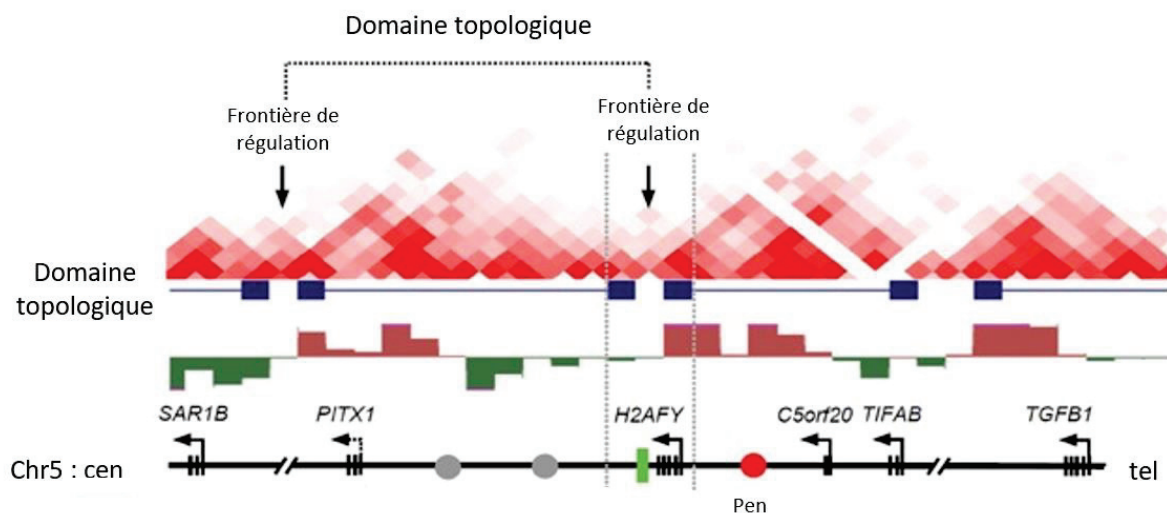
(B) Radiographies illustrant la malformation des coudes, tirées de l'article de Spielmann, 2013 (24). De profil, absence de l'olécrane chez les patients atteints du syndrome de Liebenberg. De face, élargissement de l'extrémité distale de l'humérus et de l'extrémité proximale de l'ulna qui entraîne une ressemblance du coude avec le genou.



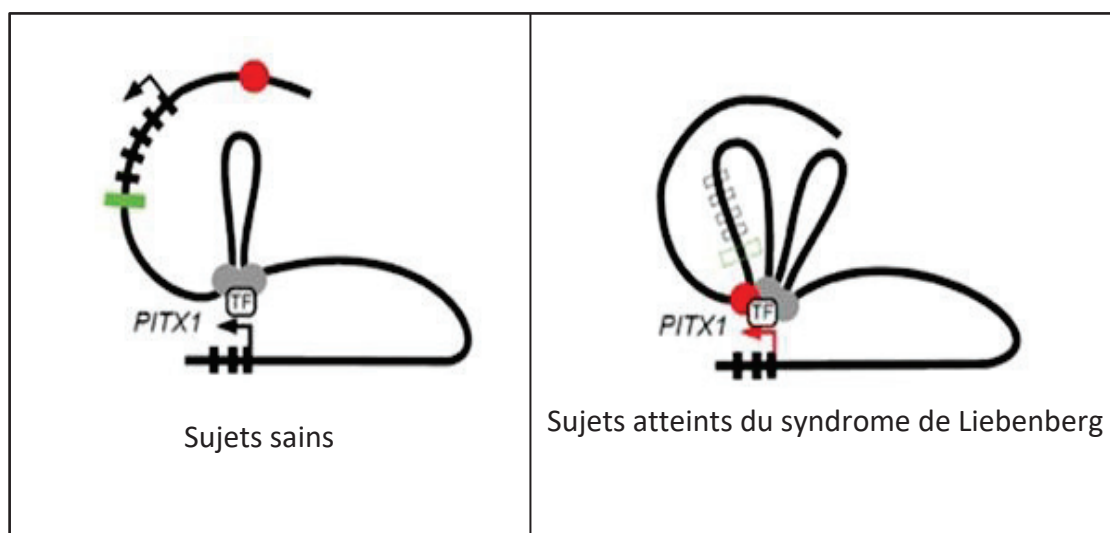
(C) Radiographies illustrant la malformation du carpe, tirées de l'article de Al-Quattan, 2013 (11). Le triquetrum et le pisiforme sont fusionnés et forment un os comparable au calcanéum. La partie distale du scaphoïde ressemble à la tête du talus et le lunatum ressemble au cuboïde.



(D) Domaines topologiques autour du gène *PITX1*, schéma tiré de l'article de Spielmann, 2013 (24). Physiologiquement, *H2AFY* (en vert) est un élément non codant cis-régulateur de *PITX1* qui agit aux membres supérieurs comme frontière de régulation. Il permet d'isoler *PITX1* de son promoteur principal Pen (en rouge). *PITX1* n'est donc pas exprimé.



(E) Dans le cas de patients atteints de syndrome de Liebenberg, *H2AFY* est délété ou déplacé et n'agit plus comme frontière de régulation, ce qui entraîne une expression pathologique de *PITX1*. Schéma tiré de l'article de Spielmann, 2013 (24).





Le syndrome « Pieds varus équins plus ou moins associés à une hémimélie tibiale et/ou une polydactylie préaxiale » avait été décrit en 2008 par Gurnett et son équipe chez une famille (12). Le cas index présente des pieds varus équins avec polydactylie préaxiale et une hémimélie tibiale (Figure 3A, page 31). D'autres membres de la famille présentent des anomalies malformatives des membres inférieurs : six ont des pieds varus équins, deux des talons obliques bilatéraux et trois une hypoplasie patellaire. La mutation p.E130K a été identifiée chez tous ces patients ainsi que chez certains membres conducteurs obligatoires asymptomatiques. Les études fonctionnelles sont en faveur d'un effet dominant négatif de cette mutation faux sens sur l'activité de *PITX1*.

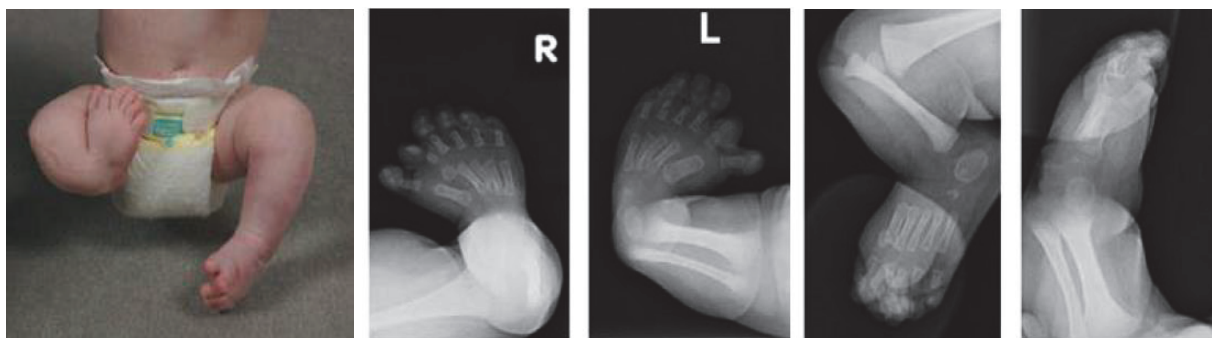
La même équipe a ensuite rapporté la description de 3 membres d'une même famille ayant des pieds varus équins et une petite taille (<-2DS) et une microdélétion de 241 kb incluant *PITX1* (Figure 3B, page 31) (13). De plus, une délétion dans *PITX1* de 35 nucléotides avec décalage du cadre de lecture (p.A256Rfs\*303) a été identifiée chez un patient avec pieds varus équins, polydactylie préaxiale et hémimélie tibiale (Figure 3C, page 32). Enfin, deux fœtus interrompus présentaient des pieds varus équins avec une polydactylie en miroir. L'un présentait de plus une hémimélie tibiale (Figure 3D, page 32) et le second présentait, entre autres, un ptérigium poplité bilatéral. Une délétion chromosomique, respectivement de 4,9 Mb et de 5,7 Mb incluant *PITX1*, a été retrouvé chez ces deux patients (14).

Il est à noter que Rosenfeld et son équipe ont rapporté trois patients porteurs de grandes délétions emportant *PITX1* (15). L'un d'entre eux, dont la délétion fait 8 Mb, a, entre autres, des pieds varus équins, une polydactylie préaxiale et une séquence de Pierre Robin. Néanmoins, compte tenu de la taille des délétions, ces patients présentent un tableau clinique beaucoup plus riche et pas spécifiquement évocateur d'un syndrome « Pieds varus équins plus ou moins associés à une hémimélie tibiale et/ou une polydactylie préaxiale ».

Le Tableau 2 (page 33) résume les caractéristiques principales des patients rapportés atteints d'un syndrome « Pieds varus équins plus ou moins associés à une hémimélie tibiale et/ou une polydactylie préaxiale ». Il est intéressant de noter que l'hypoplasie patellaire, le ptérigium poplité, la petite taille et la fente palatine, observés chez les patients que nous rapportons, ont été observés de manière inconstante dans ce syndrome (12–14).

**Figure 3 : Photographies et radiographies de la littérature de patients ayant un syndrome « Pieds varus équins plus ou moins associés à une hémimélie tibiale et/ou une polydactylie préaxiale ».**

**(A)** Pieds varus équins bilatéraux prédominant à droite, polydactylie préaxiale bilatérale et hémimélie tibiale droite chez le patient index de la famille décrite par Gurnett (12).



**(B)** Pieds varus équins isolés chez un patient de la famille décrite par Alvarado (13).





(C) Pieds varus équinus bilatéraux, polydactylie préaxiale bilatérale et hémimélie tibiale droite chez un patient décrit par Klopocki (14).



(D) Pieds varus équinus et polydactylie en miroir chez un fœtus mort-né à 34 semaines de gestation décrit par Klopocki (14).



**Tableau 2 : Caractéristiques principales des patients rapportés dans la littérature présentant le syndrome « Pieds varus équins plus ou moins associés à une hémimélie tibiale et/ou une polydactylie préaxiale ».**

	Une famille	Une famille	1 patient	1 fœtus (IMG à 18 SA)	1 fœtus (mort-né à 34SA)
Pieds varus équin	3/3	6/9	+	+	+
Polydactylie pré axiale	-	1/9	+	+	+
Hémimélie tibiale	-	1/9	+	+	-
Anomalie des genoux	-	3/9 avec luxation patellaire	-	-	Ptérigum poplité bilatéral
Petite taille (<-2DS)	3/3	-	-	-	-
Fente palatine	-	-	-	-	+
Autres malformations	-	-	-	-	Cardiomégalie, corps calleux hypoplasique, dysmorphie faciale
Anomalie moléculaire	Microdélétion de 241kb de <i>PITXI</i>	Mutation faux sens de <i>PITXI</i> : c. 388G>A p.E130K	c.765_799 del p.A256Rfs*303	Délétion de 4,9 Mb ( <i>PITXI</i> ) arr 5q31.1q31.2 (133 200 000- 138 080 000)x1 NCBI36/hg18	Délétion de 5,7 Mb ( <i>PITXI</i> ) arr 5q31.1q31.2 (132 560 606- 138 352 212)x1 NCBI36/hg18
Références	Alvarado, 2011 <sup>13</sup>	Gurnett, 2008 <sup>12</sup>	Klopocki, 2012 <sup>12</sup>	Klopocki, 2012 <sup>12</sup>	Klopocki, 2012 <sup>12</sup>

Des modèles animaux d'anomalies du gène *PITX1* ont été aussi rapportés. L'équipe de Szeto et celle de Lanctot ont étudié un modèle de souris KO pour le gène *Pitx1* (7,8). Le phénotype de ces souris *Pitx1*<sup>-/-</sup> est sévère et un grand nombre d'entre elles décède à la naissance.

Au niveau cranio-facial, la mandibule est hypoplasique avec un micro-rétrognathisme plus ou moins associé à une fente palatine et à une langue bifide. De plus, elles ont un pelvis et des pattes arrière plus petits, une agénésie patellaire et une plus petite taille. L'identité du membre inférieur de celles qui survivent est perturbée : l'extrémité proximale du tibia et de la fibula sont anormales et ont une morphologie comparable à l'extrémité proximale du radius et de l'ulna (figure 4 A et B, pages 35 et 36).

Pour Lanctot, l'ischion et le pubis est de petite taille, l'ilion est absent (figure 4 C, page 36).

Du fait de l'expression hypophysaire connue de *Pitx1*, Szeto et son équipe ont étudié les différents types cellulaires de l'hypophyse : les cellules gonadotropes et thyrotropes sont moins nombreuses, contrairement aux cellules corticotropes, relativement plus nombreuses.

Quant aux souris qui ont une inactivation du gène à l'état hétérozygote, ni Szeto ni Lanctot n'avaient décrit de phénotype associé (7,8). Toutefois, Alvarado a observé des pattes arrière en varus équin pour 8,9% d'entre elles. Il est associé à cette malformation une hypoplasie de l'artère péronière et une patte de plus petite taille due à une hypoplasie osseuse et musculaire. Ce sont aussi des souris qui sont plus petites que les souris contrôles.

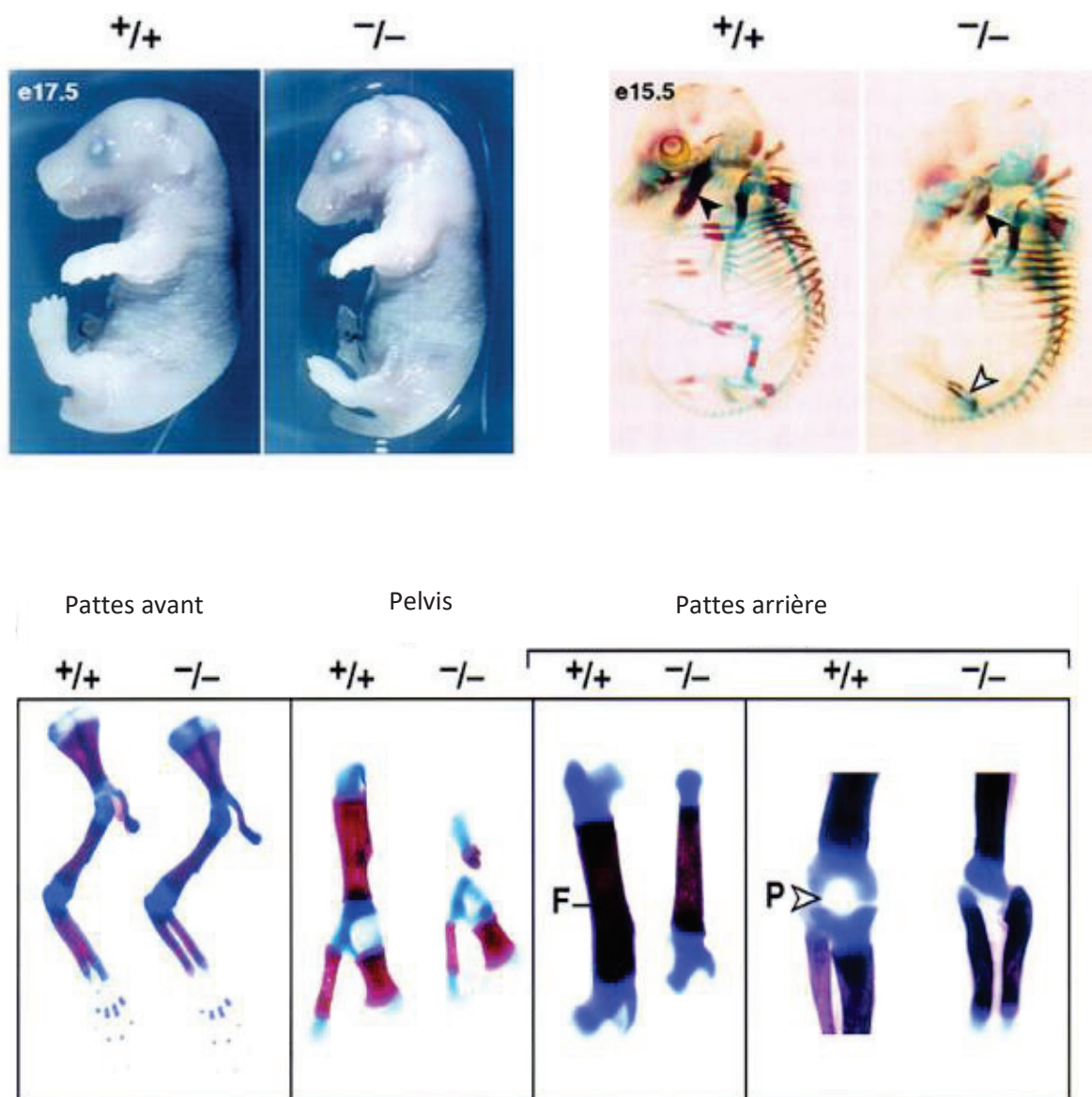
**Figure 4 :**

**Anomalies squelettiques (pelvis, pattes arrière, mandibule et maxillaire supérieur) chez les embryons de souris *Pitx1*  $-/-$ .**

(A) En haut : raccourcissement de la mandibule et des pattes arrière (respectivement la flèche noire et la flèche blanche) chez les souris *Pitx1*  $-/-$  ;

En bas : pattes avant sans anomalie, pelvis de petite taille, et au niveau des pattes arrière, fémur de petite taille et absence de rotule chez les souris *Pitx1*  $-/-$ .

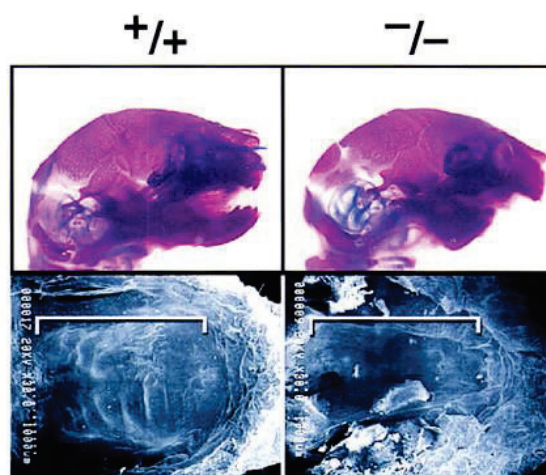
Figures tirées de l'article de Szeto, 1999 (7).



**(B)** En haut : réduction majeure de la taille de la mandibule mise en évidence après marquage osseux chez les souris *Pitx1*  $-/-$  ;

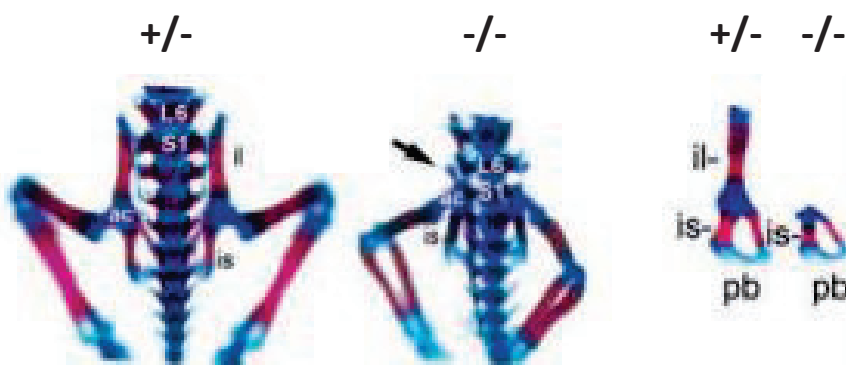
En bas : non fermeture du palais osseux mise en évidence par scanner à microscopie électronique du maxillaire supérieur (en crochet) chez les souris *Pitx1*  $-/-$

Figures tirées de l'article de Szeto, 1999 (7).



**(C)** A gauche, pelvis non disséqué chez la souris *Pitx1*  $-/-$  : absence de l'ilion (il). A droite, pelvis après dissection : absence d'ilion, diminution de la taille de l'ischion et du pubis

Figure tirée de l'article de Lanctot, 1999 (8).



Il est intéressant de noter que le phénotype osseux des souris dont le gène *Pitx1* est inactivé à l'état homozygote ressemble fortement au phénotype des trois patients rapportés dans la présente étude.

Même si la souris n'est pas un modèle complètement superposable à l'homme, sur la base de ces études sur modèle animal nous évoquons l'hypothèse pathogénique suivante : le syndrome « Pieds varus équins plus ou moins associés à une hémimélie tibiale et/ou une polydactylie préaxiale » pourrait être due à une perte de fonction du gène *PITX1* à l'état hétérozygote ou entraînant un effet dominant négatif modéré tandis que le syndrome que nous décrivons ici pourrait être dû à des mutations ayant un effet dominant négatif plus sévère.

Il est à noter qu'une mutation faux-sens au niveau de l'homéodomaine du gène *PITX2* avec effet dominant négatif a été décrite chez un patient qui présente un syndrome de Rieger plus sévère que le syndrome classiquement décrit (26). Il s'agit de la mutation p.K88E qui touche l'homéodomaine en position 50. Cet acide aminé interagit avec le cinquième et sixième nucléotide de la séquence TAATCC auquel la protéine à homéobox se lie. Les auteurs ont démontré que la protéine mutée ne se lie plus correctement à l'ADN secondairement à la modification stérique. Par conséquent, il y a un défaut de son activité trans-activatrice. De plus, ils suggèrent que la suppression de l'activité de la protéine sauvage par la protéine mutée peut être expliquée par la formation d'hétérodimère Pitx2 sauvage/Pitx2 muté.

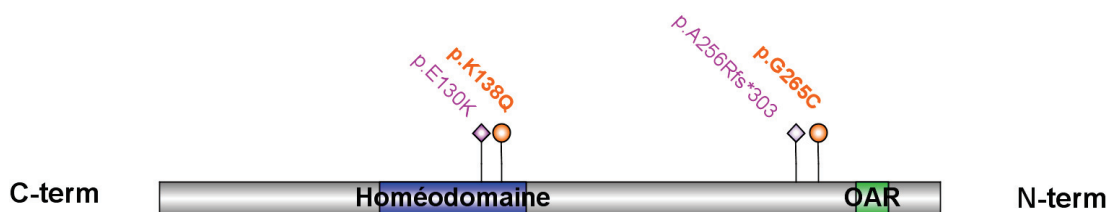
La mutation p.K138Q que nous rapportons change l'acide aminé à la même position 50 de l'homéodomaine de *PITX1* sur la troisième hélice  $\alpha$  qui est un acide aminé qui interagit avec l'ADN (Figure 5 A-B, page 38). Ce changement d'acide aminé modifie très probablement la conformation 3D de la protéine, ce qui pourrait perturber la liaison entre la protéine et l'ADN (Figure 5 C, page 39).

Des études fonctionnelles sont actuellement en cours dans le cadre d'une collaboration avec le service de génétique du CHRU de Lille, afin de caractériser les mécanismes pathogéniques du syndrome ici rapporté et de vérifier l'hypothèse évoquée.

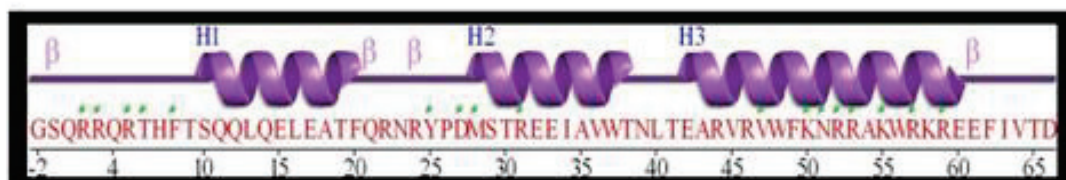
**Figure 5** : Localisation au niveau protéique des mutations de *PITX1* rapportées dans la présente étude et de celles décrites dans la littérature (A et B) et modélisation 3D de l'effet de la mutation p.K138Q en position 50 sur l'homéodomaine du gène *PITX1* (C).

(A) Localisation des mutations au niveau protéique : en orange la mutation p.G265C des patients 1 et 2 et la mutation p.K138Q du patient 3, en violet la mutation p.E130K du patient décrite par Gurnett en 2008 (12) et la mutation p.A256Rfs\*303 décrite par Klopinski en 2012 (14).

Les domaines fonctionnels : en bleu l'homéodomaine et en vert le domaine OAR.



(B) Localisation de la mutation p.K138Q du patient 3 au sein de l'homéodomaine de *PITX1* : la flèche indique que cette mutation est localisée en position 50 et est située au niveau de la troisième hélice alpha de l'homéodomaine; les points verts représentent les sites d'interaction avec l'ADN.



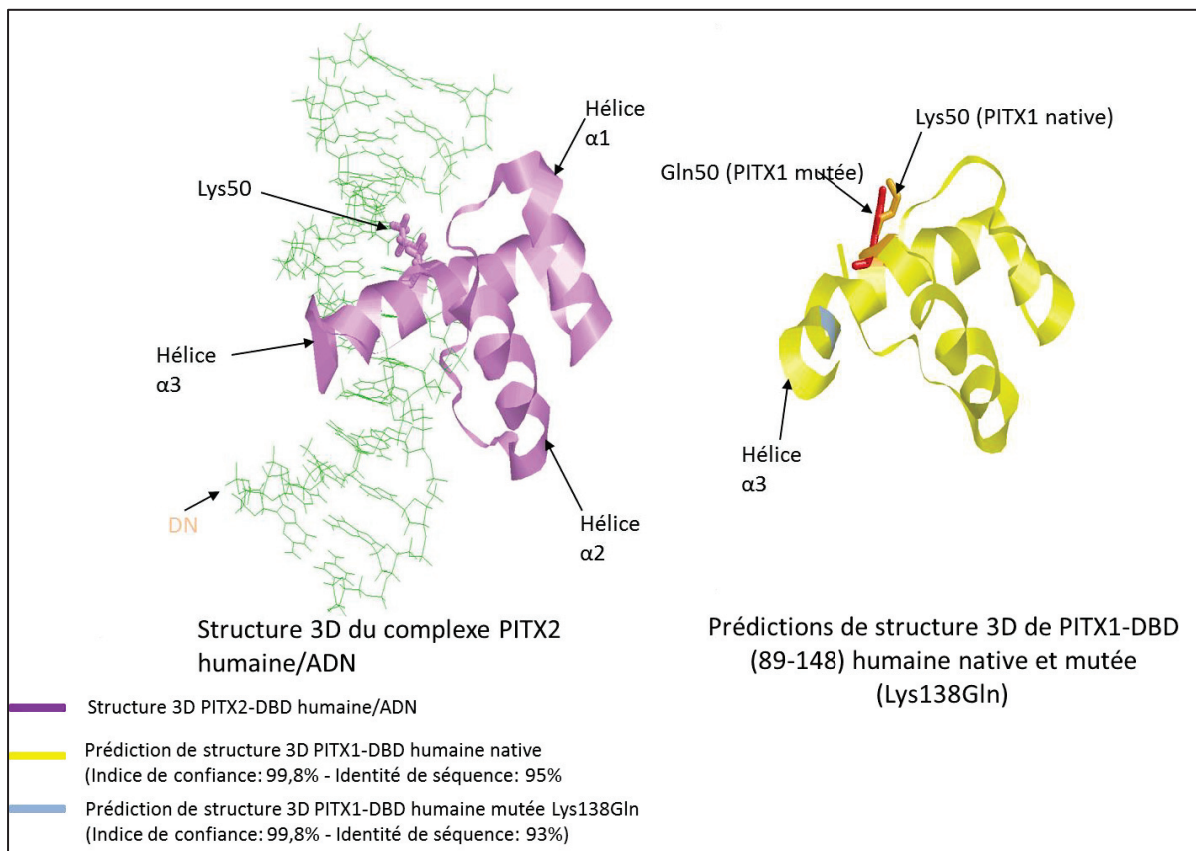
K138 en position 50 de l'homéodomaine



(C) Comparaison du DNA binding domain (DBD) de PITX2 humaine avec les prédictions de structure 3D du DBD de PITX1 humaine native et mutée p.K138Q :

A gauche : modélisation 3D du complexe formé par l'homéodomaine de *PITX2* (en violet) et l'ADN (en vert).

A droite : prédiction de la structure 3D de l'homéodomaine de *PITX1* ; en orange l'acide aminé K et en rouge l'acide aminé Q muté. Ce changement d'acide aminé à la position 50 de l'homéodomaine de *PITX1* modifie la conformation 3D de la protéine ce qui pourrait perturber la liaison entre la protéine et l'ADN.





Les pieds varus équins, la polydactylie en miroir ou préaxiale et l'hypoplasie/agénésie patellaire sont des malformations des membres inférieurs déjà associées à *PITX1*. Jusqu'alors l'atteinte du pelvis et de la mandibule observée chez la souris n'avait jamais été décrite chez l'homme. Nous rapportons la présentation clinique de trois patients qui confirme l'importance de *PITX1* dans le développement des membres inférieurs, mais aussi du pelvis et de la mandibule.

Il est intéressant de noter que les patients 1 et 3 présentent une cryptorchidie associée chez le patient 3 à un micropénis. Cela évoque l'hypothèse que ces anomalies du développement des organes génitaux masculins puissent faire partie du phénotype de ce syndrome.

*PITX1* est un facteur de transcription de nombreux gènes, dont *TBX4* et, probablement dans une moindre mesure, *SOX9*.

De manière intéressante, il existe quelques similarités phénotypiques avec les patients atteints du syndrome coxo-podo-ischio patellaire (OMIM 147891) causé par des mutations dans le gène *TBX4*. Ces patients présentent une hypoplasie-agénésie patellaire, des anomalies du bassin (ossification absente, retardée ou irrégulière de la jonction ischio pubienne, des incisures infra acétabulaires) et des anomalies des pieds (il existe un espace large entre le premier et le second orteil, le quatrième et cinquième rayons des pieds sont plus courts et les pieds peuvent être plats). Certains patients ont, de plus, une micrognathie et parfois une fente palatine associées (27–31).

En cas de mutation du gène *SOX9* ou de réarrangement chromosomique perturbant son expression, les patients présentent une dysplasie campomélique (OMIM 114290) associant des anomalies osseuses et extra osseuses. Ils présentent une dysmorphie faciale, des os longs courts et arqués, une hypoplasie des scapulas, une trachéomalacie engageant le pronostic vital, des anomalies du développement des organes génitaux masculins (hypospade, cryptorchidie, jusqu'à une réversion sexuelle complète) mais aussi d'autres signes communs au syndrome que nous décrivons ici : séquence de Pierre Robin et pieds bots varus équins. Certains patients ont aussi une hypoplasie patellaire, un pelvis de petite taille (notamment les ailes iliaques) ou un défaut d'ossification ischio-pubienne (32).

Un spectre commun d'anomalies du développement a été évoqué dans la littérature médicale pour les pathologies liées aux gènes *TBX4* et *SOX9* (33,34). Le syndrome que nous décrivons étend ce spectre aux pathologies liées à la voie *PITX1-TBX4-SOX9*, incluant

notamment des malformations des membres inférieurs (hypoplasie/agénésie patellaire, anomalies du bassin), une atteinte mandibulaire (séquence de Pierre Robin, micrognathie, fente palatine) et la possible présence d'anomalies des organes génitaux masculins.

Le diagnostic différentiel de la séquence de Pierre Robin et de l'hypoplasie/agénésie patellaire peut être complexe. La séquence de Pierre Robin peut se présenter de manière isolée ou dans le cadre de très nombreux tableaux syndromiques (35). Concernant l'hypoplasie/agénésie patellaire, plus de 35 syndromes sont rapportés dans la base de données London Medical Database. Le syndrome Nail Patella (OMIM 161200) et le syndrome RAPADILINO (OMIM 266280) sont par exemple élucidés sur le plan moléculaire (respectivement causés par des mutations de *LMX1B* et *RECQL4*) mais beaucoup d'autres ne le sont pas encore (36,37). L'association entre une micrognathie avec ou sans fente palatine et une hypo/aplasie rotulienne doit faire évoquer, dans le diagnostic différentiel, la possible présence d'une mutation du gène *PITX1*.

En conclusion, nous rapportons la caractérisation clinique et moléculaire d'un nouveau syndrome autosomique dominant, associant des anomalies du développement du premier arc branchial, des rotules et du pelvis ; une petite taille et une anomalie des organes génitaux masculins peuvent également s'associer.

Nous proposons pour cette pathologie le nom de syndrome MPP (Mandibular-Pelvic-Patellar syndrome). Ce syndrome est cliniquement reconnaissable ce qui permet de l'évoquer en consultation et, en cas de confirmation moléculaire, d'apporter un conseil génétique adapté.

Cette étude étend le spectre des pathologies liées aux mutations du gène *PITX1* et évoque un spectre commun d'anomalies du développement liées à la voie *PITX1-TBX4-SOX9*.

Nous poursuivons actuellement ce projet avec la réalisation d'études fonctionnelles en collaboration avec le Service de génétique du CHRU de Lille, afin de caractériser les mécanismes pathogéniques spécifiques de cette pathologie par rapport aux autres pathologies alléliques comme le syndrome de Liebenberg et le syndrome « Pieds varus équins plus ou moins associés à une hémimélie tibiale et/ou une polydactylie préaxiale ».

## I.5. BIBLIOGRAPHIE

1. Tickle C. How the embryo makes a limb: determination, polarity and identity. *J Anat.* oct 2015;227(4):418-30.
2. Duboc V, Logan MPO. Pitx1 is necessary for normal initiation of hindlimb outgrowth through regulation of Tbx4 expression and shapes hindlimb morphologies via targeted growth control. *Development.* 15 déc 2011;138(24):5301-9.
3. Wang JS, Infante CR, Park S, Menke DB. PITX1 promotes chondrogenesis and myogenesis in mouse hindlimbs through conserved regulatory targets. *Developmental Biology.* 1 févr 2018;434(1):186-95.
4. Logan M, Tabin CJ. Role of Pitx1 upstream of Tbx4 in specification of hindlimb identity. *Science.* 12 mars 1999;283(5408):1736-9.
5. DeLaurier A, Schweitzer R, Logan M. Pitx1 determines the morphology of muscle, tendon, and bones of the hindlimb. *Dev Biol.* 1 nov 2006;299(1):22-34.
6. Szeto DP, Rodriguez-Esteban C, Ryan AK, O'Connell SM, Liu F, Kioussi C, et al. Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. *Genes Dev.* 15 févr 1999;13(4):484-94.
7. Lanctôt C, Moreau A, Chamberland M, Tremblay ML, Drouin J. Hindlimb patterning and mandible development require the Ptx1 gene. *Development.* mai 1999;126(9):1805-10.
8. Drouin J, Lamolet B, Lamonerie T, Lanctôt C, Tremblay JJ. The PTX family of homeodomain transcription factors during pituitary developments. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 25 mai 1998;140(1):31-6.
9. Shapiro MD, Bell MA, Kingsley DM. Parallel genetic origins of pelvic reduction in vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA.* 12 sept 2006;103(37):13753-8.
10. Liebenberg F. A pedigree with unusual anomalies of the elbows, wrists and hands in five generations. *S Afr Med J.* 5 mai 1973;47(17):745-8.
11. Al-Qattan MM, Al-Thunayan A, Alabdulkareem I, Al Balwi M. Liebenberg syndrome is caused by a deletion upstream to the PITX1 gene resulting in transformation of the upper limbs to reflect lower limb characteristics. *Gene.* 15 juill 2013;524(1):65-71.
12. Gurnett CA, Alae F, Kruse LM, Desruisseau DM, Hecht JT, Wise CA, et al. Asymmetric Lower-Limb Malformations in Individuals with Homeobox PITX1 Gene Mutation. *The American Journal of Human Genetics.* 17 nov 2008;83(5):616-22.
13. Alvarado DM, McCall K, Aferol H, Silva MJ, Garbow JR, Spees WM, et al. Pitx1 haploinsufficiency causes clubfoot in humans and a clubfoot-like phenotype in mice. *Hum Mol Genet.* 15 oct 2011;20(20):3943-52.

14. Klopocki E, Kähler C, Foulds N, Shah H, Joseph B, Vogel H, et al. Deletions in *PITX1* cause a spectrum of lower-limb malformations including mirror-image polydactyly. *European Journal of Human Genetics*. juin 2012;20(6):705-8.
15. Rosenfeld JA, Drautz JM, Clericuzio CL, Cushing T, Raskin S, Martin J, et al. Deletions and duplications of developmental pathway genes in 5q31 contribute to abnormal phenotypes. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2011;155(8):1906-16.
16. Krahn M, Sanlaville D, *Génétique médicale : Enseignement thématique*. 1<sup>e</sup> ed. Elsevier Masson; 2016
17. GeneMatcher (GM) [Internet]. Disponible sur: <https://genematcher.org/>
18. Sobreira N, Schiettecatte F, Valle D, Hamosh A. GeneMatcher: A Matching Tool for Connecting Investigators with an Interest in the Same Gene. *Hum Mutat*. oct 2015;36(10):928-30.
19. Bruel A-L, Vitobello A, Mau-Them FT, Nambot S, Duffourd Y, Quéré V, et al. 2.5 years' experience of GeneMatcher data-sharing: a powerful tool for identifying new genes responsible for rare diseases. *Genetics in Medicine*. 19 déc 2018;1.
20. Spielmann M, Brancati F, Krawitz PM, Robinson PN, Ibrahim DM, Franke M, et al. Homeotic arm-to-leg transformation associated with genomic rearrangements at the *PITX1* locus. *Am J Hum Genet*. 5 oct 2012;91(4):629-35.
21. Mennen U, Mundlos S, Spielmann M. The Liebenberg syndrome: in depth analysis of the original family. *J Hand Surg Eur Vol*. nov 2014;39(9):919-25.
22. Kragestein BK, Brancati F, Digilio MC, Mundlos S, Spielmann M. H2AFY promoter deletion causes *PITX1* endoactivation and Liebenberg syndrome. *J Med Genet*. avr 2019;56(4):246-51.
23. Seoighe DM, Gadancheva V, Regan R, McDaid J, Brenner C, Ennis S, et al. A chromosomal 5q31.1 gain involving *PITX1* causes Liebenberg syndrome. *Am J Med Genet A*. nov 2014;164A(11):2958-60.
24. Spielmann M, Mundlos S. Structural variations, the regulatory landscape of the genome and their alteration in human disease. *Bioessays*. juin 2013;35(6):533-43.
25. Kragestein BK, Spielmann M, Paliou C, Heinrich V, Schöpflin R, Esposito A, et al. Dynamic 3D chromatin architecture contributes to enhancer specificity and limb morphogenesis. *Nat Genet*. oct 2018;50(10):1463-73.
26. Saadi I, Semina EV, Amendt BA, Harris DJ, Murphy KP, Murray JC, et al. Identification of a dominant negative homeodomain mutation in Rieger syndrome. *J Biol Chem*. 22 juin 2001;276(25):23034-41.
27. Azouz EM, Kozlowski K. Small patella syndrome: a bone dysplasia to recognize and differentiate from the nail-patella syndrome. *Pediatr Radiol*. mai 1997;27(5):432-5.
28. Bongers EM, Van Bokhoven H, Van Thienen MN, Kooyman MA, Van Beersum SE, Boetes C, et al. The small patella syndrome: description of five cases from three

- families and examination of possible allelism with familial patella aplasia-hypoplasia and nail-patella syndrome. *J Med Genet.* mars 2001;38(3):209-14.
29. Habboub HK, Thneibat WA. Ischio-pubic-patellar hypoplasia: is it a new syndrome? *Pediatr Radiol.* mai 1997;27(5):430-1.
  30. Kozlowski K, Nelson J. Small patella syndrome. *Am J Med Genet.* 17 juill 1995;57(4):558-61.
  31. Offiah AC, Mansour S, McDowall S, Tolmie J, Sim P, Hall CM. Surviving campomelic dysplasia has the radiological features of the previously reported ischio-pubic-patella syndrome. *J Med Genet.* sept 2002;39(9):e50.
  32. Unger S, Scherer G, Superti-Furga A. Campomelic Dysplasia. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Stephens K, et al., éditeurs. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cité 9 mai 2019]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1760/>
  33. Mansour S, Offiah A, McDowall S, Sim P, Tolmie J, Hall C. The phenotype of survivors of campomelic dysplasia. *J Med Genet.* août 2002;39(8):597-602.
  34. Matsushita M, Kitoh H, Kaneko H, Mishima K, Kadono I, Ishiguro N, et al. A novel SOX9 H169Q mutation in a family with overlapping phenotype of mild campomelic dysplasia and small patella syndrome. *Am J Med Genet A.* oct 2013;161A(10):2528-34.
  35. Côté A, Fanous A, Almajed A, Lacroix Y. Pierre Robin sequence: review of diagnostic and treatment challenges. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* avr 2015;79(4):451-64.
  36. Bongers E, Van Kampen A, Van Bokhoven H, Knoers N. Human syndromes with congenital patellar anomalies and the underlying gene defects. *Clinical Genetics.* 1 oct 2005;68(4):302-19.
  37. Vanlerberghe C, Boutry N, Petit F. Genetics of patella hypoplasia/agenesis. *Clinical Genetics.* 2018;94(1):43-53.
  38. Seoighe DM, Gadancheva V, Regan R, McDaid J, Brenner C, Ennis S, et al. A chromosomal 5q31.1 gain involving *PITX1* causes Liebenberg syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A.* nov 2014;164(11):2958-60.

## II. DEUXIEME PARTIE

English article for submission in “Journal of medical genetics” (short report)

A new recognizable syndrome caused by mutations in the *PITXI* gene.

Godelieve Morel 1,2, Céline Duhamel 3, Gaetan Lesca 2,4, Nicolas Chatron 2,4, Audrey Labalme 2, Thomas Simonet 5, Damien Sanlaville 2,4, Julien Thevenon 6, Laurence Faivre 7, Alice Fassier 8, Fabienne Escande 3,9, Florence Petit 3,10, Sylvie Manouvrier 3,10, Patrick Edery 2,4, David Geneviève 11#, Massimiliano Rossi 2,4#.

1) Service de génétique, Centre de compétence Anomalies du Développement, CHU de Nice, Archet 2, France

2) Service de génétique, Centre de Référence Anomalies du Développement et Centre de Compétence Maladies Osseuses Constitutionnelles, Hospices Civils de Lyon, Bron, France

3) EA7364 Université de Lille

4) INSERM U1028, CNRS UMR5292, Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, GENDEV Team, Bron, France

5) Service de Biostatistique-Bioinformatique, CNRS UMR5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, Equipe Biostatistique Santé, Villeurbanne, et Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

6) Service de Génétique, CHU de Grenoble, site Nord, France

7) Service de Génétique et Centre de Référence Anomalies du Développement, Hôpital d'Enfants, CHU de Dijon, France

8) Service d'orthopédie pédiatrique, Centre de Compétence Maladies Osseuses Constitutionnelles, Hospices Civils de Lyon, Bron, France.

9) Institut de Biochimie et Génétique moléculaire, CBP, CHU de Lille

10) Clinique de Génétique médicale, Hôpital Jeanne de Flandre, CHU de Lille et EA7364  
Université de Lille

11) Département de génétique, maladies rares et médecine personnalisée, Centre de Référence  
Maladies Rares SORO, Inserm U1183, Université Montpellier, CHU Montpellier, France

# Equal contribution

**Running title:** « A novel *PITX1*-related syndrome »

**Keywords:** PITX1 ; Micrognathia ; Knee flexum deformity ; Patellar agenesis/hypoplasia ;  
Pelvis anomalies ; Limb morphogenesis, ; Autosomal dominant ; Missense mutation.

**Abbreviations:** WES, Whole Exome Sequencing, OFC, Occipital Frontal Circumference; SD,  
Standard Deviation ; USS, Ultra Sounds Scan ; CMA, Chromosomal Micro-Array ; MRI,  
Magnetic Resonance Imaging, TAD, Topologically Associated Domain.

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** *PITX1* (OMIM 602149) is a transcription factor essential for hindlimb morphogenesis. Two *PITX1*-related human disorders have been reported to date. First, the Liebenberg syndrome (OMIM 186550), due to *PITX1* ectopic expression, characterized by the presence of malformed upper limbs showing a “lower limbs appearance”. Secondly, a syndromic picture including clubfoot, the possible presence of right tibial hemimelia and preaxial polydactyly (OMIM 119800) due to *PITX1* deletions or point mutation. Interestingly, the *Pitx1*<sup>-/-</sup> mouse model shows a distinct phenotype including small mandible and cleft palate, hypoplastic pelvis, and patellar agenesis.

**OBJECTIVE:** To report the clinical and molecular characterization of a novel syndrome due to *PITX1* mutations.

**RESULTS:** Patient 1 presented with micrognathia, knee flexum deformity, prenatal onset short stature and urogenital anomalies. His mother (patient 2) showed similar skeletal abnormalities. Patient 3 was an unrelated child presenting with Pierre-Robin sequence, severe knee flexum deformity and genital abnormalities. Radiological features for all of them included mandibular hypoplasia; patellar hypo/aplasia; and pelvis abnormalities such as narrow iliac wings (2/3) and ischiopubic branch hypoplasia (1/3).

Whole exome sequencing detected *PITX1* heterozygous missense mutations: c.793G>T in patient 1 and de novo in patient 2; c.412A>C in patient 3 and in a mosaic status (6% in blood cells) in his asymptomatic father.

**DISCUSSION:** The patients here reported show a novel distinct recognizable syndrome including first branchial arch, patellar and pelvic developmental abnormalities, possibly associated with short stature and male genital anomalies. We propose to name this condition Mandibular-Pelvic-Patellar syndrome (MPP syndrome). The inheritance pattern is autosomal dominant.

*PITX1* closely interacts with *TBX4* and *SOX9* which act as downstream targets; interestingly, MPP syndrome show a partial phenotypic overlap with the Small patella syndrome (OMIM 147891), caused by mutations in the *TBX4* gene, and the Camptomelic dysplasia due to *SOX9* anomalies. Our study expands the spectrum of *PITX1*-related syndromes and suggests a common pattern of developmental abnormalities in disorders of the *PITX1-TBX4-SOX9* signaling pathway.



## INTRODUCTION

The *PITX1* gene (paired-like homeodomain transcription factor 1, OMIM 602149) codes for a bicoid class of homeodomain proteins. PITX1 is an important transcription factor containing homeobox, mostly expressed in the lateral mesenchyme and developing hindlimb bud, the pituitary gland and the derivatives of the first branchial arch. This gene plays, among others, an essential role in hindlimb morphogenesis (1). Two main *PITX1*-related syndromes have been reported to date. First, the Liebenberg syndrome (OMIM 186550), due to *PITX1* ectopic expression, is characterized by the presence of malformed upper limbs showing a “lower limbs appearance” (2-3). Secondly *PITX1* deletions or point mutation cause a syndrome characterized by clubfoot possibly associated with right tibial hemimelia and preaxial polydactyly (OMIM 119800) (4-7).

We report the clinical and molecular characterization of a previously undescribed syndrome characterized by mandibular, patellar and pelvic abnormalities, observed in a family (mother and son) and an unrelated child, due to missense mutations in the *PITX1* gene.

## SUBJECTS AND METHODS

### Subjects

The 3 patients were evaluated by clinical geneticists in two French Referral Centers for developmental abnormalities (Lyon and Montpellier). Specific written informed consent was obtained from the two families.

### Whole Exome Sequencing (WES)

Concerning patient 1 and 2, exome capture was performed using SureSelect Clinical Research Exome kit (Agilent). The resulting libraries were paired-end sequenced (2X150 bp) on a NextSeq 500 (Illumina).

Concerning patient 3, genomic DNA was captured using Agilent in-solution enrichment methodology (SureSelect Human All Exon Kits Version 5, Agilent) with their biotinylated oligonucleotides probes library (Human All Exon v5 – 50 Mb, Agilent), followed by paired-end 75 bases massively parallel sequencing on Illumina HiSEQ 2500.

## RESULTS

### Patient 1.

Patient 1 was the first child of unrelated parents. The pregnancy was characterized by intrauterine growth restriction and polyhydramnios. Amniocentesis was performed and standard karyotype was normal. The child was born at term by caesarean section. At birth, his weight was 2440g (<3th centile), his length was 45.5 cm (<3th centile) and his occipital-frontal circumference (OFC) was 34.3cm (30th centile). Micro-retrognathia with feeding difficulties and bilateral cryptorchidism were noted, as well as flexion deformity of the knees requiring physical therapy and splints. Psychomotor development was strictly normal: the child started sitting at the age of 7 months, he started walking at the age of 17 months, on tiptoes due to equinovarus feet. Speech was normal. He underwent surgical intervention twice for cryptorchidism at the age of 15 months and 5 years.

The child was reviewed at the age of 3 years and 8 months. On clinical examination, his OFC was 50 cm (-0.5SD), his height was 89.5 cm (-2.5SD) and his weight was 12.400 kg (3th centile). Dysmorphic features were noted including micrognathia, a thin nose, narrow palpebral fissures, low-set ears, limitation of knees extension, hyperlordosis, and equinus deformity of the feet. Upper limbs were normal. He was referred to an endocrinologist because of short stature and undescended testes. At 5 years and 7 months, bone age was evaluated to 3.5 years and hormonal tests ruled out growth hormone deficiency. Anti-Müllerian Hormone blood levels were low (300 pmol/L, normal range: 441-2352), suggesting possible testicular dysfunction. A skeletal survey showed a small mandible with a striking mandibular obtuse angle, narrow iliac wings and absence of patellar ossification. Echocardiography was normal. Renal ultrasounds scan (USS) revealed left kidney hypoplasia; renal function tests showed mild stable renal insufficiency (blood creatinine level: 57  $\mu$ mol/L); 200 kb chromosomal microarray (CMA) ruled out cryptic chromosomal imbalance.

He was reviewed at the age of 7 years and 5 months. His OFC was 52.5 cm (M), his height was 112 cm (-2SD) and his weight was 19 kg (12th centile). Knees X-rays confirmed the patellar hypoplasia. He attended mainstream school (Figure 1A).

Whole Exome Sequencing found a c.793G>T heterozygous missense mutations in *PITX1* gene (p.Gly265Cys) (Chr5(GRCh37):g.134364621C>A, NM\_002653), confirmed by Sanger sequencing.

### Patient 2.

Patient 1's mother showed a similar phenotype. She was born to healthy unrelated parents. Her intra uterine development was marked by growth retardation. She was born at term; her birth weight was 2200 g (<3th centile). She had micrognathia requiring orthodontic appliance. Short stature was noted, and the patient had growth hormone treatment from the age of 7 years to 17 years. She had hyperlordosis requiring corset and knees instability due to patellar hypoplasia requiring left trochleoplasty. She gave birth by cesarean section due to a narrow pelvis. At the age of 33 years, her height was 160 cm. Dysmorphic features included narrow palpebral fissures, micrognathia and a thin nose. A skeletal survey showed micrognathia and narrow iliac wings (Figure 1B). *PITX1* molecular analysis showed the same c.793G>T heterozygous missense mutation found in her son. Her parents did not carry the familial mutation.

### Patient 3.

This boy was the first and only child born from unrelated parents after in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection. Parents had previously had one abortion for Down's syndrome and two miscarriages. Pregnancy was normal. He was born at 38 weeks and 3 days of gestation by cesarean section for abnormal fetal rhythm. Birth parameters were within the normal range: weight was 3130g (47th centile); length was 49 cm (47th centile) and OFC was 33cm (17th centile).

At birth, Pierre Robin Sequence was noticed as well as micropenis, bilateral cryptorchidism, and severe knee flexion deformity. A patellar agenesis was confirmed by USS and skeletal X-rays also revealed ischiopubic branch hypoplasia (Figure 1C).

He was reviewed at the age of 6 years. His weight was 16,8 kg (-1.5 SD), his height was 113 cm (M) and his OFC was 51,2 cm (-0.5 SD). He attended mainstream school, but he was unable to walk alone due to the severe knee flexion deformity, in spite of several surgical interventions.

Knee Magnetic Resonance Imaging (MRI), performed at the age of 2 years and 10 months, confirmed the agenesis of patella as well as of the central pivot and meniscus of both knees. The extensor apparatus was exclusively tendinous and was dislocated laterally on the right side and subluxed in an antero-lateral situation on the left side. Heart and renal USS as well as CMA were normal (Figure 1C).

WES showed the presence of c.412A>C (p.Lys138Gln) mutation in *PITX1* gene (Chr5(GRCh37):g.134365002T>G, NM\_002653.4), which was confirmed by Sanger sequencing. *PITX1* molecular analysis showed the presence of the c.412A>C mutation in patient 3's asymptomatic father in a mosaic status (6% of blood cells).

These two missense variants found in these three patients are predicted “disease causing” by the SIFT and Mutation taster software and “probably pathogenic” by Polyphen-2 (with a score respectively to 1 and 0,997); the involved nucleotides are well conserved among species.

## DISCUSSION

In this paper we report the clinical and molecular characterization of a previously undescribed syndrome characterized by craniofacial, pelvis and knee developmental abnormalities due to *PITX1* missense mutations. We propose to name this condition Mandibular-Pelvic-Patellar syndrome (MPP syndrome).

*PITX1* codes for a transcription factor mostly expressed in the lateral mesenchyme and the developing hindlimb bud, the pituitary gland and the derivatives of the first branchial arch. This gene plays an essential role in hindlimb morphogenesis by interacting with various regulatory elements including those of *TBX4* and *SOX9* (1,8).

*PITX1* is part of a bicoid-related homeobox-gene family, including also *PITX2* (OMIM 601542) and *PITX3* (OMIM 602669). *PITX2* and *PITX3* are also involved in autosomal dominant human diseases. *PITX2* mutations caused Axenfield-Rieger syndrome, anterior segment dysgenesis or ring dermoid of cornea and *PITX3* lead to cataract or multiple subtypes of anterior segment dysgenesis.

Two main *PITX1*-related syndromes have been reported to date. The Liebenberg syndrome (OMIM 186550), characterized by malformations of upper limbs acquiring radiological features similar to lower limbs, is caused by 5q31.1 rearrangements involving putative *PITX1* regulatory elements. Several genomic rearrangements were described: 8,5 to 275 kb deletions upstream to *PITX1* (3,9-11), duplication including *PITX1* (12), translocation (whose breakpoint is located upstream to *PITX1*) (9). All these structural genomic anomalies lead to a disruption of a regulatory landscape Topologically Associated Domain (TAD) by deletion or removal of

the *H2AFY* insulator. This results in an ectopic expression of *PITX1*, stimulated by the Pan-limb enhancer (*Pen*), in the forelimb buds, which explains the development of “lower limb morphology” (13).

“Congenital clubfoot with or without deficiency of long bones and/or mirror-image polydactyly syndrome” (OMIM 119800) was reported by Gurnett and al. for the first time (4). The reported patient had bilateral clubfeet with preaxial polydactyly and right-sided tibial hemimelia. Among the 8 other patients of the same family, 5 have clubfeet, and 3 have patellar hypoplasia. The p.E130K was identified in all the affected family members as well as in some asymptomatic obligate carriers, suggesting incomplete penetrance. Functional analyses supported the hypothesis of a dominant negative effect. Similarly, Alvarado described a 241 kb microdeletion identified in patients from a 3 generations family presenting with isolated clubfoot (5). A *PITX1* intragenic deletion (c.765\_799del, p.A256R\*303) was found in a patient with bilateral preaxial polydactyly, equinus talipes and right-sided hemimelia (6). Two fetuses described by Klopocki had talipes equinovarus and mirror-image polydactyly. Moreover, one of them had left single lower leg bone and the second a popliteal pterygium. These patients carried deletions of respectively 4,9 and 5,7 Mb including *PITX1*. Finally, Rosenfeld reported a few patients carrying large deletions including *PITX1* and clinically presenting with various multiple congenital abnormalities. Interestingly, one patient, harboring an 8Mb deletion, showed a complex phenotype including bilateral clubfeet, preaxial polydactyly and Pierre Robin sequence (15). The “congenital clubfoot with or without deficiency of long bones and/or mirror-image polydactyly syndrome” is therefore due to either *PITX1* haploinsufficiency or a point mutation with dominant negative effect.

Various *PITX1* mouse models have been reported. Szeto and al. reported a *Pitx1* *-/-* mouse showing a distinct phenotype including reduced pelvis size, patellar agenesis, mandibular hypoplasia and a cleft palate (14). Because *Pitx1* is expressed in the pituitary gland, these authors studied the mice pituitary cell types and demonstrated a reduction of gonadotrope and thyrotrope cell. Interestingly, 8,9 % of *Pitx1**-/+* mice showed clubfoot-like features (5).

The phenotype of the three patients reported in the present study shows striking similarities to the *Pitx1**-/-* mouse model. Therefore, we speculate that the p.K138Q and the p.G265C mutations might lead to a dominant-negative effect more severe than the p.E130K mutation described by Gurnett et al. The localization of the *PITX1* missense mutations reported to date is shown in figure 1D. Interestingly, the *PITX2* p.K88E missense mutation has been described

in association with a severe form of Rieger syndrome (15). This mutation causes a dominant-negative effect and it is located in the homeodomain at position 50, which is the same position of the *PITX1* p.K138Q mutation. This mutation may change the 3D homeodomain conformation and disrupt the *PITX1* DNA binding (Figure 1E-F). Functional analyses are currently ongoing in order to clarify the pathogenic mechanisms of the MPP syndrome.

The clinical phenotypes of Liebenberg syndrome and the “Congenital clubfoot with or without deficiency of long bones and/or mirror-image polydactyly syndrome” emphasize the important role of *PITX1* in limbs development. Our report also confirms its essential role in the development of the mandible, pelvis and male genitalia. The main features of the *PITX1*-related disorders are summarized in Table 1.

*PITX1* closely interacts with *TBX4* and *SOX9* (1,8). It is interesting to point out that MPP shows a phenotypic overlap with Small patella syndrome (OMIM 147891), which is caused by mutations in *TBX4*. Patients affected by Small patellar syndrome present with patellar agenesis or hypoplasia, pelvic anomalies (notably ischiopubic branches hypoplasia), and feet abnormalities; the possible presence of micrognathia and cleft palate has also been reported (16). MPP syndrome also displays a partial clinical overlap with Campomelic dysplasia (OMIM 114290), caused by *SOX9* mutations or chromosomal rearrangements involving *SOX9* regulatory elements (17,18). The phenotype of this condition includes dysmorphic facial features, bowed femora, hypoplastic scapula, as well as abnormal development of male genitalia, the possible presence of clubfoot, patellar hypoplasia, Pierre Robin sequence, and pelvic abnormalities. Hence, a common pattern of developmental abnormalities affecting mandible, pelvis, lower limbs and male genitalia is observed in disorders of the *PITX1-TBX4-SOX9* pathway.

Pierre Robin sequence can be isolated or part of several syndromic pictures (19). Patellar agenesis/hypoplasia is reported in more than 35 syndromes included in the London medical Database. The association between these two developmental abnormalities should suggest, in the differential diagnosis, the hypothesis of MPP syndrome.

In conclusion, we report the clinical and molecular characterization of a novel distinct recognizable syndrome including first branchial arch, patellar and pelvic developmental abnormalities, possibly associated with short stature and male genital anomalies. We propose to name this condition Mandibular- Pelvic-Patellar (MPP) syndrome. The inheritance pattern is autosomal dominant. Our study expands the spectrum of the *PITX1*-related syndromes and

suggests a common pattern of developmental abnormalities in disorders of the *PITX1-TBX4-SOX9* signaling pathway.

Figure 1: Clinical and molecular characterizations of the patient 1, 2 and 3.

**(A-C) Clinical and radiological phenotypes.**

(A) Patient 1 aged 3 years and 8 months: note hyperlordosis and flexion deformity of the knees. At 6 years and 6 months of age, note dysmorphic facial features including micrognathia, a thin nose, narrow palpebral fissures and low-set ears. X-rays performed at the age of 3 years and 8 months showing hypoplastic mandible and narrow iliac wings. Knee X-rays performed at the age of 7 years showing a severe delay of patellar ossification.

(B) X-ray of patient 2: note hyperlordosis and narrow iliac wings

(C) Patient 3 in the neonatal period and at 6 years of age: note cleft palate, micrognathia, narrow palpebral fissures and knee flexion deformity. X rays performed in the neonatal period: note delayed ossification of ischiopubic branches. Knee MRI performed at the age of 2 years and 10 months: note patellar agenesis.

**(D) DNA localization of *PITX1* mutations.**

In orange mutations of our patients and in purple, mutations from patients of the literature.

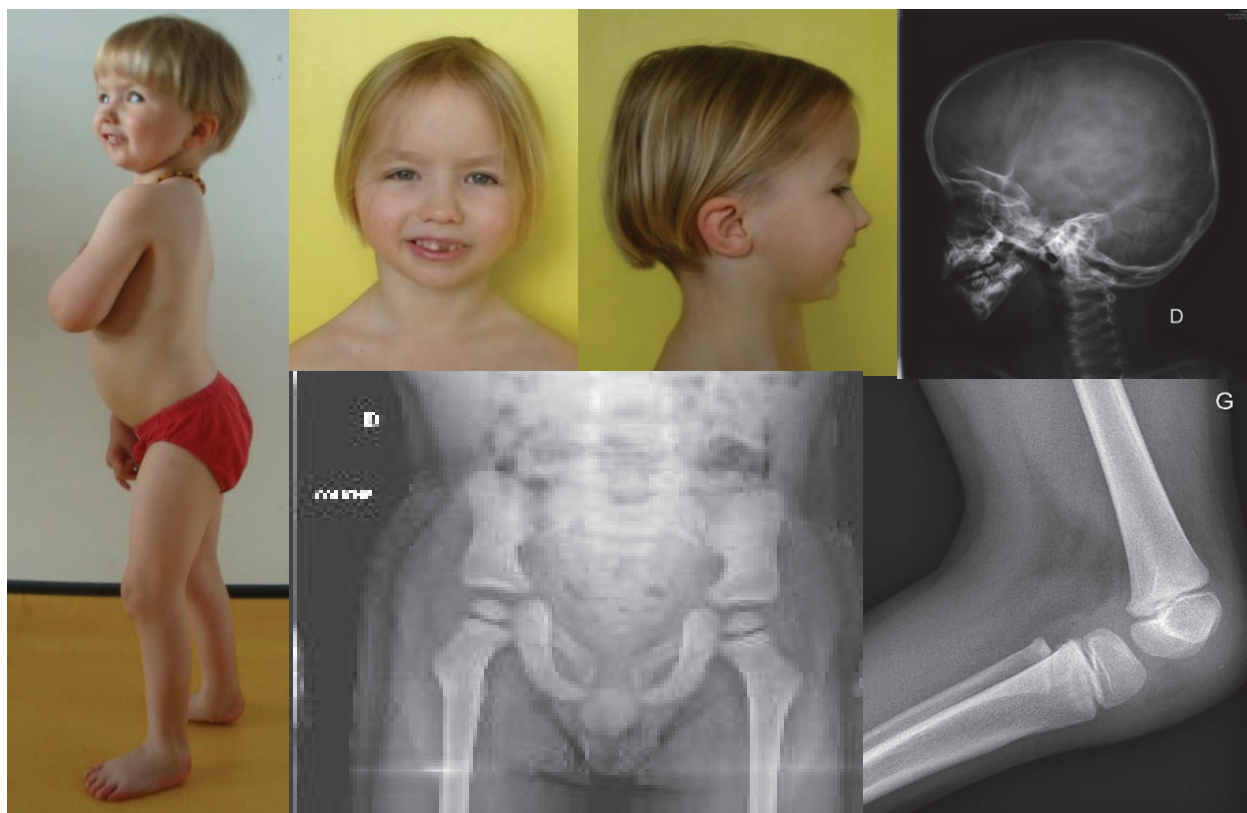
**(E-F) DNA and protein localization of the p.K138Q.**

(E) The p.K138Q mutation is located on the  $\alpha 3$  helix at the homeodomain position 50. The green dots indicate DNA interaction sites.

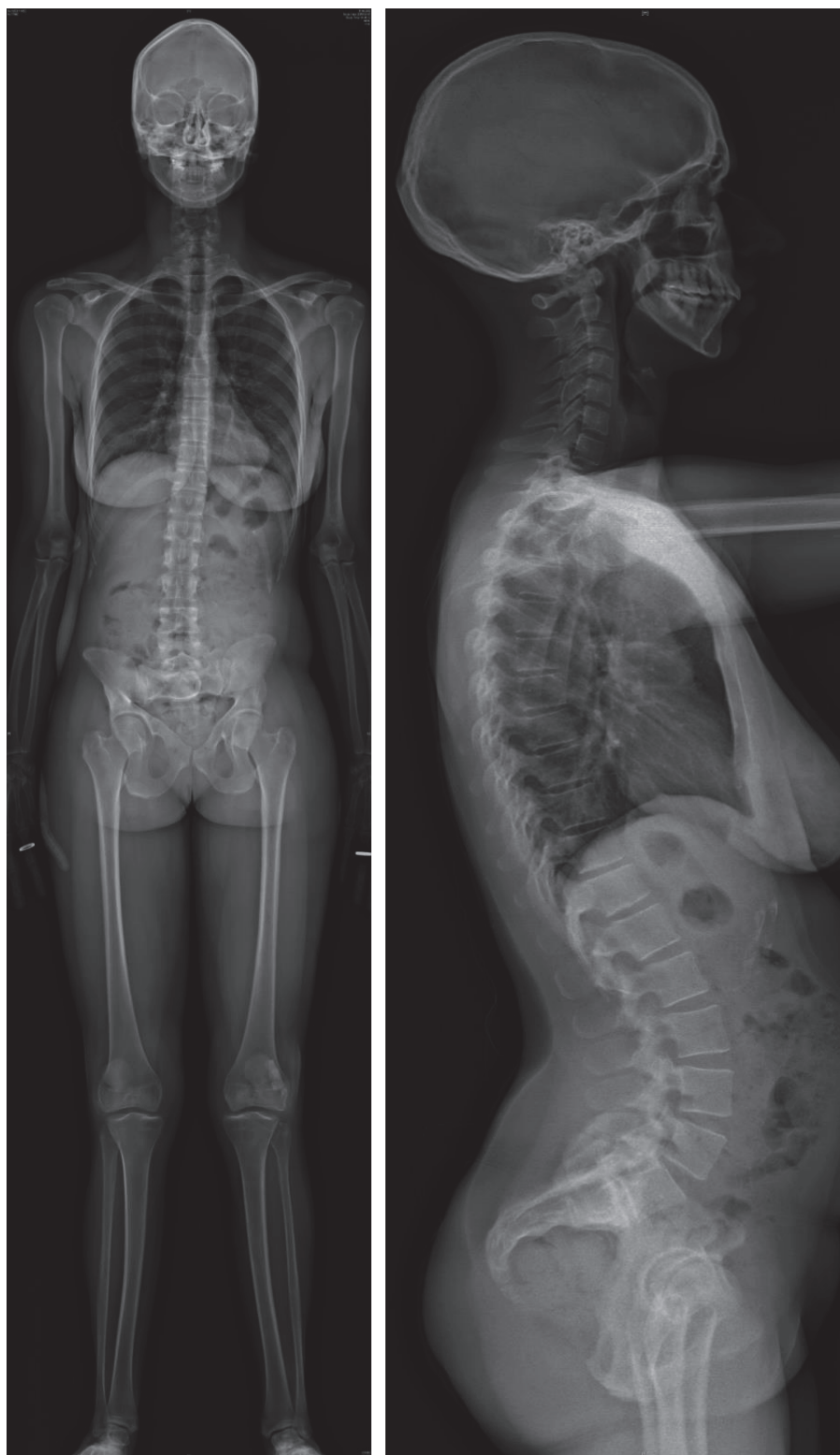
(F) On the left: 3D structure of the DNA binding domain of human *PITX2* (DNA in green and homeodomain in purple). On the right, 3D modelization of the human *PITX1* homeodomain for the native K amino acid in orange and for the mutant Q amino acid in red.



(A)



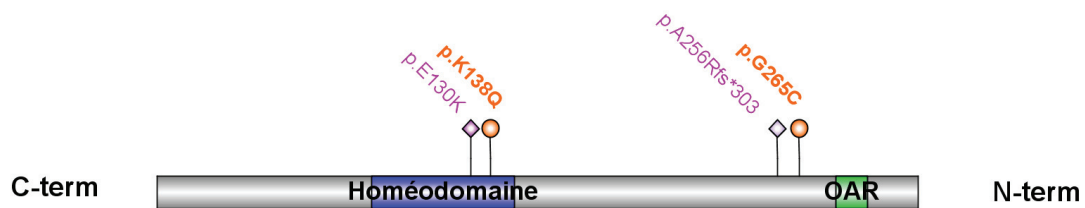
(B)



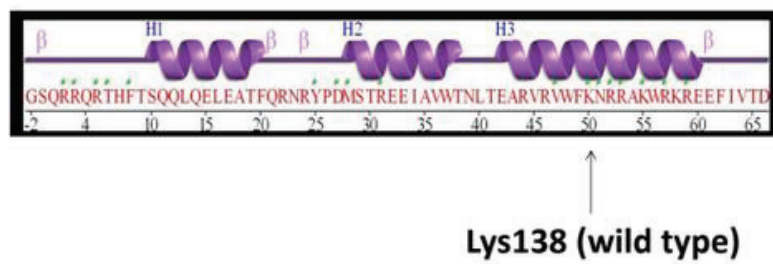
(C)



(D)



(E)



(F)

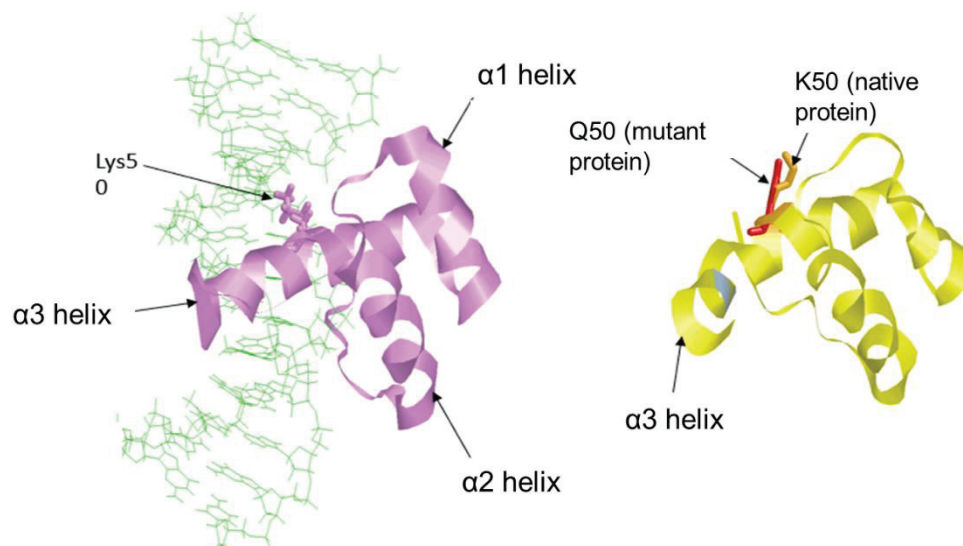


Table 1: Main clinical and molecular features of the *PITX1*-related disorders

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	MPP syndrome	Clubfoot, congenital, with or without deficiency of long bones and/or mirror-image polydactyly	Liebenberg syndrome
Micrognathia/ Pierre Robin sequence	+	+	+	+	+/-	-
Patellar anomalies	+	+	+	+	+/-	-
Narrow pelvis	+	+	+	+	-	-
Hyperlordosis	+	+	-	2/3	-	-
Equinus foot	+	-	-	-	+	-
Tibial hemimelia	-	-	-	-	+/-	-
Preaxial polydactyly	-	-	-	-	+/-	-
Growth retardation	+	+	-	2/3	-	-
Other malformations	cryptorchidism	-	cryptorchidism, micropenis	2/2 boys	+/-	-
Arm to leg transformation <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	+
Molecular or chromosomal abnormalities	p.G265C	p.G265C	p.K138Q	missense mutations	deletions, microdeletion or missense mutation including <i>PITX1</i>	deletions, duplication or translocation upstream <i>PITX1</i> including H2AFY

## REFERENCES

1. Duboc V, Logan MPO. Pitx1 is necessary for normal initiation of hindlimb outgrowth through regulation of Tbx4 expression and shapes hindlimb morphologies via targeted growth control. *Development*. 15 déc 2011;138(24):5301-9.
2. Liebenberg F. A pedigree with unusual anomalies of the elbows, wrists and hands in five generations. *S Afr Med J*. 5 mai 1973;47(17):745-8.
3. Al-Qattan MM, Al-Thunayan A, Alabdulkareem I, Al Balwi M. Liebenberg syndrome is caused by a deletion upstream to the PITX1 gene resulting in transformation of the upper limbs to reflect lower limb characteristics. *Gene*. 15 juill 2013;524(1):65-71.
4. Gurnett CA, Alaei F, Kruse LM, Desruisseau DM, Hecht JT, Wise CA, et al. Asymmetric Lower-Limb Malformations in Individuals with Homeobox PITX1 Gene Mutation. *The American Journal of Human Genetics*. 17 nov 2008;83(5):616-22.
5. Alvarado DM, McCall K, Aferol H, Silva MJ, Garbow JR, Spees WM, et al. Pitx1 haploinsufficiency causes clubfoot in humans and a clubfoot-like phenotype in mice. *Hum Mol Genet*. 15 oct 2011;20(20):3943-52.
6. Klopocki E, Kähler C, Foulds N, Shah H, Joseph B, Vogel H, et al. Deletions in *PITX1* cause a spectrum of lower-limb malformations including mirror-image polydactyly. *European Journal of Human Genetics*. juin 2012;20(6):705-8.
7. Rosenfeld JA, Drautz JM, Clericuzio CL, Cushing T, Raskin S, Martin J, et al. Deletions and duplications of developmental pathway genes in 5q31 contribute to abnormal phenotypes. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2011;155(8):1906-16.
8. Wang JS, Infante CR, Park S, Menke DB. PITX1 promotes chondrogenesis and myogenesis in mouse hindlimbs through conserved regulatory targets. *Developmental Biology*. 1 févr 2018;434(1):186-95.
9. Spielmann M, Brancati F, Krawitz PM, Robinson PN, Ibrahim DM, Franke M, et al. Homeotic arm-to-leg transformation associated with genomic rearrangements at the PITX1 locus. *Am J Hum Genet*. 5 oct 2012;91(4):629-35.
10. Mennen U, Mundlos S, Spielmann M. The Liebenberg syndrome: in depth analysis of the original family. *J Hand Surg Eur Vol*. nov 2014;39(9):919-25.
11. Kragesteen BK, Brancati F, Digilio MC, Mundlos S, Spielmann M. H2AFY promoter deletion causes PITX1 endoactivation and Liebenberg syndrome. *J Med Genet*. avr 2019;56(4):246-51.
12. Seoighe DM, Gadancheva V, Regan R, McDaid J, Brenner C, Ennis S, et al. A chromosomal 5q31.1 gain involving *PITX1* causes Liebenberg syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*. nov 2014;164(11):2958-60.



13. Kragestein BK, Spielmann M, Paliou C, Heinrich V, Schöpflin R, Esposito A, et al. Dynamic 3D chromatin architecture contributes to enhancer specificity and limb morphogenesis. *Nat Genet.* oct 2018;50(10):1463-73.
14. Szeto DP, Rodriguez-Esteban C, Ryan AK, O'Connell SM, Liu F, Kioussi C, et al. Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. *Genes Dev.* 15 févr 1999;13(4):484-94.
15. Saadi I, Semina EV, Amendt BA, Harris DJ, Murphy KP, Murray JC, et al. Identification of a dominant negative homeodomain mutation in Rieger syndrome. *J Biol Chem.* 22 juin 2001;276(25):23034-41.
16. Bongers E, Van Kampen A, Van Bokhoven H, Knoers N. Human syndromes with congenital patellar anomalies and the underlying gene defects. *Clinical Genetics.* 1 oct 2005;68(4):302-19.
17. Mansour S, Offiah A, McDowall S, Sim P, Tolmie J, Hall C. The phenotype of survivors of campomelic dysplasia. *J Med Genet.* août 2002;39(8):597-602.
18. Matsushita M, Kitoh H, Kaneko H, Mishima K, Kadono I, Ishiguro N, et al. A novel SOX9 H169Q mutation in a family with overlapping phenotype of mild campomelic dysplasia and small patella syndrome. *Am J Med Genet A.* oct 2013;161A(10):2528-34.
19. Côté A, Fanous A, Almajed A, Lacroix Y. Pierre Robin sequence: review of diagnostic and treatment challenges. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* avr 2015;79(4):451-64.

## RESUME

CONTEXTE : *PITX1* (OMIM 602149) est un facteur de transcription essentiel pour la morphogenèse des membres inférieurs. Deux pathologies sont associées à des anomalies de ce gène : le syndrome de Liebenberg (OMIM 186550) secondaire à une expression ectopique de *PITX1*, caractérisé par une malformation des membres supérieurs et le syndrome “Pieds varus équins plus ou moins associés à une hémimélie tibiale et/ou une polydactylie préaxiale” causé par des délétions ou mutation faux-sens de *PITX1*. Les souris KO pour le gène *PITX1* ont une mandibule de petite taille, une fente palatine, un pelvis hypoplasique et une agénésie patellaire.

OBJECTIF : Caractériser cliniquement et moléculairement un nouveau syndrome lié à des mutations faux-sens du gène *PITX1*.

RESULTAT : Le patient 1 présente un micrognathie, une atteinte patellaire, un retard de croissance et des anomalies génitales. Sa mère, la patiente 2, présente un phénotype osseux comparable. Le patient 3 présente une séquence de Pierre Robin, un flessum sévère des genoux et des anomalies génitales. De plus, les radiographies objectivent pour ces 3 patients une atteinte du bassin (ailes iliaques de petite taille ou hypoplasie des branches ischio-pubiennes). L'exome a mis en évidence la mutation faux sens c.793G>T chez les patients 1 et 2 et la mutation c.412A>C chez le patient 3 dans *PITX1*.

DISCUSSION : Ces 3 patients présentent un syndrome reconnaissable associant des anomalies du développement du premier arc branchial, du bassin et des rotules pouvant être associées à une petite taille et chez les garçons, à des anomalies génitales. Nous proposons d'appeler ce syndrome de transmission dominante le syndrome Mandibulo-Coxo-Patellaire. *PITX1* interagit avec *TBX4* et *SOX9*. Le syndrome coxo-podo-patellaire lié à des mutations de *TBX4* et la dysplasie campomélique causée par des mutations de *SOX9* présentent un phénotype chevauchant avec le syndrome que nous décrivons ici. Cette étude étend donc le spectre des pathologies liées aux mutations de *PITX1* et fait émerger la notion de pathologies liées à la voie *PITX1-TBX4-SOX9*.