

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE “IULIU HAȚIEGANU”
CLUJ-NAPOCA**

Rezumatul tezei de doctorat

**Originea parentală a cromosomului X și studiul
patogenetic al variabilității fenotipului clinic în
sindromul Turner. Cercetarea factorilor clinici și
genetici cu rol important pentru diagnostic și evoluție**

Doctorand: **Diana-Laura Bolca**

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Ioan Victor Pop**

2012

CUPRINSUL PRESCURTAT AL TEZEI DE DOCTORAT

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Noțiuni introductive în sindromul Turner	21
1.1. Definiție	21
1.2. Istoric	21
1.3. Epidemiologie	22
2. Genetica sindromului Turner	23
2.1. Etiopatogeneză	23
2.2. Fiziopatologie	23
3. Fenotipul în sindromul Turner	27
3.1. Sindromul dismorfic	27
3.2. Creșterea staturală	27
3.3. Retardul pubertar și alte consecințe ale disgeneziei gonadale	28
3.4. Dezvoltarea neuro-cognitivă	29
3.5. Malformații și comorbidități	29
4. Diagnosticul în sindromul Turner	31
5. Evoluția și opțiunile terapeutice în sindromul Turner	33
5.1. Creșterea staturală	33
5.2. Disgenezia gonadală	34
6. Variabilitatea fenotipică din sindromul Turner și corelațiile cu cariotipul	35
6.1. Monosomia X omogenă	36
6.2. Mozaicisme care afectează cromosomul X	36
6.3. Anomalii structurale ale cromosomului X	36
6.4. Cromosomul Y	38
7. Variabilitatea fenotipică din sindromul Turner și originea parentală a cromosomului X	39
7.1. Amprentarea cromosomului X	39

7.2. Sindromul Turner și amprentarea cromosomului X	40
---	----

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Ipoteza de lucru/Obiective	45
2. Metodologie generală	47
3. Studiul 1. Trăsături fenotipice ale copiilor și adolescenților cu sindrom Turner	49
3.1. Introducere	49
3.2. Obiective	50
3.3. Material și metodă	50
3.4. Rezultate	52
3.5. Discuții	61
3.6. Concluzii	71
4. Studiul 2. Originea parentală a cromosomului X și influența sa asupra creșterii în sindromul Turner	73
4.1. Introducere	73
4.2. Obiective	74
4.3. Material și metodă	74
4.4. Rezultate	84
4.5. Discuții	89
4.6. Concluzii	93
5. Studiul 3. Detecția mozaicismelor de nivel scăzut la pacientele cu sindrom Turner folosind tehnica FISH	95
5.1. Introducere	95
5.2. Obiective	96
5.3. Material și metodă	96
5.4. Rezultate	98
5.5. Discuții	101
5.6. Concluzii	107
6. Concluzii generale	109
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	111
REFERINȚE	113

Cuvinte cheie: sindromul Turner, amprentare genomică, cromozomul X, creștere staturală, diagnostic.

În ultimii ani s-a remarcat modificarea viziunii asupra sindromului Turner, această entitate nemaifiind considerată un handicap devalorizant, grație progreselor terapeutice. Astfel, tratamentul adecvat cu hormon de creștere (GH - *growth hormone*) ameliorează semnificativ hipostatura la aceste paciente, talia finală sub tratament ajungând la valori considerate în limitele normalului. De asemenea, consecințele disgeneziei gonadale sunt astăzi mult influențate printr-o mai bună abordare a feminizării farmacologice, precum și prin posibilitatea maternității la aceste paciente. Sarcina se poate obține fie utilizând ovocite de la o donatoare sănătoasă fie, mai nou, prin crioprezervarea ovocitelor proprii la o vârstă timpurie și utilizarea lor ulterioară, atunci când pacienta va dori să procreeze.

Pentru a obține, însă, efecte maxime ale terapiei și astfel o normalizare a calității vieții acestor paciente, care au, de altfel, o dezvoltare intelectuală normală, tratamentul trebuie să fie instituit precoce. Un obstacol în acest sens este lipsa unui diagnostic corespunzător, la vârsta optimă pentru instituirea terapiei. Această constatare este explicată în mare parte prin variabilitatea de expresie fenotipică a sindromului Turner. Astfel, s-a observat că doar o proporție mică din paciente prezintă un fenotip complet, clasic, și că spectrul clinic în sindromul Turner poate cuprinde multe alte aspecte mai mult sau mai puțin exprimate fenotipic, deseori reprezentate doar de hipostatură, ca unic semn.

Marea variabilitate de expresie fenotipică, responsabilă de dificultățile diagnostice din sindromul Turner, nu are încă o explicație clară. Deși s-au observat diverse anomalii cromosomiale la pacientele cu sindrom Turner (doar 50% prezintă monosomie X omogenă), acestea nu par să justifice, decât parțial, diversitatea fenotipică. Unele studii sugerează rolul potențial al amprentării cromosomului X, ca mecanism responsabil de tabloul clinic extrem de heterogen din sindromul Turner. Există însă și autori care furnizează date contradictorii. Trebuie menționat însă, că toate aceste studii, puține la număr, au analizat loturi mici de paciente, metodologia de lucru nefiind întotdeauna foarte adecvată. Lipsa unor concluzii în acest sens face acest domeniu deosebit de incitant, întrucât demonstrarea amprentării genelor de pe cromosomul X ar putea explica heterogenitatea clinică din sindromul Turner, inclusiv evoluția variabilă a

creșterii staturale sub tratamentul cu GH, conducând astfel la o abordare terapeutică diferită de la caz la caz, în funcție de originea parentală a cromosomului X.

Până nu demult, singurele paciente la care se stabilea diagnosticul de sindrom Turner erau cele care prezentau un tablou clinic complet. Prin familiarizarea clinicienilor cu variabilitatea de expresie fenotipică din acest sindrom, s-a constatat în ultimii ani o anumită creștere a numărului pacientelor diagnosticate, însă chiar și așa, peste 50% din cazurile cu această patologie rămân și azi nediate diagnosticate. O ameliorare s-a observat și în ceea ce privește vârsta la diagnostic, vârsta medie la diagnostic fiind la momentul actual de aproximativ 10 ani, spre deosebire de cea observată în urmă cu 25-35 de ani (înainte de posibilitatea terapiei cu GH), când pacientele erau diagnosticate adesea datorită amenoreei și retardului pubertar, la vârsta de 15-16 ani. Este însă necesară o diminuare mai consistentă a vârstei la diagnostic, deoarece un tratament optim în sensul creșterii ar trebui instituit mult mai devreme, uneori chiar de la vârsta de 2-4 ani. Aceste constatări care indică un oarecare progres au fost remarcate în principal în țările dezvoltate, și mai puțin în celelalte, fiind consecința: evaluării mai atente a semnelor clinice de alarmă prin folosirea ghidurilor de diagnostic, îmbunătățirii diagnosticului prenatal, precum și folosirii uneori a tehnicilor mai complexe de citogenetică, cum ar fi hibridizarea fluorescență *in situ* (FISH – *fluorescent in situ hybridisation*). Însă chiar dacă există ghiduri pentru evaluarea clinică a pacientelor cu sindrom Turner, diagnosticul încă deficitar al acestui sindrom se pare că este datorat în mare măsură lipsei unor criterii diagnostice ferme. Ghidurile folosite la momentul actual sunt cele bazate pe studiile existente, deseori de anvergură mică, necunoscându-se prea multe despre performanța lor diagnostică. Folosirea acestor indicatori a condus deseori la un număr mare de cariotipuri efectuate cu un randament diagnostic scăzut. Pe de altă parte, multe cazuri „scapă” diagnosticului clinic, prin faptul că nu au un fenotip cu elemente patologice clare, în special la o vârstă mică.

Obiective

În baza datelor de mai sus, obiectivele principale pe care mi le-am propus să le îndeplinesc prin analiza unei populații mari de paciente au fost:

- 1) analiza fenotipului în sindromul Turner și evaluarea ponderii diferitelor criterii clinice utilizate pentru diagnostic;

- 2) evaluarea influenței originii parentale a cromosomului X asupra variabilității fenotipului clinic în sindromul Turner, în particular asupra creșterii;
- 3) evaluarea influenței cariotipului asupra variabilității fenotipice la pacientele cu sindrom Turner.

Ca obiectiv secundar, am dorit să identific, utilizând tehnica FISH, mozaicismele și cromosomul Y la pacientele cu sindrom Turner.

Material și metodă

Această activitate de cercetare a fost efectuată în perioada 2007-2011, în laboratorul de cercetare *INSERM CIC-EC5*, din cadrul Spitalului Robert-Debré, Paris, Franța.

Am inclus în studiu paciente diagnosticate cu sindrom Turner, care au fost tratate cu GH în perioada 1986-1997 în Franța, fiind selectate din baza de date a pacienților tratați cu GH a Asociației *France Hypophyse*.

Pacientele au fost eligibile pentru a participa în studiul originii parentale a cromosomului X, dacă aveau cariotip monosomic, 45,X (efectuat la momentul diagnosticului), și dacă au împlinit vârsta de 18 ani la data debutului studiului, 31 octombrie 2007.

Identificarea pacientelor cu mozaicisme ale cromosomilor X și Y s-a făcut utilizând tehnica FISH, prin care am eliminat din lotul de paciente diagnosticate cu monosomie omogenă la cariotipul standard, pe cele care au prezentat un mozaicism de nivel scăzut la cariotipul cu FISH.

Determinarea originii parentale a cromosomului X s-a făcut prin compararea genotipului mamă (sau tată)-fiică, utilizând o combinație de nouă markeri microsatelici, localizați pe întreaga lungime a cromosomului X: DXS1223, DXS1039, DXS8045, DXS7108, DXS1196, DXS1062, DXS8077, DXS8064 și DXS1216.

Derularea acestei cercetări a primit avizul favorabil al comisiilor de etică franceze. Pacientele analizate au fost de acord cu participarea în aceste studii, prin semnarea unui consimțământ informat la începutul derulării acestei activități de cercetare.

Rezultate și discuții

În primul studiu am analizat variabilitatea fenotipului clinic în sindromul Turner, cu scopul evaluării sensibilității diferitelor ghiduri diagnostice de referință. Astfel, cohorta populațională de paciente cu sindrom Turner, prin talia sa, a permis sublinierea acelor caracteristici fenotipice care

au avut o relevanță mai mare pentru diagnostic, în ideea utilizării lor în viitor ca și criterii de diagnostic în practica clinică. Am observat că, deși multe caracteristici fenotipice sunt variabile de la pacientă la pacientă (40% din cazuri nu prezintă modificări ale fenotipului extern, 30% din cazuri nu prezintă hipostatură la o vârstă mică, definită prin talie mică cu peste -2DS față de normele populației generale de aceeași vârstă și sex), singura modificare constantă, observată la 95-100% din cazuri, indiferent de vârsta evaluării, este prezența fie a unei talii mai mici față de talia țintă cu peste -1,5DS, fie a hipostaturii. Această observație indică importanța evaluării taliei pacientelor raportat la talia părinților și nu doar la talia medie a populației generale, așa cum se descrie în ghidurile actuale de diagnostic. În acest studiu am încercat, de asemenea, să corelez variabilitatea fenotipică caracteristică pacientelor cu sindrom Turner cu modificările observate la cariotipul standard. Diversele modificări cariotipice observate la pacientele cu sindrom Turner au un rol doar parțial în explicarea fenotipului, deoarece în acest studiu nu pare să existe o corelație foarte specifică între un anumit cariotip și trăsăturile fenotipice. Am observat o severitate clinică oarecum mai mare la pacientele cu monosomie X omogenă spre deosebire de pacientele cu alte cariotipuri pentru: lungimea la naștere, talia SDS înaintea inițierii tratamentului cu GH, numărul de trăsături fenotipice, frecvența coarctăției de aortă și unele anomalii renale, însă aceste diferențe nu au fost foarte nete.

Al doilea studiu, StaTur-X, a propus evaluarea unui aspect patogenetic din sindromul Turner, amprentarea cromosomului X, pentru a-i determina ponderea contribuției la mecanismele responsabile de variabilitatea fenotipului clinic din sindromul Turner. Astfel, am studiat influența originii parentale a cromosomului X în etiopatogeneza fenotipului din sindromul Turner, în principal asupra creșterii și câștigului statural indus de tratamentul cu GH. Cea mai importantă constatare a acestei cercetări a fost demonstrarea absenței amprentării genelor de pe cromosomul X cu rol în creșterea staturală la om. În acest context, creșterea atât de variabilă sub tratamentul cu GH în sindromul Turner nu pare să fie influențată de originea parentală a cromosomului X. De asemenea, nici în absența tratamentului, talia nu este corelată cu originea cromosomului X. Am remarcat, de asemenea, că talia în sindromul Turner se corelează atât cu talia maternă cât și cu cea paternă, indiferent de originea parentală a cromosomului X, și nu cum se presupunea anterior că se asociază în principal cu talia mamei. Această constatare vine din nou în sprijinul afirmației că nu există gene amprentate pe X implicate în creșterea staturală. Nu se poate exclude, însă, posibila amprentare a altor gene de pe cromosomul X, cu rol în dezvoltarea

celorlalte trăsături fenotipice din sindromul Turner, următoarea etapă prevăzută pentru acest studiu constând în analiza efectului originii parentale a cromosomului X asupra dezvoltării neurocognitive la pacientele cu sindrom Turner. Un punct forte al acestui studiu, pe lângă cel dat de dimensiunea lotului de studiu, a fost reprezentat de luarea în analiză doar a pacientelor cu monosomie X omogenă, înlăturând astfel posibilele erori în interpretarea efectelor fenotipice ale originii parentale a cromosomului X, date de mozaicisemele celulare.

Al treilea studiu, a urmărit detecția mozaicismelor cromosomilor sexuali la pacientele diagnosticate cu monosomie omogenă 45,X la cariotipul standard, utilizând tehnici moleculare de citogenetică (FISH). Am evidențiat astfel avantajele acestei tehnici în vederea stabilirii unui diagnostic citogenetic precis. Pacientele diagnosticate cu monosomie X omogenă în urma aplicării acestei tehnici, au fost incluse în studiul care a evaluat originea parentală a cromosomului X. La pacientele diagnosticate prin analiza citogenetică standard cu monosomie X omogenă am observat, aplicând tehnica FISH, prezența mozaicismelor cromosomului X la 7% din cazuri, precum și absența cromosomului Y. Analiza FISH este astfel utilă pentru studiul mozaicismelor întrucât permite analiza unui număr mult mai mare de celule, într-un timp mult mai scurt decât citogenetica standard. Detecția cromosomului Y prin FISH este indicată la pacientele cu sindrom Turner cu semne sugestive, cum ar fi virilizarea sau prezența unui cromosom marker, deoarece acest cromosom implică un risc crescut de gonadoblastom. Întrucât nu am observat cromosomul Y la nici una din pacientele din lotul studiat, la întrebarea dacă trebuie sau nu indicată analiza FISH pentru detecția cromosomului Y la orice pacientă cu sindrom Turner, în absența semnelor sugestive, răspunsul susținut de rezultatele studiului de față este mai degrabă negativ.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Cercetarea de față este unică până la acest moment prin mărimea lotului de studiu, calitatea și diversitatea datelor clinice și terapeutice culese timp de peste 20 de ani, și a fost necesară pentru a clarifica aspecte încă neelucidate referitoare la patogeneză, diagnosticul și evoluția variabilă a pacientelor cu sindrom Turner. Aportul inovativ și originalitatea tezei sunt conferite de rezultatele obținute precum și de metodologia folosită.

Cea mai importantă contribuție adusă de această cercetare este demonstrarea absenței amprentării genelor de pe cromosomul X implicate în creșterea staturală. În ultimii ani mecanismele

epigenetice ale amprentării genomice au atras atenția din ce în ce mai mult prin rolul pe care îl pot avea în explicarea a tot mai multe aspecte patologice, reprezentând astfel o abordare modernă și de foarte mare actualitate în particular în studiul patogenetic al sindromului Turner. Studiul originii parentale a cromosomului X, cu scopul de a ameliora înțelegerea variabilității fenotipice a sindromului Turner, în particular a creșterii staturale, a fost întreprins de prea puține studii până la acest moment, deseori discordante, iar rezultatele obținute prin această cercetare furnizează concluzii mai aproape de certitudine prin lotul mare de studiu și prin metodologia de lucru folosite. Astfel, deși negative, rezultatele cercetării demonstrează că la om nu există pe cromosomul X gene amprentate, implicate în dezvoltarea staturală, cu sau fără tratament cu GH.

Răspunsul la tratamentul cu GH în sindromul Turner este multifactorial și foarte diferit de la pacientă la pacientă, iar evaluarea variabilei genetice, originea parentală a cromosomului X, nu putea să se facă decât în cadrul unui studiu capabil să țină cont de diferiți factori cunoscuți și care să cuprindă un număr crescut de paciente, cum a fost studiul actual. Identificarea unui factor genetic de posibil non-răspuns, cum ar fi fost amprentarea cromosomului X, ar fi avut consecințe importante asupra limitării eventuale a acestui tratament foarte scump, doar la anumite subcategorii de paciente.

Punctele forte ale acestei cercetări sunt date în principal de talia lotului de studiu și de metodologia folosită. Studiul originii parentale a cromosomului X reprezintă cea mai extinsă cercetare realizată pe paciente cu cariotip 45,X omogen, cuprinzând 180 cazuri. Un punct pozitiv a fost, de asemenea, utilizarea tehnicii FISH pentru detecția mozaicismelor de nivel scăzut la pacientele diagnosticate cu monosomie X omogenă prin tehnici citogenetice clasice, ceea ce a permis înlăturarea posibilelor confuzii date de un asemenea mozaicism pentru interpretarea originii parentale a cromosomului X.

În baza datelor de mai sus, această activitate de cercetare și-a adus contribuția în elucidarea anumitor controverse legate de eficacitatea unor indicatori diagnostici în sindromul Turner și de patogeniza variabilității creșterii staturale sub tratamentul cu GH la aceste paciente și lipsa corelației cu mecanismul amprentării genomice a cromosomului X. Odată cu obținerea acestor rezultate se deschid însă noi orizonturi în domeniul cercetării amprentării genomice a cromosomului X, însă pentru genele implicate în dezvoltarea altor trăsături fenotipice caracteristice sindromului Turner, cum ar fi dezvoltarea neuro-socio-cognitivă.

**“TULIU HAȚIEGANU” UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY
CLUJ-NAPOCA**

PhD Thesis Abstract

Parental origin of the X chromosome and pathogenetic study of the clinical phenotype variability in Turner syndrome. Research of clinical and genetic factors with a significant role in diagnostic and evolution

Ph.D. Student: **Diana-Laura Bolca**

Ph.D. Supervisor: **Prof. Ioan Victor Pop, M.D., Ph.D.**

2012

THE TABLE OF CONTENTS (SHORTENED) OF DOCTORAL THESIS

INTRODUCTION	15
CURRENT LEVEL OF KNOWLEDGE	
1. Introductory notions in Turner syndrome	21
1.1. Definitions	21
1.2. History	21
1.3. Epidemiology	22
2. Genetics in Turner syndrome	23
2.1. Etiopathogenesis	23
2.2. Physiopathology	23
3. Phenotype in Turner syndrome	27
3.1. Dysmorphic syndrome	27
3.2. Height growth	27
3.3. Delayed puberty and other consequences of gonadal dysgenesis	28
3.4. Neurocognitive development	29
3.5. Malformations and comorbidities	29
4. Diagnosis in Turner syndrome	31
5. Evolution and therapeutic options in Turner syndrome	33
5.1. Height growth	33
5.2. Gonadal dysgenesis	34
6. Phenotypic variability and correlations with karyotype in Turner syndrome	35
6.1. Homogeneous X monosomy	36
6.2. Mosaics involving X chromosome	36
6.3. Structural abnormalities of X chromosome	36
6.4. Y chromosome	38
7. Phenotypic variability in Turner syndrome and parental origin of the X chromosome	39
7.1. X chromosome imprinting	39

7.2. Turner syndrome and X chromosome imprinting	40
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Work hypothesis/Objectives	45
2. General methodology	47
3. Study 1. Phenotypic features in child and adolescents with Turner syndrome	49
3.1. Introduction	49
3.2. Objectives	50
3.3. Material and method	50
3.4. Results	52
3.5. Discussions	61
3.6. Conclusions	71
4. Study 2. Parental origin of the X chromosome and his influence on growth in Turner syndrome	73
4.1. Introduction	73
4.2. Objectives	74
4.3. Material and method	74
4.4. Results	84
4.5. Discussions	89
4.6. Conclusions	93
5. Study 3. Low level mosaicism detection in patients with Turner syndrome using FISH techniques	95
5.1. Introduction	95
5.2. Objectives	96
5.3. Material and method	96
5.4. Results	98
5.5. Discussions	101
5.6. Conclusions	107
6. General conclusions	109
7. Originality and innovative contribution of the thesis	111
REFERENCES	113

Keywords: Turner syndrome, genomic imprinting, X chromosome, diagnostic, growth.

A change of the outlook upon Turner syndrome was seen in the recent years, as this entity is not considered a deficiency any longer due to the therapeutic progress. Thus, the adequate treatment with the growth hormone (GH - *growth hormone*) significantly ameliorates the hipostature for these patients, the final height under treatment reaching values considered within the normal limits. Also, the consequences of gonadal dysgenesis are currently much influenced through a better approach of pharmacological feminization, as well as by the possibility for maternity in these patients. The pregnancy may be obtained whether using oocytes from a healthy donor or, more recently by cryopreservation of own oocytes at an early age and their subsequent use when the patients want to procreate.

In order to obtain optimal effects of the therapy and thus a normalization of life quality of these patients who, otherwise have a normal intellectual development, the treatment should be made early. An obstacle in this meaning is the lack of an accurate diagnostic at the optimal age to start therapy. This finding is mainly explained by the phenotype variability of the Turner syndrome. Thus, we noticed that only a small number of patients have a complete, classical phenotype and that the clinical spectrum in the Turner syndrome may include many other aspects more or less expressed phenotypically, often represented only by hipostature, as a sole sign.

The large phenotype variability, responsible for the diagnostic difficulties of the Turner syndrome does not have a clear explanation yet. Although were spotted various chromosomal anomalies in the patients with Turner syndrome (only 50% show homogenous X monosomy), they seem to justify only partially the phenotypic diversity. Some studies suggest the potential role of imprinting the X chromosome as a mechanism responsible for the extremely heterogeneous clinical signs of the Turner syndrome. Nevertheless there are also authors who give us contradictory information. I should mention that all these studies, few in numbers have analysed small lots of patients, the work methodology was not always adequate. The lack of some conclusions in this meaning makes this field extremely challenging as the proof of imprinted genes from the X chromosome could explain the clinical heterogeneity of the Turner syndrome, including the variable evolution of the height growth under the GH treatment, thus

leading to a therapeutic approach differing from one case to another, depending on the parental origin of the X chromosome.

Until recently, the only patients diagnosed with the Turner syndrome diagnostic were those who had complete clinical signs. By the familiarization of clinicians with the phenotype variability from this syndrome, in the last years was seen a certain growth of the number of diagnosed patients, but even so, over 50% of the cases with this pathology are still undiagnosed. An amelioration was spotted in respect of age upon the diagnostic, the average age on diagnostic is currently of about 10, unlike the age noticed 25-35 years ago (before the introduction of GH therapy), when the patients were often diagnosed due to amenorrhea and pubertal retardation at the age of 15-16. A more consistent diminution of age upon diagnostic is necessary, because an optimal treatment in the meaning of growth should be started much earlier, sometimes even at the age of 2-4. These findings that point a certain progress were mainly spotted in the developed countries and less in the others, this being the result of: careful evaluation of the clinical alarm signs by using the diagnostic guides, improvement of prenatal diagnostic, as well as the use of more complex cytogenetic techniques, like *in situ* (FISH – *fluorescent in situ hybridisation*) fluorescent hybridization. But, even if there are guides available for clinical evaluation of patients with Turner syndrome, the poor diagnostic of this syndrome seems to be due to a great extent to the lack of some firm diagnostic criteria. The guidelines currently used are those based on the existent studies, sometimes of a low scale, with little information about their diagnostic performance. The use of these indicators often led to a high number of karyotypes made with a low diagnostic efficiency. On the other hand many cases “miss” the clinical diagnostic by the fact that they do not have a phenotype with clear pathological elements, especially at an early age.

Objectives

Based on the above data, the main goals I intend to reach through the analysis of a higher number of patients were:

- 1) the evaluation of the influence of parental origin of X chromosome upon the clinical phenotype variability in the Turner syndrome, particularly upon growth;
- 2) the analysis of the Turner syndrome and the assessment of the share of the various clinical studies used for the diagnostic;

3) the assessment of the karyotype influence upon phenotypic variability in patients with Turner syndrome.

As a secondary goal, I wanted to identify, using the FISH technique, the mosaicisms and the X chromosome in the patients with Turner syndrome.

Material and method

This research activity was made between 2007 and 2011, in the research laboratory *INSERM CIC-EC5*, from Robert-Debré Hospital, Paris, France.

I included in the study patients diagnosed with the Turner syndrome who were treated with the GH in the period between 1986 and 1997 in France, being selected from the database of the GH treated patients of the Association *France Hypophyse*.

The patients were eligible to participate in the chromosome X parental origin study if they had monosomic karyotype 45, X (made at the time of the diagnostic), and if they reached the age of 18 when the study was started, namely on 31 October 2007.

The identification of the patients with mosaicisms was made with the help of the FISH technique through which we eliminated from the group the patients diagnosed with homogenous monosomy at the standard karyotype, those who presented a low level mosaicism at karyotype with FISH.

Determination of parental origin of the X chromosome was made by comparing the mother genotype (or father) – daughter using a combination of nine microsatellite markers located on the entire length of the X chromosome: DXS1223, DXS1039, DXS8045, DXS7108, DXS1196, DXS1062, DXS8077, DXS8064 and DXS1216.

This research was given the favourable approval of the French ethics committees. The patients analysed agreed to the participation in these studies by signing an informed consent at the beginning of this research activity.

Results and discussions

In the first study it was analysed the variability of the clinical phenotype in the Turner syndrome, with the purpose of assessing the sensitivity of the various reference diagnostic guides. Thus, the population cohort of patients with Turner syndrome through its size allowed the underlining of those phenotype characteristics that had a bigger relevance for the diagnostic,

in the meaning of using them in the future as diagnostic criteria in the clinical practice. I have noticed that although many phenotype characteristics are variable from one patient to another (40% of the cases do not show changes of the external phenotype, 30% of the cases do not show hipostature at an early age, defined by small height with over -2DS as opposed to the features of general population of same age and sex), the only change found, seen in 95-100% of the cases, regardless of the assessment age is the presence whether of a small height in comparison to the target height with over -1,5DS, or of the hipostature. This observation indicates the importance of assessing the patients' height related to the parents' height and not only to the average height of the general population, as described in the current diagnostic guides. In this study I also attempted to correlate the phenotype variability particular of patients with Turner syndrome with the changes spotted at the standard karyotype. The various karyotype changes seen in the patients with Turner syndrome have only a partial role in explaining the phenotype because in this study does not seem to exist a very specific correlation between a certain karyotype and the phenotype features. I noticed a relatively high clinical severity in the patients with homogenous X monosomy unlike the patients with other karyotypes for: the length at birth, the SDS height before starting the GH treatment, the number of phenotype characteristics, the frequency of aorta coarctation and some renal disorders, but these differences were not very accurate.

The second study, StaTur-X, suggested the assessment of a pathogenetic aspect of the Turner syndrome, namely imprinting of X chromosome, to determine the share of its contribution to the mechanisms responsible for the variability of the clinical phenotype from the Turner syndrome. Therefore, I have studied the influence of parental origin of the X chromosome in the etiopathogenesis of the phenotype from the Turner syndrome, mainly the influence upon the growth and the height growth induced by the GH treatment. The most important finding of this research was to prove the absence of imprinted genes from the X chromosome with role in height growth in humans. In this context, the variable growth under the GH treatment in the Turner syndrome does not seem to be influenced by the parental origin of the X chromosome. Also, in the absence of treatment the height is not related to the origin of the X chromosome. I have also noticed that the height in the Turner syndrome is related both to the maternal and the paternal height, regardless of the parental origin of the X chromosome, and not as previously assumed to be linked mainly to the mother's size. This observation comes to support once again the statement according to which there are no genes imprinted on the X

involved in the height growth. We cannot rule out the possible imprinting of other genes from the X chromosome with role in the development of the other phenotypic characteristics from the Turner syndrome, the following step provided for this study consists in the analysis of the effect of parental origin of the X chromosome upon neurocognitive development in the patients with Turner syndrome. A strong point of this study, besides the one given by the size of the study sample, was represented by the analysis only of the patients with homogenous X monosomy, thus removing the possible errors in the interpretation of the phenotypic effects of parental origin of the X chromosome, given by the cellular mosaicisms.

The third study relates to the detection of sexual chromosomes mosaicisms in the patients diagnosed with homogenous 45,X monosomy in the standard karyotype using cytogenetics molecular techniques (FISH). Thus, I have pointed out the advantages of this technique to establish an accurate cytogenetic diagnostic. The patients diagnosed with homogenous X monosomy following the application of this technique were included in the study that evaluated the parental origin of the X chromosome. In the patients diagnosed with the help of standard cytogenetic analysis with homogenous X monosomy we spotted by applying the FISH technique the presence of mosaicisms of the X chromosomes in 7% of the cases, as well as the absence of the Y chromosome. The FISH analysis is therefore useful for the study of mosaicisms as it allows the analysis of a higher number of cells, in a much shorter time in comparison to the standard cytogenetics. The detection of the Y chromosome by FISH technique is seen in the patients with Turner syndrome with suggestive signs, like virilization or the presence of a marker chromosome, as this chromosome involves a high risk of gonadoblastoma. Whereas we have not spotted the Y chromosome in any of the patients from the studied sample, at the question whether FISH analysis is to be recommended or not for the detection of the Y chromosome in any patients with Turner syndrome and in the absence of suggestive signs, the answer confirmed by the results of the present study is rather negative.

Originality and innovative contributions of the thesis

Up to the present time this research is unique through the size of the study sample and the diversity of the clinical and therapeutic data collected for over 20 years and it was necessary to clear out aspects still unexplained in respect of the pathogenesis, the diagnosis and the variable evolution

of the patients with Turner syndrome. The innovative contribution and the originality of the thesis are provided by the results obtained and the methodology used.

The most significant contribution brought by this research is the proof of the absence of imprinted genes on the X chromosome involved in the natural growth. In the last years the epigenetic mechanisms of the genomic imprinting have drawn attention more often through the role they can have in explaining more and more pathological aspects, thus representing a modern approach and very topical especially in the pathogenetic study of the Turner syndrome. The study of parental origin of the X chromosome with the aim of improving the comprehension of phenotype variability of the Turner syndrome, in particular of the height growth was made in few studies up to the present, often discordant and the results obtained through this research provide conclusions closer to certainty through the large study sample and through the work methodology used. Thus, although negative, the results of the research show that in the humans on the chromosome X there are no imprinted genes, involved in the height growth, with or without GH treatment.

The response to the GH treatment in the Turner syndrome is multifactorial and very different from one patient to another and the assessment of the genetic variable, the parental origin of the X chromosome could only be made within a study able to take into account the various known factors and which includes a big number of patients like in the current study. The identification of a genetic factor of a possible non-response like the imprinting of the X chromosome would have had significant consequences upon the possible limitation of this expensive treatment only in some sub-categories of patients.

The strong points of this research are mainly given by the size of the study sample and the methodology used. The study of the parental origin of the X chromosome is the most extended research made on patients with homogenous 45, X karyotype, including 180 cases. A positive point was also the use of the FISH technique for the detection of low level mosaicisms in the patients diagnosed with homogenous X monosomy by classical cytogenetic techniques, which removed the possible confusions given by such a mosaicism for the interpretation of the parental origin of the X chromosome.

Based on the above mentioned information this research activity brought its contribution in the elucidation of certain controversies related to the effectiveness of some diagnostic indicators in the Turner syndrome and the pathogenesis of the height growth under the GH treatment in these patients and the lack of correlation with the mechanism of genomic imprinting of the X

chromosome. Once these results were acquired new horizons are opened in the research field of genomic imprinting of the X chromosome, but for the genes involved in the development of other phenotype features particular of the Turner syndrome, like the neuro-socio-cognitive development.