



**HAL**  
open science

# Caractérisation clinique et génétique d'une nouvelle dysplasie ectodermique en mosaïque

Arthur Sorlin

► **To cite this version:**

Arthur Sorlin. Caractérisation clinique et génétique d'une nouvelle dysplasie ectodermique en mosaïque. Sciences du Vivant [q-bio]. 2017. hal-01932211

**HAL Id: hal-01932211**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01932211v1>**

Submitted on 23 Nov 2018

**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.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

# **THÈSE**

pour obtenir le grade de

## **DOCTEUR EN MÉDECINE**

Présentée et soutenue publiquement  
dans le cadre du troisième cycle de Médecine Spécialisée

par

**Arthur SORLIN**

le 21 juin 2017

### **CARACTÉRISATION CLINIQUE ET GÉNÉTIQUE D'UNE NOUVELLE DYSPLASIE ECTODERMIQUE EN MOSAÏQUE**

Membres du jury :

Président :

M. le Professeur Philippe JONVEAUX

Juges :

M. le Professeur Bruno LEHEUP

M. le Professeur Pierre VABRES, Directeur

Mme le Docteur Céline BONNET

Mme le Docteur Anne-Claire BURSZTEJN



**Président de l'Université de Lorraine :**  
**Professeur Pierre MUTZENHARDT**

**Doyen de la Faculté de Médecine**  
**Professeur Marc BRAUN**

**Vice-doyens**

Pr Karine ANGIOI-DUPREZ, Vice-Doyen

Pr Marc DEBOUVERIE, Vice-Doyen

**Assesseurs :**

**Premier cycle :** Dr Guillaume GAUCHOTTE

**Deuxième cycle :** Pr Marie-Reine LOSSER

**Troisième cycle :** Pr Marc DEBOUVERIE

*Innovations pédagogiques :* Pr Bruno CHENUJEL

*Formation à la recherche :* Dr Nelly AGRINIER

*Animation de la recherche clinique :* Pr François ALLA

*Affaires juridiques et Relations extérieures :* Dr Frédérique CLAUDOT

*Vie Facultaire et SIDES :* Pr Laure JOLY

*Relations Grande Région :* Pr Thomas FUCHS-BUDER

*Etudiant :* M. Lucas SALVATI

**Chargés de mission**

*Bureau de docimologie :* Dr Guillaume VOGIN

*Commission de prospective facultaire :* Pr Pierre-Edouard BOLLAERT

*Orthophonie :* Pr Cécile PARIETTI-WINKLER

*PACES :* Dr Chantal KOHLER

*Plan Campus :* Pr Bruno LEHEUP

*International :* Pr Jacques HUBERT

=====  
**DOYENS HONORAIRES**

Professeur Jean-Bernard DUREUX - Professeur Jacques ROLAND - Professeur Patrick NETTER - Professeur Henry COUDANE

=====  
**PROFESSEURS HONORAIRES**

Etienne ALIOT - Jean-Marie ANDRE - Alain AUBREGE - Jean AUQUE - Gérard BARROCHE - Alain BERTRAND - Pierre BEY  
 Marc-André BIGARD - Patrick BOISSEL - Pierre BORDIGONI - Jacques BORRELLY - Michel BOULANGE  
 Jean-Louis BOUTROY - Serge BRIANÇON - Jean-Claude BURDIN - Claude BURLET - Daniel BURNEL  
 Claude CHARDOT - Jean-François CHASSAGNE - François CHERRIER - Jean-Pierre CRANCE - Gérard DEBRY  
 Emile de LAVERGNE - Jean-Pierre DESCHAMPS - Jean DUHEILLE - Jean-Bernard DUREUX - Gilbert FAURE - Gérard FIEVE  
 Jean FLOQUET - Robert FRISCH - Alain GAUCHER - Pierre GAUCHER - Alain GERARD - Hubert GERARD  
 Jean-Marie GILGENKRANTZ - Simone GILGENKRANTZ - Gilles GROSDIDIER - Oliéro GUERCI - Philippe HARTEMANN  
 Gérard HUBERT - Claude HURIET - Christian JANOT - Michèle KESSLER - François KOHLER - Jacques LACOSTE  
 Henri LAMBERT - Pierre LANDES - Marie-Claire LAXENAIRE - Michel LAXENAIRE - Alain LE FAOU - Jacques LECLERE  
 Pierre LEDERLIN - Bernard LEGRAS - Jean-Pierre MALLIÉ - Philippe MANGIN - Jean-Claude MARCHAL - Pierre MATHIEU  
 Michel MERLE - Pierre MONIN - Pierre NABET - Jean-Pierre NICOLAS - Pierre PAYSANT - Francis PENIN - Gilbert PERCEBOIS  
 Claude PERRIN - Luc PICARD - François PLENAT - Jean-Marie POLU - Jacques POUREL - Jean PREVOT - Francis RAPHAEL  
 Antoine RASPILLER - Denis REGENT - Michel RENARD - Jacques ROLAND - Daniel SCHMITT - Michel SCHMITT  
 Michel SCHWEITZER - Daniel SIBERTIN-BLANC - Claude SIMON - Danièle SOMMELET - Jean-François STOLTZ  
 Michel STRICKER - Gilbert THIBAUT - Gérard VAILLANT - Paul VERT - Hervé VESPIGNANI - Colette VIDAILHET  
 Michel VIDAILHET - Jean-Pierre VILLEMOT - Michel WEBER

=====

## PROFESSEURS ÉMÉRITES

Professeur Etienne ALIOT - Professeur Gérard BARROCHE - Professeur Pierre BEY – Professeur Serge BRIANÇON  
Professeur Jean-Pierre CRANCE - Professeur Gilbert FAURE - Professeur Alain GERARD - Professeure Michèle KESSLER -  
Professeur Jacques LECLÈRE - Professeur Alain LE FAOU - Professeur Jean-Marie GILGENKRANTZ - Professeure Simone  
GILGENKRANTZ – Professeur Gilles GROSDIDIER - Professeur Philippe HARTEMANN - Professeur François KOHLER  
Professeur Alain LE FAOU - Professeur Pierre MONIN - Professeur Jean-Pierre NICOLAS – Professeur Luc PICARD -  
Professeur François PLENAT - Professeur Daniel SIBERTIN-BLANC - Professeur Jean-François STOLTZ - Professeur Paul  
VERT - Professeur Michel VIDAILHET

=====

## PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

(Disciplines du Conseil National des Universités)

### 42<sup>ème</sup> Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

#### 1<sup>ère</sup> sous-section : (*Anatomie*)

Professeur Marc BRAUN – Professeure Manuela PEREZ

#### 2<sup>ème</sup> sous-section : (*Histologie, embryologie et cytogénétique*)

Professeur Christo CHRISTOV – Professeur Bernard FOLIGUET

#### 3<sup>ème</sup> sous-section : (*Anatomie et cytologie pathologiques*)

Professeur Jean-Michel VIGNAUD – Professeur Guillaume GAUCHOTTE

### 43<sup>ème</sup> Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE

#### 1<sup>ère</sup> sous-section : (*Biophysique et médecine nucléaire*)

Professeur Gilles KARCHER – Professeur Pierre-Yves MARIE – Professeur Pierre OLIVIER

#### 2<sup>ème</sup> sous-section : (*Radiologie et imagerie médicale*)

Professeur René ANXIONNAT - Professeur Alain BLUM - Professeur Serge BRACARD - Professeur Michel CLAUDON

Professeure Valérie CROISÉ-LAURENT - Professeur Jacques FELBLINGER

### 44<sup>ème</sup> Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

#### 1<sup>ère</sup> sous-section : (*Biochimie et biologie moléculaire*)

Professeur Jean-Louis GUEANT - Professeur Bernard NAMOUR - Professeur Jean-Luc OLIVIER

#### 2<sup>ème</sup> sous-section : (*Physiologie*)

Professeur Christian BEYAERT - Professeur Bruno CHENUUEL - Professeur François MARCHAL

#### 4<sup>ème</sup> sous-section : (*Nutrition*)

Professeur Didier QUILLIOT - Professeure Rosa-Maria RODRIGUEZ-GUEANT - Professeur Olivier ZIEGLER

### 45<sup>ème</sup> Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

#### 1<sup>ère</sup> sous-section : (*Bactériologie – virologie ; hygiène hospitalière*)

Professeur Alain LOZNIIEWSKI - Professeure Evelyne SCHVOERER

#### 2<sup>ème</sup> sous-section : (*Parasitologie et Mycologie*)

Professeure Marie MACHOUART

#### 3<sup>ème</sup> sous-section : (*Maladies infectieuses ; maladies tropicales*)

Professeur Thierry MAY - Professeure Céline PULCINI - Professeur Christian RABAUD

### 46<sup>ème</sup> Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

#### 1<sup>ère</sup> sous-section : (*Épidémiologie, économie de la santé et prévention*)

Professeur François ALLA - Professeur Francis GUILLEMIN - Professeur Denis ZMIROU-NAVIER

#### 3<sup>ème</sup> sous-section : (*Médecine légale et droit de la santé*)

Professeur Henry COUDANE

#### 4<sup>ème</sup> sous-section : (*Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication*)

Professeure Eliane ALBUISSON - Professeur Nicolas JAY

### 47<sup>ème</sup> Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

#### 1<sup>ère</sup> sous-section : (*Hématologie ; transfusion*)

Professeur Pierre FEUGIER

#### 2<sup>ème</sup> sous-section : (*Cancérologie ; radiothérapie*)

Professeur Thierry CONROY - Professeur François GUILLEMIN - Professeur Didier PEIFFERT - Professeur Frédéric MARCHAL

#### 3<sup>ème</sup> sous-section : (*Immunologie*)

Professeur Marcelo DE CARVALHO-BITTENCOURT – Professeure Marie-Thérèse RUBIO

#### 4<sup>ème</sup> sous-section : (*Génétique*)

Professeur Philippe JONVEAUX - Professeur Bruno LEHEUP

**48<sup>ème</sup> Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE, PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Anesthésiologie-réanimation ; médecine d'urgence)**

Professeur Gérard AUDIBERT - Professeur Hervé BOUAZIZ - Professeur Thomas FUCHS-BUDER  
Professeure Marie-Reine LOSSER - Professeur Claude MEISTELMAN

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Réanimation ; médecine d'urgence)**

Professeur Pierre-Édouard BOLLAERT - Professeur Sébastien GIBOT - Professeur Bruno LÉVY

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie)**

Professeur Pierre GILLET - Professeur Jean-Yves JOUZEAU - Professeur Patrick NETTER

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Thérapeutique ; médecine d'urgence ; addictologie)**

Professeur François PAILLE - Professeur Patrick ROSSIGNOL - Professeur Faiez ZANNAD

**49<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE NERVEUSE ET MUSCULAIRE, PATHOLOGIE MENTALE, HANDICAP ET RÉÉDUCATION**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Neurologie)**

Professeur Marc DEBOUVERIE - Professeur Louis MAILLARD - Professeur Luc TAILLANDIER - Professeure Louise TYVAERT

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Neurochirurgie)**

Professeur Jean AUQUE - Professeur Thierry CIVIT - Professeure Sophie COLNAT-COULBOIS - Professeur Olivier KLEIN

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Psychiatrie d'adultes ; addictologie)**

Professeur Jean-Pierre KAHN - Professeur Raymund SCHWAN

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Pédopsychiatrie ; addictologie)**

Professeur Bernard KABUTH

**5<sup>ème</sup> sous-section : (Médecine physique et de réadaptation)**

Professeur Jean PAYSANT

**50<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE ET CHIRURGIE PLASTIQUE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Rhumatologie)**

Professeure Isabelle CHARY-VALCKENAERE - Professeur Damien LOEUILLE

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie orthopédique et traumatologique)**

Professeur Laurent GALOIS - Professeur Didier MAINARD - Professeur Daniel MOLE - Professeur François SIRVEAUX

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Dermato-vénéréologie)**

Professeur Jean-Luc SCHMUTZ

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie)**

Professeur François DAP - Professeur Gilles DAUTEL - Professeur Etienne SIMON

**51<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE CARDIO-RESPIRATOIRE ET VASCULAIRE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Pneumologie ; addictologie)**

Professeur Jean-François CHABOT - Professeur Ari CHAOUAT - Professeur Yves MARTINET

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Cardiologie)**

Professeur Edoardo CAMENZIND - Professeur Christian de CHILLOU DE CHURET - Professeur Yves JUILLIERE

Professeur Nicolas SADOUL

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie thoracique et cardiovasculaire)**

Professeur Thierry FOLLIGUET - Professeur Juan-Pablo MAUREIRA

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire)**

Professeur Sergueï MALIKOV - Professeur Denis WAHL – Professeur Stéphane ZUILY

**52<sup>ème</sup> Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF ET URINAIRE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie)**

Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI - Professeur Laurent PEYRIN-BIROULET

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Néphrologie)**

Professeur Luc FRIMAT - Professeure Dominique HESTIN

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Urologie)**

Professeur Pascal ESCHWEGE - Professeur Jacques HUBERT

**53<sup>ème</sup> Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE, CHIRURGIE GÉNÉRALE ET MÉDECINE GÉNÉRALE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie)**

Professeur Athanase BENETOS - Professeur Jean-Dominique DE KORWIN - Professeure Gisèle KANNY

Professeure Christine PERRET-GUILLAUME – Professeur Roland JAUSSAUD – Professeure Laure JOLY

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie générale)**

Professeur Ahmet AYAV - Professeur Laurent BRESLER - Professeur Laurent BRUNAUD

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Médecine générale)**

Professeur Jean-Marc BOIVIN – Professeur Paolo DI PATRIZIO

**54<sup>ème</sup> Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE, ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Pédiatrie)**

Professeur Pascal CHASTAGNER - Professeur François FEILLET - Professeur Jean-Michel HASCOET  
Professeur Emmanuel RAFFO - Professeur Cyril SCHWEITZER

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie infantile)**

Professeur Pierre JOURNEAU - Professeur Jean-Louis LEMELLE

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale)**

Professeur Philippe JUDLIN - Professeur Olivier MOREL

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques ; gynécologie médicale)**

Professeur Bruno GUERCI - Professeur Marc KLEIN - Professeur Georges WERYHA

**55<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE DE LA TÊTE ET DU COU**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Oto-rhino-laryngologie)**

Professeur Roger JANKOWSKI - Professeure Cécile PARIETTI-WINKLER

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Ophtalmologie)**

Professeure Karine ANGIOI - Professeur Jean-Paul BERROD - Professeur Jean-Luc GEORGE

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie)**

Professeure Muriel BRIX

=====  
**PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS**

**61<sup>ème</sup> Section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL**

Professeur Walter BLONDEL

**64<sup>ème</sup> Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE**

Professeure Sandrine BOSCHI-MULLER

=====  
**PROFESSEUR ASSOCIÉ DE MÉDECINE GÉNÉRALE**

Professeur associé Sophie SIEGRIST

=====  
**MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS**

**42<sup>ème</sup> Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Anatomie)**

Docteur Bruno GRIGNON

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Histologie, embryologie et cytogénétique)**

Docteure Chantal KOHLER

**43<sup>ème</sup> Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Biophysique et médecine nucléaire)**

Docteur Jean-Marie ESCANYE

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Radiologie et imagerie médicale)**

Docteur Damien MANDRY - Docteur Pedro TEIXEIRA

**44<sup>ème</sup> Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Biochimie et biologie moléculaire)**

Docteure Shyue-Fang BATTAGLIA - Docteure Sophie FREMONT - Docteure Isabelle AIMONE-GASTIN  
Docteure Catherine MALAPLATE-ARMAND - Docteur Marc MERTEN - Docteur Abderrahim OUSSALAH

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Physiologie)**

Docteure Silvia DEMOULIN-ALEXIKOVA - Docteur Mathias POUSSEL

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Biologie Cellulaire)**

Docteure Véronique DECOT-MAILLERET

**45<sup>ème</sup> Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Bactériologie – Virologie ; hygiène hospitalière)**

Docteure Corentine ALAUZET - Docteure Hélène JEULIN - Docteure Véronique VENARD

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Parasitologie et mycologie)**

Docteure Anne DEBOURGOGNE

**46<sup>ème</sup> Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Epidémiologie, économie de la santé et prévention)**

Docteure Nelly AGRINIER - Docteur Cédric BAUMANN - Docteure Frédérique CLAUDOT - Docteur Alexis HAUTEMANIÈRE

**2<sup>ème</sup> sous-section (Médecine et Santé au Travail)**

Docteure Isabelle THAON

**3<sup>ème</sup> sous-section (Médecine légale et droit de la santé)**

Docteur Laurent MARTRILLE

**47<sup>ème</sup> Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Hématologie ; transfusion)**

Docteure Aurore PERROT – Docteur Julien BROSEUS (*stagiaire*)

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie)**

Docteure Lina BOLOTINE – Docteur Guillaume VOGIN (*stagiaire*)

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Génétique)**

Docteure Céline BONNET - Docteur Christophe PHILIPPE

**48<sup>ème</sup> Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE, PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE**

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Réanimation ; Médecine d'urgence)**

Docteur Antoine KIMMOUN

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie)**

Docteur Nicolas GAMBIER - Docteure Françoise LAPICQUE - Docteur Julien SCALA-BERTOLA

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Thérapeutique ; Médecine d'urgence ; addictologie)**

Docteur Nicolas GIRERD

**50<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE ET CHIRURGIE PLASTIQUE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Rhumatologie)**

Docteure Anne-Christine RAT

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Dermato-vénérologie)**

Docteure Anne-Claire BURSZTEJN

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie)**

Docteure Laetitia GOFFINET-PLEUTRET

**51<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE CARDIO-RESPIRATOIRE ET VASCULAIRE**

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire)**

Docteur Fabrice VANHUYSE

**52<sup>ème</sup> Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF ET URINAIRE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie)**

Docteur Jean-Baptiste CHEVAUX

**53<sup>ème</sup> Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE, CHIRURGIE GÉNÉRALE ET MÉDECINE GÉNÉRALE**

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Médecine générale)**

Docteure Elisabeth STEYER

**54<sup>ème</sup> Section : DEVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE, ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION**

**5<sup>ème</sup> sous-section : (Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale)**

Docteure Isabelle KOSCINSKI

**55<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE DE LA TÊTE ET DU COU**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Oto-Rhino-Laryngologie)**

Docteur Patrice GALLET

=====  
**MAÎTRES DE CONFÉRENCES**

**5<sup>ème</sup> Section : SCIENCES ÉCONOMIQUES**

Monsieur Vincent LHUILLIER

**7<sup>ème</sup> Section : SCIENCES DU LANGAGE : LINGUISTIQUE ET PHONETIQUE GÉNÉRALES**

Madame Christine DA SILVA-GENEST

**19<sup>ème</sup> Section : SOCIOLOGIE, DÉMOGRAPHIE**

Madame Joëlle KIVITS

**60<sup>ème</sup> Section : MÉCANIQUE, GÉNIE MÉCANIQUE, GÉNIE CIVIL**

Monsieur Alain DURAND

**64<sup>ème</sup> Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE**

Madame Marie-Claire LANHERS - Monsieur Nick RAMALANJAONA - Monsieur Pascal REBOUL

**65<sup>ème</sup> Section : BIOLOGIE CELLULAIRE**

Madame Nathalie AUCHET - Madame Natalia DE ISLA-MARTINEZ - Monsieur Jean-Louis GELLY

Madame Céline HUSELSTEIN - Madame Ketsia HESS – Monsieur Hervé MEMBRE - Monsieur Christophe NEMOS

**66<sup>ème</sup> Section : PHYSIOLOGIE**

Monsieur Nguyen TRAN

=====

**MAÎTRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS DE MÉDECINE GÉNÉRALE**

Docteur Pascal BOUCHE – Docteur Olivier BOUCHY - Docteur Arnaud MASSON – Docteur Cédric BERBE

Docteur Jean-Michel MARTY

=====

**DOCTEURS HONORIS CAUSA**

Professeur Charles A. BERRY (1982)  
*Centre de Médecine Préventive, Houston (U.S.A)*  
Professeur Pierre-Marie GALETTI (1982)  
*Brown University, Providence (U.S.A)*  
Professeure Mildred T. STAHLMAN (1982)  
*Vanderbilt University, Nashville (U.S.A)*  
Professeur Théodore H. SCHIEBLER (1989)  
*Institut d'Anatomie de Würzburg (R.F.A)*  
*Université de Pennsylvanie (U.S.A)*  
Professeur Mashaki KASHIWARA (1996)  
*Research Institute for Mathematical Sciences de Kyoto (JAPON)*

Professeure Maria DELIVORIA-PAPADOPOULOS (1996)  
Professeur Ralph GRÄSBECK (1996)  
*Université d'Helsinki (FINLANDE)*  
Professeur Duong Quang TRUNG (1997)  
*Université d'Hô Chi Minh-Ville (VIËTNAM)*  
Professeur Daniel G. BICHET (2001)  
*Université de Montréal (Canada)*  
Professeur Marc LEVENSTON (2005)  
*Institute of Technology, Atlanta (USA)*

Professeur Brian BURCHELL (2007)  
*Université de Dundee (Royaume-Uni)*  
Professeur Yunfeng ZHOU (2009)  
*Université de Wuhan (CHINE)*  
Professeur David ALPERS (2011)  
*Université de Washington (U.S.A)*  
Professeur Martin EXNER (2012)  
*Université de Bonn (ALLEMAGNE)*

## **Dédicaces**

**À notre Maître et Président du Jury,**

**Monsieur le Professeur Philippe Jonveaux**

Professeur de Génétique

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant la présidence de mon jury de thèse. Je vous suis très reconnaissant pour votre accueil au laboratoire et dans la discipline. Vous m'avez guidé avec attention et bienveillance dans l'ensemble de mon parcours.

Veillez trouver dans ce travail le témoignage de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

**À notre Maître et Juge,**

**Monsieur le Professeur Bruno Leheup**

Professeur de Génétique

Officier de l'ordre des Palmes Académiques

Vous me faites l'honneur de faire partie de ce jury de thèse et de juger mon travail.

J'ai eu le privilège de bénéficier de votre enseignement et de votre expérience durant ma formation. Vos connaissances et votre rigueur sont des exemples que je m'efforcerai de suivre.

Que ce travail soit l'expression de ma considération et de mon profond respect.

**À notre Directeur de thèse et Juge,**

**Monsieur le Professeur Pierre Vabres,**

Professeur de Dermato-vénérologie

Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée en me confiant ce travail de recherche, et pour l'honneur et le plaisir que je prends à travailler à vos côtés.

Vous trouverez ici l'expression de ma gratitude pour m'avoir guidé pendant la réalisation de cette thèse.

**À notre Juge,**

**Mme le Docteur Céline Bonnet**

Maitre de conférence de Génétique

Tu me fais l'honneur de faire partie de mon jury de thèse et de juger mon travail.

Merci pour ta disponibilité, ton écoute et ton encadrement durant mes stages d'internat.

Sois assurée de mes remerciements les plus sincères.

**À notre Juge,**

**Mme le Docteur Anne-Claire Bursztejn**

Maitre de conférence de Dermato-vénéréologie

Je vous suis reconnaissant de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger mon travail.

Je vous remercie de m'avoir initié à votre spécialité, au cours des consultations mixtes de Dermatologie-Génétique.

Je vous prie de croire en mon estime et ma reconnaissance.

**À mes Maitres d'internat,**

Madame le Docteur Jacqueline Vigneron,  
Monsieur le Professeur Jean-Michel Hascoet,  
Monsieur le Professeur François Feillet,  
Madame le Professeur Laurence Faivre,  
Monsieur le Professeur Damien Sanlaville,  
et à tous leurs collaborateurs,

pour le savoir qu'il m'ont transmis pendant mon internat

**À ceux qui ont apporté leur concours à ce travail,**

Jean-Baptiste Rivière, Paul Kuentz, Virginie Carmignac, Yannis Duffourd, Julien  
Thevenon, Angeline Briel

**À mes collègues et amis**, pour avoir jalonné mon internat de formidables rencontres et d'amitiés sincères, en particulier Laetitia, Lila, Mikael, Marie, Agnès, Arnaud, Chrystèle, Charlie, Fanny, Céline, Thomas, Jérémie, Jérémy, Anne-Sophie, Nicolas, Pauline, Charlotte, Delphine, Adèle, Natacha, ...

**À mes courageux et passionnés amis de la SIGF!** Florence, Aude, Alinoë, Lyse, Sophie, Kévin, Perrine, Aurélien, Fred, Ivan, Geoffroy, ...

**À ma famille,**

À mes parents, qui m'ont toujours soutenu et encouragé, qui ont su donner à mes sœurs et moi l'envie d'apprendre et de se surpasser ; et à mon père en particulier, pour m'avoir depuis toujours montré l'exemple d'une pratique passionnée et humaine de la médecine.

À mes sœurs, pour l'admiration que je leur porte.

À Delphine, pour bien plus que tes relectures aiguisées et ton soutien infaillible. Ton courage et ta persévérance sont pour moi une inspiration, et je suis fier de t'avoir à mes côtés. Je te dédie cette thèse, la deuxième de notre team, et ne te remercierai jamais assez.

## SERMENT

« **A**u moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité. Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux. Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité. J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences. Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me sont confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque ».

# Table des matières

Partie I - Présentation du sujet .....	3
I. Introduction .....	4
II. Mosaïcisme et anomalies du développement .....	6
1. Mécanisme d'apparition des mutations en mosaïque .....	6
2. Expression clinique des mutations post-zygotiques .....	8
3. Détection biologique des mutations en mosaïque .....	11
4. État des connaissances actuelles .....	12
5. Anomalies de la pigmentation cutanée et mosaïcisme .....	13
III. Matériels et méthodes .....	15
1. La cohorte M.U.S.T.A.R.D. ....	15
2. Anomalies pigmentaires dans la cohorte M.U.S.T.A.R.D. ....	15
3. Extraction d'ADN .....	16
4. Séquençage d'exome complet .....	16
5. Analyse bioinformatique .....	17
6. Réplication des résultats et études fonctionnelles .....	19
Partie II - Article.....	21
Partie III - Conclusion et perspectives.....	50
1. Identification de variants post-zygotiques de <i>RHOA</i> .....	51
2. Phénotype associé aux variants post-zygotiques de <i>RHOA</i> .....	51

3. Suivi des patients actuels et inclusion de nouveaux patients .....	53
4. Évaluation des conséquences fonctionnelles des variants.....	53
5. Un gène nécessaire au développement – la survie par le mosaïcisme .....	55
6. Conseil génétique .....	56
7. Une nouvelle voie de signalisation impliquée dans les syndromes en mosaïque ? ....	57
8. Perspectives thérapeutiques.....	57
9. Limites de la stratégie d’analyse actuelle .....	58
Conclusion générale .....	61
Bibliographie .....	62
Annexes .....	69
Permis d’imprimer.....	78

## **Partie I - Présentation du sujet**

# I. Introduction

Le concept de mosaïcisme a remis en question l'un des postulats de la génétique, supposant que l'ensemble des cellules constituant un organisme partagent le même génome. En effet, si la génétique humaine accorde une grande importance aux variations génétiques constitutionnelles, qu'elles soient héritées, ou survenues *de novo* au cours de la gamétogénèse, il faut également tenir compte de l'apparition et de l'accumulation de mutations somatiques, au cours de la vie de l'individu. Il en résulte une mosaïque, organisme composé de populations cellulaires de patrimoines génétiques différents malgré leur origine zygotique commune (1).

La survenue d'une mutation aux stades précoces de l'embryogénèse, dite post-zygotique (2), peut être la cause d'un certain nombre d'anomalies du développement. Selon le type de tissu et la proportion de cellules touchées, les conséquences phénotypiques d'un tel mosaïcisme peuvent éventuellement différer de celles d'une mutation de la lignée germinale. Lorsqu'il concerne la peau, il peut être évoqué devant le type et la disposition particulière des atteintes cutanées qui suivent par exemple les lignes de Blaschko ou d'autres topographies évocatrices (3). C'est le cas des nævus épidermiques sébacés ou verruqueux, des malformations vasculaires cutanées, ou de troubles pigmentaires variés.

La détection de mutations ponctuelles en mosaïque, présentes dans une faible fraction des cellules, s'est longtemps heurtée aux limites des techniques classiques de séquençage. L'essor récent du séquençage massivement parallèle (*Massive parallel sequencing*, MPS) dit de nouvelle génération (Next Generation Sequencing, NGS), appliqué en particulier au séquençage d'exome (*whole exome sequencing*, WES), a permis ces dernières années leur identification dans plusieurs syndromes en mosaïque avec hypertrophie chez l'homme : mutations post-zygotiques d'*AKT1* dans le syndrome de Protée (4), de *PIK3CA*, *MTOR* ou *AKT3* dans le spectre PROS (*PIK3CA-Related Overgrowth Spectrum* : syndrome MCAP, CLOVES, Klippel-Trenaunay) (5,6) de *HRAS* et *KRAS* dans le syndrome du nævus sébacé (7), ou de *GNA11* et *GNAQ* dans le syndrome de Sturge-Weber et les phacomatoses pigmento-vasculaires (8).

Certains syndromes en mosaïque comportent une hypopigmentation cutanée en bandes (nævus achromique), aussi appelée hypomélanose d'Ito (HI), surtout lorsqu'elle s'associe à une atteinte neurologique. Il s'agit d'une situation relativement fréquente au sein des anomalies du développement avec atteinte cutanée en mosaïque. En dehors de la description de quelques

patients avec une hypopigmentation au sein d'une cohorte de patients porteurs de mutations de *MTOR* (9), on considère depuis les années 1990 qu'une partie de ces hypopigmentations en mosaïque sont une manifestation cutanée associée à divers remaniements chromosomiques (10), mais de nombreux cas restent non expliqués.

L'objet de ce travail de thèse est l'identification des bases moléculaires d'un tableau clinique récurrent chez plusieurs patients, mais non rapporté dans la littérature, associant une hypopigmentation avec hypotrichose en bandes et une atteinte neuro-ectodermique évocatrice d'une mosaïque, à l'aide d'une stratégie de séquençage d'exome en trio sur la peau du patient et le sang des parents. Il a permis la mise en évidence d'un nouveau gène responsable d'un syndrome en mosaïque jusqu'alors non identifié. Les conséquences fonctionnelles des variants post-zygotiques identifiés ont été étudiées dans le cadre d'une collaboration internationale.

Il s'agit ainsi à la fois de la première description d'un syndrome ave hypomélanose d'Ito et de l'identification de son gène responsable, réaffirmant l'intérêt de la recherche en NGS de causes monogéniques dans cette indication, et suggérant la possibilité de découvertes à venir dans cette situation clinique jusqu'alors peu explorée.

## II. Mosaïcisme et anomalies du développement

### 1. Mécanisme d'apparition des mutations en mosaïque

#### Définitions

Une mosaïque génétique peut être définie par la présence, au sein d'un organisme multicellulaire, d'au moins deux lignées cellulaires dont le génotype diffère, tout en étant issues du même zygote (11). Ces différences peuvent consister en des variations diverses, dont des variations nucléotidiques (*single nucleotide variation*, SNV), de nombre de copies (*copy number variants*, CNV), ou encore structurales. Il s'agit de variations génétiques non héritées, en ce sens qu'elles ne sont pas issues de la lignée germinale parentale, mais doivent également être distinguées des variations *de novo* survenues au cours de la gamétogénèse parentale, dont la conséquence est une variation constitutionnelle, présente de manière homogène dans toutes les cellules de l'organisme.

Une variation génétique acquise peut se rencontrer en génétique humaine dans deux contextes différents, qui partagent des problématiques communes, liées à la difficulté de détection des mutations et à celle de l'accès au tissu atteint :

- la situation la plus fréquente, et la plus documentée, concerne l'oncologie : l'accumulation de mutations somatiques est à l'origine du processus de transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse.

- plus rarement, la variation se produit peu de temps après la fécondation et la formation du zygote primitif, et peut être responsable d'anomalies du développement. On parle alors d'une mutation post-zygotique, pour décrire un événement de survenue précoce au cours de l'embryogénèse, et qui peut à lui seul être responsable de manifestations cliniques variées.

Le mosaïcisme doit enfin être différencié du chimérisme, dans lequel deux (ou plus) populations cellulaires génétiquement différentes cohabitent, mais proviennent de deux zygotes différents (12). Il résulte d'un transfert cellulaire d'un individu vers un autre, au cours de la vie embryonnaire (fusion de deux zygotes), foetale (microchimérisme par transfert foeto-maternel ou materno-foetal), ou post-natale (transfusion, allogreffe). Il est théoriquement possible de les différencier du point de vue génétique, par exemple avec une approche de puce

à ADN de type SNP-array (*Single Nucleotide Polymorphism array*) : à la différence du mosaïcisme, où les cellules ne diffèrent qu'au locus de l'évènement post-zygotique (qu'il s'agisse d'une variation nucléotidique ponctuelle ou d'une correction partielle de non-disjonction méiotique conduisant à une trisomie en mosaïque), les différentes populations cellulaires d'une chimère diffèrent sur l'ensemble du génome.

## **Fréquence**

Des mutations ponctuelles ou des petites insertions/délétions se produisent tout au long de la vie d'un individu, à l'occasion de chaque division cellulaire, par le biais d'erreurs de réplication de l'ADN, mais également en dehors des étapes de division cellulaire sous l'influence d'agents mutagènes intrinsèques et extrinsèques. À l'âge de la reproduction, Lynch (13) a estimé le nombre de mutations acquises à  $10^{16}$  pour les seules mutations ponctuelles<sup>1</sup>, soit entre 100 et 1000 SNV par cellule. Pour rendre compte de la globalité des variations acquises, il faudrait également considérer les variations touchant plus d'une base, telles que les variations structurales et les variations de nombre de copies. Les mécanismes mis en jeu sont alors très divers (on peut citer la rétro-transposition d'éléments répétés, les erreurs de mécanisme de réparation de cassures chromosomiques, les non-disjonctions mitotiques) et leur nombre global est supposé bien supérieur (14). L'impact individuel de ces variations est pourtant limité, car elles existent chez des individus apparemment en bonne santé. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette tolérance : la part importante de mutations survenues dans des régions non codantes (représentant entre 98 et 99 % du génome), un effet de compensation par l'autre allèle, l'induction d'une apoptose avec extinction de la lignée mutée sans conséquence à l'échelle du tissu concerné, ou encore le maintien d'un fonctionnement cellulaire compatible avec la fonction spécifique attendue d'une cellule différenciée.

La part de ces mutations survenant en période post-zygotique précoce est difficile à estimer, mais des travaux de cytogénétique ont pu démontrer qu'il s'agit d'évènements non rares dès le stade du clivage (15) . Une variation survenant lors du clivage du zygote ou au stade morula sera potentiellement présente dans un plus grand nombre de lignées cellulaires, comme cela a pu être documenté dans le cadre de mosaïques chromosomiques précoces (16). Leurs

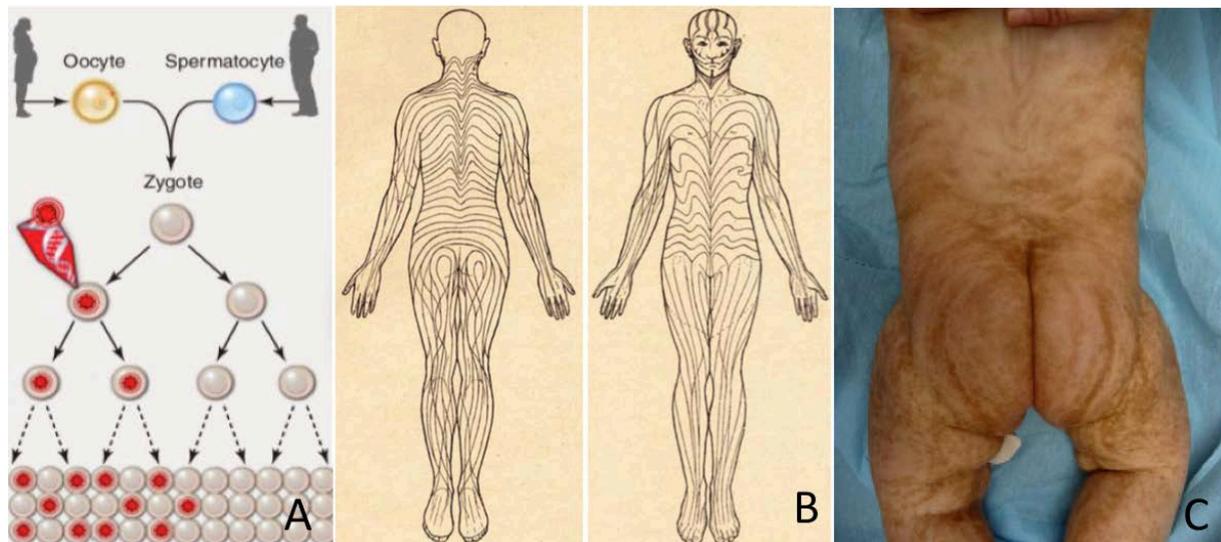
---

<sup>1</sup> En tenant compte d'un taux basal de mutations ponctuelles de  $10^{-8}$  par site et par génération, d'un génome diploïde de  $6.10^9$  nucléotides, pour un organisme produisant  $10^{16}$  cellules au cours de sa vie.

conséquences fonctionnelles sont alors plus générales, entraînant un mosaïcisme inter-organes, qui peut être responsable d'anomalies du développement embryonnaire.

À l'inverse, le mosaïcisme peut faire partie intégrante du développement physiologique, en particulier lorsqu'il s'agit de mosaïcisme plus tardif intra-organe. Les exemples sont multiples, telles que les recombinaisons responsables de la grande diversité des immunoglobulines (17), au sein de la lignée lymphoïde, ou l'hypothèse plus récente d'un mosaïcisme intracérébral comme facteur de différenciation neuronale, par le biais de SNV (18), de CNV (19) ou encore de l'intégration de rétrotransposons pouvant entraîner une modification de l'expression génique (20).

### Figure 1 : Mécanisme d'apparition des mutations post-zygotiques et illustration des conséquences en dermatologie



A : Survenue précoce après la conception (post-zygotique) d'une mutation, qui ne touchera qu'une partie des cellules de l'individu (adapté de Poduri *et al.*, Science 2013 (11)). B : Atlas constitué par Alfred Blaschko à partir de l'observation de 170 patients porteurs de nævus linéaires (21). Les lignes de Blaschko constituent une des six dispositions typiques des lésions en mosaïque d'après Happle, 2014 (22). C : Patient de 10 jours porteur d'une Hypermélanose Nævoïde Linéaire et en Volutes (LWNH : *Linear and Whorled Naevoid Hypermelanosis*), suivant les lignes de Blaschko, sur l'ensemble du corps (23), en lien avec une mutation post-zygotique d'un gène impliqué dans la mélanogénèse (24).

## 2. Expression clinique des mutations post-zygotiques

Même si un mosaïcisme peut concerner tous les organes et tissus d'un organisme multicellulaire, la peau constitue un organe privilégié pour l'étude des anomalies du développement en mosaïque : elle est directement observable, et relativement facile à prélever.

Un dermatologue allemand, Alfred Blaschko, a réalisé au début du XX<sup>ème</sup> siècle, un travail fondateur en analysant la disposition cutanée atypique de « nævus linéaires » ((21) et Figure 1B). Ces lignes ont par la suite été interprétées comme une manifestation cutanée d'un mosaïcisme (25,26), et sont aujourd'hui considérées comme le trajet de migration radiale des cellules de l'ectoderme différencié en plaque neurale et ectoderme cutané.

La classification clinique contemporaine des mosaïques et la compréhension des mécanismes biologiques qui la sous-tendent doivent également beaucoup aux hypothèses du Professeur Rudolf Happle (27). Plusieurs niveaux de distinctions peuvent être considérés, que nous allons passer succinctement en revue.

### **Selon le tissu atteint**

Un premier niveau de distinction peut s'opérer entre une atteinte de la lignée somatique ou de la lignée germinale. On peut distinguer, selon le tissu porteur de la variation, et donc selon la possibilité d'une transmission à la descendance, les mosaïcismes somatiques, gonadiques (ou mosaïques germinales), ou mixtes (28). Cette distinction théorique revêt une importance particulière pour le conseil génétique, mais reste techniquement et éthiquement difficile à mettre en évidence en pratique, du fait de la nécessité des prélèvements tissulaires multiples.

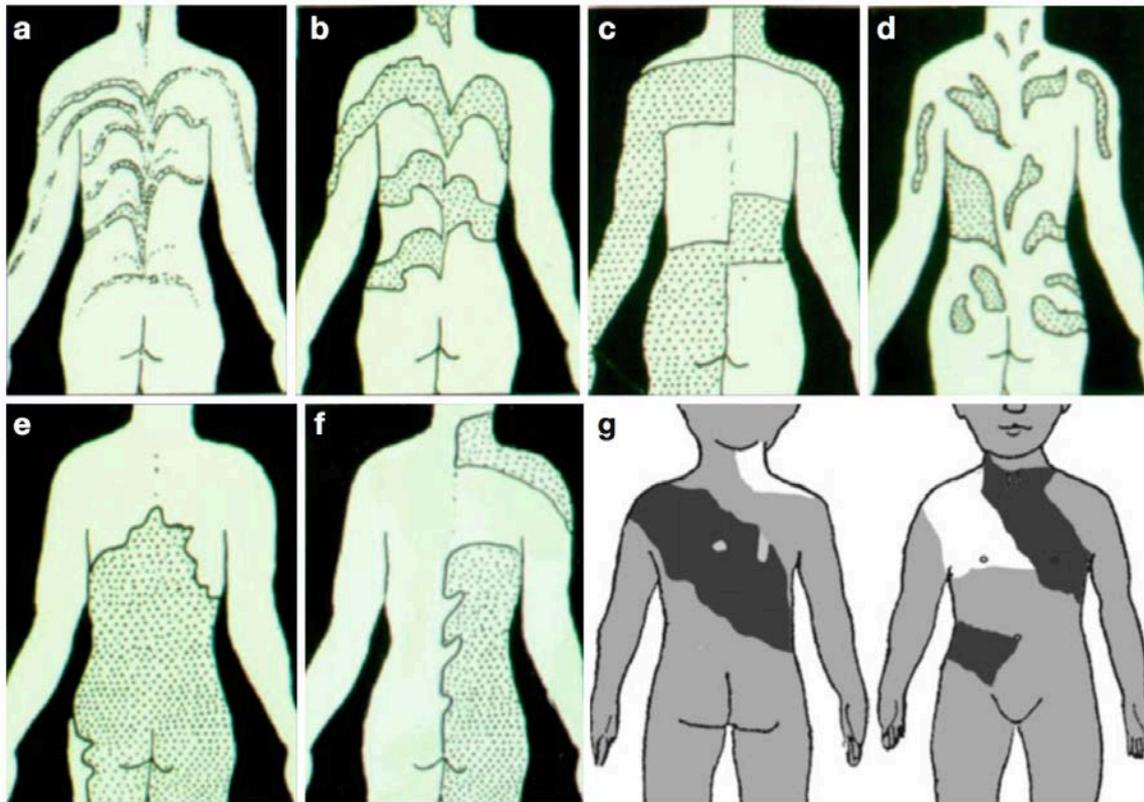
### **Selon la topographie cutanée**

Happle a distingué 6 types caractéristiques de disposition (*patterns*) des dermatoses en mosaïque (Figure 2). Même si cette classification peut aider à l'identification de certains tableaux cliniques, elle ne repose pas sur les bases physiopathologiques des mosaïques, mais sur l'observation de topographies cutanées récurrentes.

Les anomalies de la pigmentation cutanée en mosaïque suivent volontiers les lignes de Blaschko. Elles peuvent résulter tant d'une mosaïque génomique que d'une mosaïque épigénétique, par exemple par inactivation aléatoire du chromosome X. Aucune disposition n'est réellement typique ou évocatrice d'une entité nosologique, à l'exception peut-être du type phylloïde fréquemment associé à des anomalies du chromosome 13 (29) et du type 6 dans le syndrome de Ruggieri-Happle avec cutis tricolor (30).

Il faut ajouter à cette classification la notion de présentations segmentaires (touchant des parties distinctes du corps, de manière asymétrique, en respectant la ligne médiane) ou non segmentaires (qui couvrent un large éventail de manifestations, du nævus mélanocytaire commun au type 6 de la précédente classification) (27).

**Figure 2 : Six motifs cutanés récurrents d'expression des mosaïques**



Classification en 6 types selon Happle : Type 1 : Lignes de Blaschko en bandes fines (a) ou larges (b). Type 2 : Aspect en damier (c). Type 3 : Aspect phylloïde (d). Type 4 : Plages larges sans séparation médiane (e). Type 5 : Aspect latéralisé (f). Type 6 : Aspect « en écharpe » (g).

### **Selon le mécanisme de pathogénicité**

Les premières mentions du rôle de mutations en mosaïque dans les anomalies du développement ont été formulées au sujet de cas sporadiques, par exemple le syndrome de Protée ou de McCune Albright. Dans ces cas, il a été émis l'hypothèse d'une mutation létale à l'état constitutionnel, dont seul le mosaïcisme permettait la survie (31), par analogie avec l'existence d'aneuploïdies létales à l'état constitutionnel, mais viables en mosaïques. Par la suite, il s'est avéré qu'une part importante des maladies en mosaïque est secondaire à des mutations post-zygotiques dans des gènes également impliqués dans des maladies autosomiques dominantes. L'effet de ces mutations post-zygotiques ne doit pas être confondu avec l'expressivité variable qui peut être observée dans ces syndromes, mais entraîne une forme segmentaire de la maladie, concernant une partie du corps seulement. Parmi ces manifestations en mosaïques de maladies mendéliennes, deux types peuvent être distingués :

- le type 1, dans lequel survient chez un individu une mutation dont ses cellules ne sont pas préalablement porteuses, entraînant une atteinte tissulaire segmentaire ;
- le type 2, dans lequel une mutation survient chez un individu déjà porteur d'une mutation

constitutionnelle hétérozygote au même locus dans l'ensemble de ses cellules, entraînant une perte d'hétérozygotie, et un nouveau phénotype, qui se surajoute à un éventuel phénotype cutané constitutionnel.

### 3. Détection biologique des mutations en mosaïque

Si en cytogénétique le mosaïcisme a été reconnu depuis longtemps, la détection des mutations ponctuelles s'est longtemps heurtée aux limites des techniques conventionnelles de séquençage. Depuis l'arrivée du NGS, diverses méthodes peuvent être choisies pour l'étude des mosaïques, qui ne sont pas nécessairement mutuellement exclusives.

#### **Cytogénétique conventionnelle**

Des anomalies chromosomiques en mosaïque ont été identifiées dès les débuts des techniques de caryotype ou d'hybridation fluorescente *in situ* (FISH). Ces techniques sont toujours indiquées, par exemple pour la détection d'aneuploïdies en mosaïque, mais sont limitées par leur résolution (taille des anomalies détectables), par la nécessité de passer par une étape de culture cellulaire pour l'étude des mitoses, et pour la FISH, qui est une technique ciblée, de sélectionner une ou plusieurs sondes.

#### **Puces à ADN**

Les puces type CGH-*array* ou SNP-*array*, à l'usage depuis le début du XXI<sup>ème</sup> siècle, ont apporté, outre une vision pan-génomique et une meilleure résolution (dépendant du *design* choisi : nombre et position des oligonucléotides), la possibilité de réaliser en une fois l'étude d'un ensemble de cellules, éventuellement d'origines tissulaires diverses (par exemple l'ensemble des cellules d'une biopsie de peau). Elles s'affranchissent également de la contrainte d'une culture cellulaire, source de biais (amplification préférentielle d'un clone mutant, ou à l'inverse extinction d'un clone mutant). En revanche, la CGH-*array* est limitée par son incapacité à détecter les réarrangements chromosomiques équilibrés, tels que les variants structuraux. Une SNP-*array* sera efficace pour la détection d'une perte d'hétérozygotie, et pourra ainsi apporter des informations utiles à la compréhension du mécanisme de certaines anomalies, grâce aux données de fréquence de l'allèle mineur (*b allele frequency*).

## ***Next Generation Sequencing***

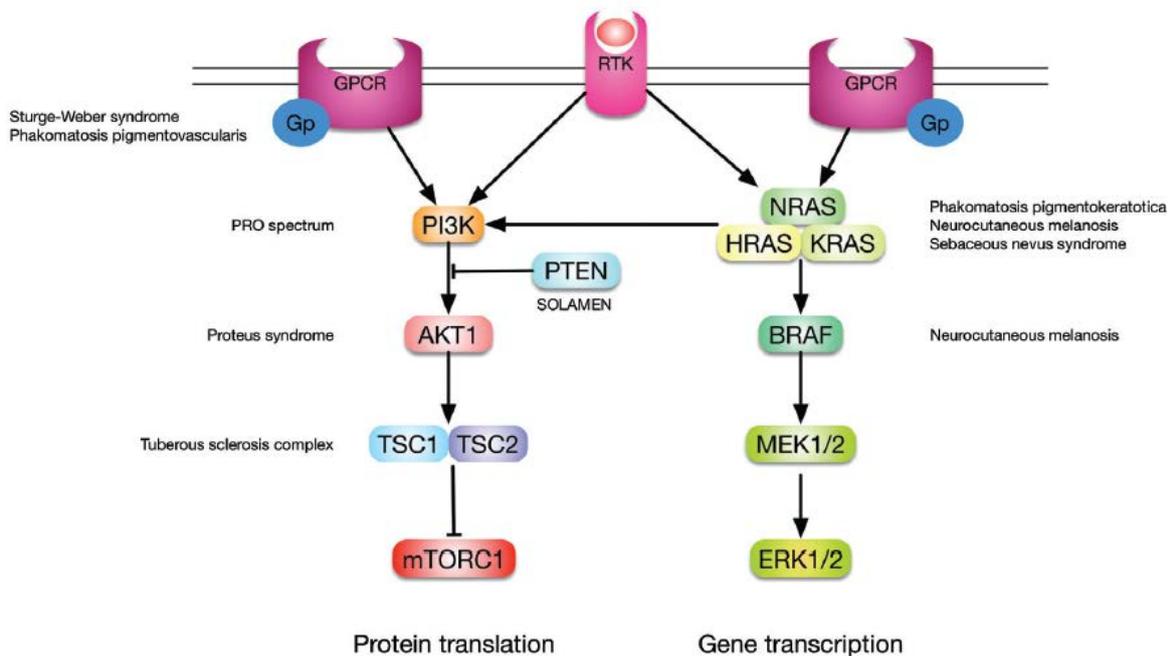
En dehors de rares exemples, les techniques de biologies moléculaires conventionnelles ont rarement permis d'élucider les bases moléculaires de certaines anomalies du développement avec atteinte cutanée en mosaïque. On peut ainsi citer la découverte du rôle de *GNAS* dans le syndrome de McCune-Albright en 1991 (32), mais il aura fallu l'entrée dans l'ère du séquençage massivement parallèle, pour connaître des progrès significatifs. En 2011, Lindhurst *et al.* identifiaient une mutation post-zygotique activatrice de *AKT1* comme la cause du syndrome de Protée (4). Depuis, des mutations ponctuelles responsables d'un mosaïcisme cutané ont été identifiées dans environ 50 gènes. Outre le séquençage d'exome complet, qui permet l'identification de nouveaux gènes causaux, le séquençage ciblé en profondeur permet la détection de mutations à très faible taux, avec une sensibilité avoisinant 1 % (5). Les techniques de NGS constituent aujourd'hui l'approche privilégiée pour l'étude des variants ponctuels en mosaïque (33). En revanche, les performances du NGS pour la détection de CNV et de variants structuraux restent à évaluer.

### 4. État des connaissances actuelles

La diffusion des techniques de NGS a permis ces dernières années d'importantes avancées dans l'identification des bases moléculaires des anomalies du développement avec atteinte cutanée en mosaïque.

En particulier, dans nombre de syndromes avec hyperplasie ou hypertrophie, des mutations post-zygotiques avec effet gain de fonction ont été identifiées. Ces mutations avec effet activateur, sont souvent létales à l'état constitutionnel, et peuvent également être retrouvées dans des tissus tumoraux. On peut citer les syndromes du spectre PROS (34) (*PIK3CA-related overgrowth spectrum*, dont le syndrome CLOVES (*Congenital Lipomatous, Overgrowth, Vascular malformations, Epidermal naevi and Skeletal anomalies*) ou le syndrome Macrocéphalie-malformations capillaires (MCAP)), le syndrome de Schimmelpenning (7), de Sturge-Weber (35), ... La majorité des gènes ainsi identifiés appartiennent à deux cascades de signalisations interconnectées (36) responsables de la survie et de la prolifération cellulaire : les voies PI3K-AKT-mTOR (37) et Ras-MAP kinases (38), ainsi que la voie des protéines G, impliquée dans la transduction du signal en amont des voies précédentes (Figure 3).

**Figure 3** : Représentation simplifiée des voies de signalisation PIK3-AKT-mTOR et RAS-MAPK, et de la voie des protéines G.



Adapté de van Steensel 2015 (36)

La majorité des identifications de causes monogéniques de syndromes en mosaïque ces dernières années ont concerné les syndromes avec hypertrophie. Les connaissances ont moins évolué en ce qui concerne les causes des syndromes avec hypopigmentation cutanée en mosaïque, telle que l'hypomélanose d'Ito (39). Cette catégorie d'anomalies en mosaïque reste à ce jour peu explorée.

## 5. Anomalies de la pigmentation cutanée et mosaïcisme

L'hypomélanose d'Ito a été décrite en 1952, comme une « image en négatif de l'*incontinentia pigmenti* » (40). Il s'agit d'une dépigmentation cutanée, congénitale ou acquise précocement, suivant une disposition en bandes ou taches selon les lignes de Blaschko, touchant au moins deux segments du corps, fréquemment associée à des signes extra cutanés, dont des atteintes du système nerveux central (41). Les plus fréquentes sont une déficience intellectuelle, une épilepsie, des anomalies diverses à l'imagerie cérébrale (hypoplasie cérébelleuse, anomalies de la substance blanche, dilatation ventriculaire), et ont été interprétées comme la conséquence d'une anomalie de migration des cellules de la crête neurale. Ont également été rapportées des atteintes musculosquelettiques (scoliose, clinodactylies, déformations thoraciques), oculaires (strabisme, nystagmus, cataracte) et dentaires.

L'hypothèse d'un mosaïcisme génétique sous-jacent a été documentée dès 1988, avec l'identification d'aneuploïdies en mosaïques (42). Les anomalies de nombre de chromosomes en mosaïque sont fréquemment associées à l'HI, jusqu'à 52 % au sein de certaines cohortes (10) mais le lien physiopathologique demeure incertain. Tous les chromosomes peuvent être concernés, une des anomalies les plus fréquentes étant la trisomie 18 en mosaïque. Cependant, les tentatives d'isoler un gène ou un locus causal à partir des sites remaniés au sein des chromosomes impliqués n'ont pas été contributives (43). À côté de ces anomalies chromosomiques fréquentes, peu de mutations monogéniques ont été identifiées.

Elles ont nécessité l'avènement du NGS, qui a permis la mise en évidence d'une mutation post-zygotique récurrente de *MTOR* (9) dans l'HI avec (hémi)mégalencéphalie. L'hypopigmentation n'est cependant pas constante chez les patients porteurs de variants de *MTOR*, chez qui l'atteinte cérébrale est au premier plan.

### **III. Matériels et méthodes**

#### **1. La cohorte M.U.S.T.A.R.D.**

Les patients étudiés dans le cadre de ce travail sont issus de la cohorte M.U.S.T.A.R.D. (*Mosaic Undiagnosed Skin Traits And Related Disorders*), initialement constituée à partir de 2010, dans le cadre d'un projet financé par le Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) dont l'investigateur principal est le Pr Pierre Vabres. L'objectif de ce projet était initialement la détection de CNV à l'aide de puces à ADN de type CGH-array, chez 80 patients avec anomalies du développement associées à des anomalies cutanées en mosaïque. La cohorte a par la suite été étendue à davantage de patients dans le cadre d'un financement ANR – Programme Retour Post-Doctorants (investigateur principal : Dr Jean-Baptiste Rivière), et les investigations génétiques ont été remplacées par le NGS pan-génomique ou ciblé.

Les patients ont été inclus à l'issue d'une consultation spécialisée, en génétique ou dermatologie, au cours de laquelle le consentement du patient ou de son représentant légal a été recueilli. Une biopsie de peau du patient a été réalisée sur un territoire cutané évocateur de mosaïcisme. Pour le patient et ses deux parents, un prélèvement sanguin sur tube EDTA a également été réalisé, ainsi que des prélèvements d'autres tissus d'intérêt chez le cas index, en fonction de l'expression clinique.

Au début de l'année 2017, la cohorte comportait 613 patients et leurs apparentés. Lorsque la présentation clinique était évocatrice d'un syndrome précédemment identifié, le séquençage ciblé d'un ou plusieurs gènes connus était réalisé en première intention. En l'absence d'orientation clinique, ou en cas de résultat négatif d'un séquençage ciblé, les dossiers étaient analysés individuellement en vue d'un séquençage d'exome.

#### **2. Anomalies pigmentaires dans la cohorte M.U.S.T.A.R.D.**

Une anomalie de la pigmentation cutanée en mosaïque a été identifiée chez 57 patients de la cohorte M.U.S.T.A.R.D. Chez 44 patients il s'agit d'une hypopigmentation. En raison de l'absence d'étiologie moléculaire identifiée dans ce cadre nosologique, 22 prélèvements ont

fait l'objet d'un séquençage d'exome. Parmi ceux-ci, une association phénotypique récurrente a pu être identifiée chez 3 patients (Sujets S1, S2 et S3, voir Annexe 1). Il s'agit d'un tableau non décrit à ce jour, associant de manière constante :

- une dépigmentation linéaire typique de HI, sur les quatre membres et le cou, associée à une hypotrichose
- une alopécie, prédominant au vertex
- une dysmorphie faciale : asymétrie faciale, hypoplasie mandibulaire unilatérale, microtie et microphthalmie unilatérale
- des anomalies dentaires, prédominant du côté de l'hypoplasie mandibulaire : agénésies dentaires multiples, dents coniques ou hypoplasiques, anomalies de l'émail
- des anomalies oculaires : myopie avec choroïdose et baisse d'acuité visuelle parfois profonde, cataracte, micro-orbitie
- des anomalies des extrémités : brachydactylie, syndactylie
- des atteintes profondes de la substance blanche à l'IRM chez les sujets 1 et 2, prédominant du côté de l'hypoplasie mandibulaire, avec dilatation des espaces de Virchow Robin, et une lésion kystique rétrovermienne chez le sujet 2 (Partie II - Supplementary Figure 2).

Tous les patients présentent un développement intellectuel normal.

### 3. Extraction d'ADN

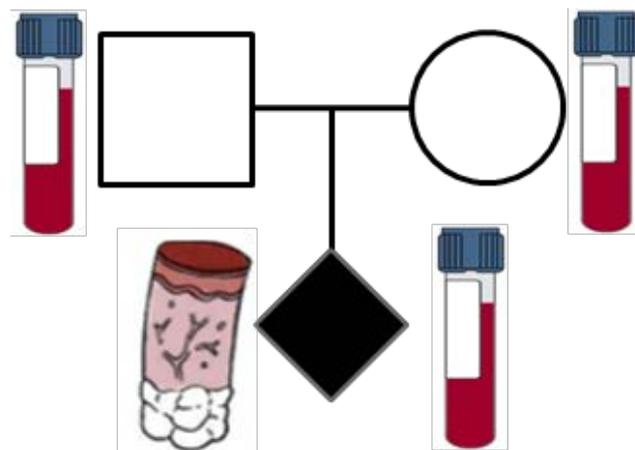
L'ADN génomique a été extrait à l'aide du kit Gentra Puregene Tissue Kit de Qiagen. À la réception, les biopsies de peau nécessitent une étape préalable de pesée et de fragmentation. Les cellules sont lysées avec la solution *Cell Lysis* de Qiagen en quantité adaptée au poids de la pièce de tissu. Les protéines sont lysées par la protéinase K. Puis l'ADN génomique est purifié : élimination des ARN par la RNase A et des protéines par la *Protein Precipitation Solution*, selon les recommandations du fabricant. L'ADN est ensuite précipité à l'isopropanol, lavé à l'éthanol et re-suspendu dans la *DNA Hydration Solution*. Il peut ensuite être conservé à -20°C.

### 4. Séquençage d'exome complet

Devant l'hypothèse d'une cause post-zygotique, le séquençage massivement parallèle de l'exome complet (WES) est réalisé en trio (cas index et ses deux parents) afin de permettre la détection d'un variant *de novo* en mosaïque (Figure 4.) Il est réalisé par un prestataire externe

(Integragen, Evry, France), à partir d'une quantité de 3 µg d'ADN génomique par individu. Le kit de capture utilisé est le SureSelectXT Human All Exon V5 sans UTR (Agilent Technologies), permettant de couvrir l'ensemble des exons. Le séquençage est effectué sur une plateforme Illumina. Il s'agit d'un séquençage *paired-end* produisant des séquences de 150 paires de bases. Une profondeur (nombre de lecture par base) minimale de 150x est demandée chez les cas index, et de 60x chez les apparentés. Les données de séquençage brutes sont ensuite transmises au laboratoire pour analyse.

**Figure 4 : Séquençage d'exome « en trio »**



L'ADN issu de tissu atteint du cas index est comparé à l'ADN leucocytaire de ses parents

## 5. Analyse bioinformatique

**Centre de Calcul de l'Université de Bourgogne** – Le laboratoire dispose d'un accès au Centre de Calcul de l'Université de Bourgogne, un cluster de calcul composé de 250 serveurs Linux regroupant 3900 cœurs, avec une puissance de 175 TFLOPS (février 2016). Il est utilisé pour le traitement des données issues du séquençage et leur stockage.

**Pipeline** – Les différentes étapes du traitement des données de séquençage, des contrôles qualité sur données brutes à l'annotation des variants, sont intégrées dans un algorithme appliqué à l'ensemble des patients et schématisé dans l'Annexe 3. Après alignement sur le génome de référence (build GRCh37/hg19, UCSC Genome Browser) par le Burrows-Wheeler Aligner (BWA) (44), les duplicats de PCR sont marqués et retirés par le logiciel Picard (<http://picard.sourceforge.net>). Les scores de qualité de chaque base sont ajustés et l'alignement est affiné autour des événements d'insertion-délétion (indels) par différents outils du Genome Analysis Toolkit (GATK) (45) comme BaseRecalibrator ou

IndelRealigner. Les bases qui diffèrent du génome de référence sont recherchées (*variant calling*) par HaplotypeCaller (GATK) et annotées par SeattleSeqAnnotation. Dans le cas d'une analyse en trio, l'annotation se fera en tenant compte des liens de parenté pour différencier les variants hérités d'un des deux parents (ou présents dans le tissu sain pour les analyses en paire) ou *de novo*.

## Interprétation des variants

Pour chaque individu, les variants annotés sont inspectés manuellement, par comparaison avec des bases de données publiques et locales, outils de prédiction *in silico*, visualisation des séquences alignées dans le logiciel Integrative Genomics Viewer (IGV). Les outils et arguments suivants sont utilisés :

- **conséquence prédite sur la protéine** : une variation non-sens ou entraînant un décalage du cadre de lecture avec apparition d'un codon STOP prématuré est plus probablement pathogène qu'une variation faux-sens ou synonyme

- **dbSNP** ([www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/)) : base recensant les polymorphismes chez l'homme. La présence d'un variant à une fréquence  $\geq 1\%$  dans la base dbSNP est un motif de rejet du variant, qui peut être considéré comme un polymorphisme

- **ExAC** (*Exome Aggregation Consortium*, Cambridge, USA, [www.exac.broadinstitute.org](http://www.exac.broadinstitute.org)) (46): base de données issue du séquençage d'exome de 60 706 individus. La présence de la variation dans cette base est également un argument en faveur de son caractère non pathogène, car le variant est toléré chez des sujets sains ou présentant un phénotype sans lien avec la pathologie étudiée (à révélation tardive, ...). Elle fournit également des scores de tolérance aux mutations faux-sens et non-sens pour chaque gène, basés sur la comparaison entre le nombre de variations observées et attendues (47). Elle est en passe d'être remplacée par la base gnomAD (actuellement en version beta), produite par la même équipe, mais agrégeant les données de 123 136 exomes et 15 496 génomes complets (<http://gnomad.broadinstitute.org/>)

- **CADD Score** (*Combined Annotation Dependent Depletion*) (48) : score intégrant plusieurs outils de prédiction *in silico* de l'effet d'un SNV ou de petites insertions ou délétions. Sur une échelle de 0 à 99, un variant portant un score  $\geq 20$  est situé parmi les 1% les plus délétères

- **Grantham Score** (49) : dans le cadre d'une substitution d'acide aminé, évalue la distance entre la nature physicochimique des acides aminés concernés. Il varie entre 0 et 215 (distance la plus importante)

- **Score de conservation GERP** (*Genomic Evolutionary Rate Profiling*) (50) : score de

conservation de chaque nucléotide, évalué par comparaison d'alignement multi-espèces. Il varie de -12.3 à 6.17 (le plus conservé)

- **PolyPhen-2** (51) : score de prédiction de l'impact d'une substitution d'acide aminé sur la fonction d'une protéine, établi à l'aide de données de structure et d'évolution comparative de la protéine concernée. Représentation du résultat sous forme d'une *heatmap* variant entre 0 (*neutral*) et 1 (*probably damaging*).

- **SIFT** (Sorting Intolerant From Tolerant) (52) : attribue à un variant (SNV ou indel) un score prédisant l'effet de la substitution d'acide aminé qui en découle sur la fonction protéique, à partir de données d'homologies de séquence ainsi que des propriétés physico-chimiques de ces acides aminés. Ce score se situe entre 0 et 1, une valeur inférieure à 0,05 étant considérée comme la prédiction d'une substitution délétère.

Ces différents outils de prédiction doivent être utilisés avec prudence, car ils ne fournissent qu'une estimation du risque de pathogénicité d'un variant, en fonction d'arguments indirects, telles que des données de conservation inter-espèce ou de modification des propriétés physico-chimiques d'un acide aminé. Ils peuvent en outre présenter des redondances, dans leurs algorithmes ou leurs données sources, expliquant des prédictions concordantes mais non-indépendantes. Ils ne peuvent donc être pris en compte seuls, et ne sont jamais suffisants pour classer un variant, mais doivent s'intégrer dans un faisceau d'arguments permettant de prioriser l'analyse.

## 6. Réplication des résultats et études fonctionnelles

### **Évaluation des conséquences fonctionnelles des variants détectés**

Afin d'évaluer les conséquences fonctionnelles des variants identifiés, une collaboration externe a été mise en place avec l'équipe du Professeur Elizabeth Ross au Weill Cornell Medical College, New York (voir Partie II - Methods).

### **Séquençage MiSeq : vérification des variants et séquençage ciblé en profondeur**

Les variants d'intérêt sont confirmés par une seconde technique de séquençage en profondeur. Cette technique est également utilisée, lorsque des gènes candidats sont identifiés, pour le design d'une approche de séquençage ciblé, permettant de rechercher en très forte profondeur des mutations post-zygotiques à faible taux chez des patients supplémentaires présentant un

phénotype similaire ou chevauchant.

Des amorces introniques sont conçues avec Primer Express v3, puis une PCR long-range est réalisée selon le protocole standard. Les produits de PCR sont purifiés, et les bibliothèques sont préparées avec le Nextera XT DNA Sample Preparation kit (Illumina). Un séquençage en *paired-end* est réalisé sur un séquenceur MiSeq (Illumina), pour des séquences de 150-bp selon les recommandations du fabricant. Une profondeur minimale de 100 est requise pour les exons et les jonctions intron-exon.

Lorsqu'un variant candidat est présent à l'état constitutionnel, sa présence peut également être confirmée par un séquençage conventionnel selon la méthode de Sanger.

## **Partie II - Article**

1 **TITLE**

2 Postzygotic dominant-negative mutations of *RHOA* cause a mosaic neuroectodermal syndrome

3

4 **AUTHORS**

5 Pierre Vabres<sup>1-3,23,\*</sup>, Arthur Sorlin<sup>1,2,23</sup>, Stanislav S Kholmanskikh<sup>4,23</sup>, Bénédicte Demeer<sup>5</sup>, Judith St-Onge<sup>1,2,6</sup>,  
6 Yannis Duffourd<sup>1,2</sup>, Paul Kuentz<sup>1,2,7</sup>, Jean-Benoît Courcet<sup>1,2,8</sup>, Virginie Carmignac<sup>1,2</sup>, Didier Bessis<sup>9</sup>, Odile  
7 Boute<sup>10</sup>, Alain Bron<sup>11</sup>, Guillaume Captier<sup>12</sup>, Esther Carmi<sup>13</sup>, Sophie Dalac<sup>3</sup>, Bernard Devauchelle<sup>14</sup>, David  
8 Geneviève<sup>15</sup>, Catherine Gondry-Jouet<sup>16</sup>, Laurent Guibaud<sup>17</sup>, Arnaud Lafon<sup>18</sup>, Julien Thevenon<sup>1,2,8</sup>, William B  
9 Doby<sup>19</sup>, Geneviève Bernard<sup>6,20,21</sup>, Laurence Faivre<sup>1,2,8,24</sup>, M Elizabeth Ross<sup>4,24</sup>, Jean-Baptiste Rivière<sup>1,2,6,22,24,\*</sup>

10

11 **AFFILIATIONS**

12 <sup>1</sup>Fédération Hospitalo-Universitaire Médecine Translationnelle et Anomalies du Développement, CHU Dijon  
13 Bourgogne, Dijon, France.

14 <sup>2</sup>Equipe d'Accueil 4271 Génétique des Anomalies du Développement, Université Bourgogne Franche-Comté,  
15 Dijon, France.

16 <sup>3</sup>Service de Dermatologie, CHU Dijon Bourgogne, Dijon, France.

17 <sup>4</sup>Center for Neurogenetics, Feil Family Brain and Mind Research Institute, Weill Cornell Medicine, New York,  
18 New York, USA.

19 <sup>5</sup>Unité de Génétique Médicale et Oncogénétique, CHU Amiens Picardie, Amiens, France.

20 <sup>6</sup>Child Health and Human Development Program, Research Institute of the McGill University Health Centre,  
21 Montreal, Quebec, Canada.

22 <sup>7</sup>Génétique Biologique Histologie, CHRU de Besançon, Besançon, France

23 <sup>8</sup>Service de Pédiatrie 1 et de Génétique Médicale, CHU Dijon Bourgogne, Dijon, France.

24 <sup>9</sup>Département de Dermatologie, CHU de Montpellier, Montpellier, France.

25 <sup>10</sup>Service de Génétique Clinique, CHU Lille, Lille, France.

26 <sup>11</sup>Service d'Ophtalmologie, CHU Dijon Bourgogne, Dijon, France.

27 <sup>12</sup>Service de Chirurgie orthopédique et plastique pédiatrique, CHU de Montpellier, Montpellier, France.

28 <sup>13</sup>Service de Dermatologie, CHU Amiens Picardie, Amiens, France.

29 <sup>14</sup>Département de Chirurgie Maxillo-Faciale et Stomatologie, CHU Amiens Picardie, Amiens, France.

30 <sup>15</sup>Département de Génétique Médicale, Maladies rares et Médecine Personnalisée, CHU de Montpellier,  
31 Montpellier, France.

32 <sup>16</sup>Département de Radiologie, CHU Amiens Picardie, Amiens, France.

33 <sup>17</sup>Service d'Imagerie Pédiatrique et Fœtale, Hôpital Femme-Mère-Enfant Louis Pradel, Hospices Civils de Lyon,  
34 Bron, France.

35 <sup>18</sup>Service d'Odontologie-Stomatologie, CHU Dijon Bourgogne, Dijon, France.

36 <sup>19</sup>Center for Integrative Brain Research, Seattle Children's Research Institute, Seattle, Washington, USA.

37 <sup>20</sup>Departments of Neurology and Neurosurgery, and Pediatrics McGill University, Montreal, Quebec, Canada.

38 <sup>21</sup>Department of Medical Genetics, Montreal Children's Hospital, McGill University Health Centre, Montreal,  
39 Quebec, Canada.

40 <sup>22</sup>Department of Human Genetics, Faculty of Medicine, McGill University, Montreal, Quebec, Canada.

41 <sup>23</sup>These authors contributed equally to this work.

42 <sup>24</sup>These authors jointly directed this work.

43 \*Correspondence should be addressed to P.V. (pierre.vabres@chu-dijon.fr) or J.-B.R. (jean-  
44 baptiste.riviere@mcgill.ca).

45

#### 46 **CORRESPONDING AUTHORS**

Pierre Vabres, MD, PhD

Centre Hospitalo-Universitaire Dijon Bourgogne

14 rue Paul Gaffarel BP 77908

21079 Dijon cedex, France

Phone: +33 3 80 29 33 36

Fax: +33 3 80 29 30 28

Email: pierre.vabres@chu-dijon.fr

Jean-Baptiste Rivière, PhD

McGill University Health Centre

1001 Decarie Boulevard, Room E05.1642

Montreal (QC) H4A 3J1, Canada

Phone: 514-934-1934 ext. 76209

Fax: 514-843-1661

Email: jean-baptiste.riviere@mcgill.ca

47

48

49 **ABSTRACT**

50 Hypopigmentation along Blaschko's lines is a hallmark of a poorly defined group of mosaic syndromes whose  
51 genetic causes are unknown. Here we show that postzygotic dominant-negative mutations of *RHOA* cause a  
52 neuroectodermal syndrome combining linear hypopigmentation, alopecia, apparently asymptomatic  
53 leukoencephalopathy, and facial, ocular, dental, and acral anomalies. Our findings pave the way towards  
54 elucidating the etiology of pigmentary mosaicism and highlight the role of *RHOA* in human development and  
55 disease.

56

57 **MAIN TEXT**

58 Linear hypopigmentation, which is commonly seen as a non-specific manifestation of mosaicism, is currently  
59 classified using poorly defined umbrella terms such as "pigmentary mosaicism" and "hypomelanosis of Ito"<sup>1</sup>.  
60 Because of its frequent association with various extracutaneous anomalies (especially cerebral involvement and  
61 epilepsy), hypomelanosis of Ito is often considered as a neurocutaneous syndrome, the fourth most common  
62 after neurofibromatosis, tuberous sclerosis complex, and Sturge-Weber syndrome<sup>2,3</sup>. Apart from rare reports of  
63 non-recurrent mosaic chromosomal anomalies<sup>1</sup>, the genetic causes of pigmentary mosaicism have remained  
64 largely unknown, which hinders diagnosis and patient care.

65

66 As part of our research program on mosaic skin disorders, we ascertained six unrelated individuals with a  
67 remarkably similar constellation of features that did not match any known syndrome (**Fig. 1, Supplementary**  
68 **Figs. 1 and 2, and Supplementary Table 1**). Key clinical features included linear hypopigmentation and pilar  
69 dysplasia following the lines of Blaschko, asymmetric facial dysmorphism (craniofacial microsomia and broad  
70 nasal bridge), acral anomalies (brachydactyly, syndactyly, and broad first toe), teeth anomalies (oligodontia,  
71 microdontia, and conical teeth), and ocular anomalies (microphthalmia, strabismus, and myopia). Brain magnetic  
72 resonance imaging (MRI) was available for three patients and showed diffuse cystic leukoencephalopathy with  
73 mildly enlarged lateral ventricles (**Fig. 1 and Supplementary Fig. 2**). Despite this striking brain phenotype, all  
74 affected individuals had normal development and intelligence, and showed no neurological deterioration. The  
75 linear hypopigmented lesions following Blaschko's lines, asymmetric craniofacial and brain features, and  
76 sporadic occurrence were highly suggestive of mosaicism.

77

78 We hypothesized that this previously unrecognized mosaic neuroectodermal syndrome was likely to result from  
79 postzygotic mutations in the same gene. We conducted whole-exome sequencing (WES) in two parent–case  
80 trios (subjects S1 and S2) using genomic DNA derived from patients' affected skin and parental blood samples  
81 (Online Methods and **Supplementary Table 2**). We identified the same postzygotic change of *RHOA*  
82 (c.139G>A; p.Glu47Lys) supported by 30.6% (44/144) and 2.6% (6/228) of reads in subjects S1 and S2,  
83 respectively (**Supplementary Figs. 3 and 4**). We confirmed the presence and postzygotic nature of these  
84 mutations by targeted ultra-deep sequencing of the region spanning the c.139G>A substitution in all available  
85 DNA samples from the two patients and their parents (Online Methods and **Supplementary Tables 3-5**). Trio-  
86 based WES in a third patient (subject S3) led to identification of another postzygotic *RHOA* change (c.211C>T;  
87 p.Pro71Ser) supported by 24.3% (28/115) of reads (**Supplementary Fig. 5**), thus confirming mutations of *RHOA*  
88 as the cause of this novel syndrome. Amplicon-based ultra-deep sequencing of *RHOA* coding exons in skin-  
89 derived DNA from the remaining three affected individuals led to identification of the recurrent c.139G>A change  
90 (encoding p.Glu47Lys) in two (S4 and S5), for a total of four patients with the exact same change  
91 (**Supplementary Table 5**). This G to A transition occurs at a CpG dinucleotide, which might at least partly  
92 explain its recurrence<sup>4</sup>. We found no mutation in subject S6. Both *RHOA* mutations (c.139G>A and c.211C>T)  
93 were absent from dbSNP (build 147), major public variant databases, and in-house WES data from ~1,500  
94 individuals. They affect highly conserved nucleotides and amino acids, and are predicted as pathogenic *in silico*  
95 (**Supplementary Table 6**). All mutations were absent from blood samples of affected individuals, an  
96 observation with direct implications for diagnosis of this clinical entity. In skin-derived DNA samples, mutant  
97 allele fractions ranged from 1.9% to 33.5% with higher levels in fresh skin than in cultured skin fibroblasts (**Fig.**  
98 **1g** and **Supplementary Table 5**), possibly due to the mesodermal origin of fibroblasts and/or negative selection  
99 of mutant cells during cell culture.

100

101 *RHOA* encodes a RAS-related Rho GTPase known to control a wide range of biological functions such as  
102 morphogenesis, chemotaxis, axonal guidance, and cell cycle progression<sup>5-7</sup>. *RHOA* has been extensively  
103 studied for its central role in signal transduction and actin cytoskeleton dynamics, through regulation of stress  
104 fibers and focal adhesion formation<sup>8</sup>. The two mutations identified here (encoding p.Glu47Lys and p.Pro71Ser)  
105 are located just downstream of each of the two switch regions (**Fig. 1k**), whose GTP-dependent conformational  
106 changes regulate selective interaction of *RHOA* with downstream effectors<sup>9</sup>. To assess the impact of the  
107 recurrent p.Glu47Lys missense change identified in four of our patients, we compared its effect with two well-

108 characterized *RHOA* mutants, namely the dominant-negative p.Thr19Asn<sup>10</sup> and constitutively active p.Gly14Val<sup>11</sup>  
109 changes (Online Methods). We transfected NIH3T3 cells with myc-tagged mutants and wild-type *RHOA*  
110 plasmids. Immunocytochemical localization of F-actin stress fibers and microtubules revealed marked  
111 cytoskeletal alterations in all three transfected cells expressing the mutant plasmids. Similar to the *RHOA*  
112 dominant-negative p.Thr19Asn mutant, p.Glu47Lys expressing cells displayed reduced cell spreading and  
113 decreased number of stress fibers, as well as microtubule disorganization (**Fig. 2a-c**), thus indicating a  
114 dominant-negative effect for the p.Glu47Lys mutation. Consistent with these findings, Western blot analysis of  
115 NIH3T3 cells transfected with either the dominant-negative p.Thr19Asn or p.Glu47Lys revealed reduced levels of  
116 endogenous myosin phosphatase target subunit 1 (MYPT1) phosphorylated at Thr696, and myosin light chain 2  
117 (MLC2) phosphorylated at Thr19, both sites targeted by Rho kinase 1 (ROCK1), a major downstream effector of  
118 *RHOA*<sup>12</sup> (**Fig. 2d** and **Supplementary Fig. 6**).

119

120 We have delineated a clinical and molecular subset of pigmentary mosaicism, which we propose to name  
121 "*RHOA*-related mosaic ectodermal dysplasia". Apart from recent reports of linear hypopigmentation in three  
122 patients with *MTOR*-related hemimegalencephaly<sup>13,14</sup>, no specific genes have been implicated in pigmentary  
123 mosaic disorders. Our findings highlight the value of careful clinical phenotyping combined with massively  
124 parallel sequencing for elucidating their genetic causes. The syndrome described here presents both similarities  
125 and notable differences with other mosaic syndromes involving the skin, such as disorders of the PI3K-AKT-  
126 mTOR and RAS-MAPK pathways<sup>15</sup>. *RHOA* is a highly conserved protein particularly intolerant to amino acid  
127 substitutions, with only five observed missense changes in the Exome Aggregation Consortium (66.9 expected  
128 variants;  $z = 3.70$ ) and no loss-of-function alleles (5.1 expected)<sup>16</sup>. Accordingly, *RHOA* is part of the "core  
129 essentialome", a set of genes essential to cell viability<sup>17,18</sup>, thus supporting the idea that *RHOA*-related mosaic  
130 ectodermal dysplasia should be added to the list of disorders resulting from lethal mutations surviving only by  
131 mosaicism, which includes Proteus, Sturge-Weber, and other mosaic syndromes<sup>19</sup>. All postzygotic mutations  
132 reported to date as causing such mosaic syndromes have been activating mutations also frequently found in  
133 somatic cancer<sup>20</sup>. Our data show that disease-causing lethal mutations surviving by mosaicism can act through a  
134 dominant-negative effect. Intriguingly, although both dominant-negative and activating *RHOA* mutations are  
135 known somatic driver mutations in several cancer types, none of the two mutations identified here were reported  
136 in cancer (**Supplementary Table 7**). Finally, similar to mosaic overgrowth disorders of the PI3K-AKT-mTOR  
137 pathway, identification of other genes causing pigmentary mosaic syndromes may pinpoint common

138 pathogenesis pathways, which will help enhancing our understanding of their causes, and ultimately result in  
139 novel therapeutic opportunities.

140

#### 141 **URLs**

142 dbSNP, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>; Exome Aggregation Consortium (ExAC),  
143 <http://exac.broadinstitute.org/>; University of Burgundy Centre de Calcul (CcuB), [https://haydn2005.u-](https://haydn2005.u-bourgogne.fr/dsi-ccub/)  
144 [bourgogne.fr/dsi-ccub/](https://haydn2005.u-bourgogne.fr/dsi-ccub/); SeattleSeq Annotation, <http://snp.gs.washington.edu/SeattleSeqAnnotation138>; Missouri  
145 S&T cDNA Resource Center, <http://www.cdna.org/>.

146

#### 147 **ACKNOWLEDGMENTS**

148 We thank the subjects and families involved in the study. We also thank the University of Burgundy Centre de  
149 Calcul (CcuB, see **URLs**) for technical support and management of the informatics platform. This work was  
150 funded by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-PDOC-0029 to J.-B.R.) and the Programme  
151 Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) National (to P.V.). G.B. has received a Research Scholar Junior 1  
152 (2012-2016) salary award from the Fonds de Recherche du Québec en Santé (FRQS) and the New Investigator  
153 salary award (2017-2022) from the Canadian Institute for Health Research (CIHR, MOP-G-287547).

154

#### 155 **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

156 P.V. and J.-B.R. designed the study. A.S., J.S.-O., P.K., J.-B.C. and V.C. performed the genetics experiments.  
157 J.-B.R. and Y.D. performed the bioinformatics experiments. S.S.K. performed the functional experiments. P.V.,  
158 B.Dem., D.B., O.B., A.B., G.C., E.C., S.D., B.Dev., D.G., C.G., A.L., J.T. and L.F. recruited and evaluated the  
159 study subjects. L.G., G.B. and W.B.D. analyzed the brain MRI. L.F., M.E.R. and J.-B.R. supervised the study.  
160 P.V., A.S., S.S.K, M.E.R. and J.-B.R. wrote the manuscript. All authors revised the manuscript.

161

#### 162 **COMPETING FINANCIAL INTERESTS**

163 The authors declare no competing financial interests.

164

#### 165 **FIGURE LEGENDS**

166 **Figure 1.** Main clinical features of *RHOA*-related mosaic ectodermal dysplasia and *RHOA* mutations. **(a-e)**  
167 Craniofacial appearance, linear hypopigmentation and other extracutaneous anomalies in subject S1. Additional

168 photographs and brain magnetic resonance imaging (MRI) of affected individuals are provided in  
169 **Supplementary Figs. 1 and 2**. We obtained written consent to publish photographs of this individual. **(f-i)** Brain  
170 MRI of subject S1 at 15 years. A second MRI, conducted 6 months later, did not show any significant change.  
171 Subjects S2 and S4 had similar but milder MRI abnormalities, including enlarged temporal horns of the lateral  
172 ventricles (**Supplementary Fig. 2**). **(f)** Sagittal T1-weighted image revealed preserved midline structures. **(g)**  
173 Axial T2-weighted images revealed a focal hyperintense lesion in the right hemisphere of the cerebellum  
174 (arrowhead), and **(h)** diffuse cystic leukoencephalopathy with mildly enlarged lateral ventricles and cysts in the  
175 thalami and caudate nuclei. **(i)** The leukoencephalopathy and presence of multiple cysts is confirmed on fluid-  
176 attenuated inversion recovery (FLAIR) sequences. **(j)** Mutant allele fraction of *RHOA* mutations in the five  
177 subjects. **(k)** Linear representation of *RHOA* and localization of the two mutations. The five G motifs of the core  
178 guanine nucleotide binding domain are shown in blue.

179

180 **Figure 2.** Dominant-negative effect of the *RHOA* c.139G>A mutation encoding p.Glu47Lys. **(a-c)** Cytoskeletal  
181 organization and morphology in NIH/3T3 cells transfected with wild-type, constitutively active (p.Gly14Val),  
182 dominant-negative (p.Thr19Asn), or disease-causing (p.Glu47Lys) forms of *RHOA*. **(a)** Cells transfected with  
183 wild-type *RHOA* or p.Gly14Val mutant display expected increase in F-actin staining, particularly with regard to  
184 stress fibers which are brighter, thicker and more numerous. Cells transfected with p.Thr19Asn or p.Glu47Lys  
185 mutants barely contain any stress fibers at all. **(b)** Myc staining does not reveal any visible differences in the  
186 subcellular localization of different *RHOA* mutants. All mutants tend to impair cell spreading, while wild-type  
187 *RHOA* overexpressing cells maintain normal morphology. **(c)** Dual labeling for DAPI (blue) and alpha-tubulin  
188 (green) does not reveal significant differences in the gross organization of microtubule cytoskeleton or nuclear  
189 morphology between different mutants. Quantification of the number of cells that display defects in cell  
190 spreading and reduction in stress fibers are shown in the bottom row (n = 100 cells in each group). **(d)**  
191 Expression levels of overexpressed wild-type or mutant myc-tagged *RHOA*, and endogenous *RHOA*, total  
192 MYPT1, phospho-MYPT1 (pThr696), actin, total MLC2, and phospho-MLC2 (pThr19). Representative Western  
193 blots show similar protein loading (endogenous total MYPT1, actin, endogenous *RHOA*, and total MLC2) and  
194 similar overexpression of myc-tagged wild type and mutant *RHOA*. There is a visible reduction in phosphorylated  
195 MYPT1(pThr696) and MLC2(pThr19) when *RHOA*(Thr19Asn) or *RHOA*(Glu47Lys) are overexpressed (see  
196 **Supplementary Fig. 6** for quantitative results).

197

198 **METHODS**

199 **Study subjects.** The study included six unrelated affected individuals and their unaffected parents. Individuals  
200 were phenotypes and recruited by geneticists and dermatologists in Dijon and elsewhere in France, through a  
201 collaborative nationwide effort to identify genes causing mosaic syndromes involving the skin. Inclusion criteria  
202 consisted of the following: sporadic condition, congenital or early childhood onset, and cutaneous lesions with a  
203 pattern suggestive of mosaicism<sup>21</sup> associated with extracutaneous anomalies. We obtained written informed  
204 consent from all subjects or their legal representatives, and the ethics committee of Dijon University Hospital  
205 approved the study. We extracted genomic DNA from fresh skin, cultured skin fibroblasts, and blood samples  
206 using the Gentra Puregene Blood and Tissue Extraction Kit (Qiagen). We assessed genomic DNA integrity and  
207 quantity by agarose gel electrophoresis, NanoDrop spectrophotometry, and Qubit fluorometry (Thermo Fisher).

208  
209 **Whole-exome sequencing (WES).** Exome capture and sequencing were performed at Integragen (Evry,  
210 France) from 1 µg of genomic DNA per individual using the Agilent SureSelect Human All Exon V5 (trios S1 and  
211 S2) and Clinical Research Exome (trio S3) kits. Libraries were sequenced on a HiSeq platform (Illumina) using  
212 paired-end 75-bp reads. Sequences were aligned to the human genome reference sequence (GRCh37/hg19  
213 build of UCSC Genome Browser), and single-nucleotide variants and small insertions/deletions were  
214 systematically detected as previously described<sup>22</sup>. Candidate *de novo* mutational events were identified by  
215 focusing on protein-altering and splice-site changes: (1) supported by at least three reads and 10% of total reads  
216 in the proband; (2) absent in both parents, as defined by variant reads representing less than 5% of total reads;  
217 (3) at base-pair positions covered by at least four reads in the entire trio; and (4) present at a frequency less  
218 than 1% in dbSNP (build 147) and 0.1% in the Exome Aggregation Consortium (ExAC, see **URLs**)<sup>16</sup>. Candidate  
219 low-level postzygotic changes of *RHOA* in subject S2 were detected as previously described<sup>23</sup>. Briefly, all coding  
220 and splice-site bases of *RHOA* were systematically analyzed to count all sites with at least one read not  
221 matching the reference sequence, using a base-quality threshold of 30.

222  
223 **Ultra-deep sequencing of *RHOA*.** Coding exons of *RHOA* (reference accession NM\_001664.2) were amplified  
224 using custom intronic primers (**Supplementary Table 3**) and standard PCR with the PrimeSTAR GXL DNA  
225 Polymerase (Takara Bio). PCR products were purified and libraries were prepared using the transposase-based  
226 Nextera XT DNA Sample Preparation kit (Illumina). Libraries were sequenced on a MiSeq instrument using 300-

227 cycle reagent kits v2 (Illumina) and paired-end sequencing reactions of 150-bp reads. Ultra-deep sequencing  
228 was performed to achieve a sequencing depth of at least 1,000 reads for all targeted coding bases and splice  
229 junctions (**Supplementary Table 4**). As previously described<sup>23</sup>, we identified candidate single-nucleotide  
230 variants and small insertions/deletions by recording all sites of *RHOA* coding exons and splice junctions with at  
231 least four reads not matching the reference sequence, using a base quality threshold of 30 and a mapping  
232 quality threshold of 20, with a mutant allele fraction of at least 0.01. We annotated variants with SeattleSeq  
233 Annotation (see **URLs**), and focused on protein-altering and splice-site changes present at a frequency less than  
234 0.1% in ExAC (see **URLs**)<sup>16</sup>.

235

236 **In silico prediction.** Nucleotide-level conservation and impact of amino acid change of *RHOA* mutations were  
237 assessed using the Genomic Evolutionary Rate Profiling (GERP)<sup>24</sup> and Combined Annotation-Dependent  
238 Depletion (CADD) scores<sup>25</sup>, respectively (**Supplementary Table 6**).

239

240 **Cell culture and transfection.** NIH/3T3 cells were obtained from ATCC (CRL-1658TM) and maintained in  
241 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM [Life Technologies]) plus 10% calf serum. 60% confluent cultures  
242 were transfected using Xfect<sup>TM</sup> reagent (Clontech) as per manufacturer's protocol and cultured for 48 hours  
243 before lysis or fixation.

244

245 **DNA constructs and mutagenesis.** DNA constructs of myc-tagged wild-type, p.Gly14Val, and p.Thr19Asn  
246 *RHOA* for mammalian expression were obtained from Missouri S&T cDNA Resource Center (see **URLs**). The  
247 c.139G>A mutation (encoding p.Glu47Lys) was introduced in the wild-type *RHOA* sequence using the  
248 QuickChange site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies) as per manufacturer's protocol, and the  
249 following primers: TATGTGGCAGATATCAAGGTGGATGGAAAG and  
250 CTTTCCATCCACCTTGATATCTGCCACATA.

251

252 **Immunocytochemistry.** NIH/3T3 cells were fixed with 0.25% glutaraldehyde and permeabilized with 0.1%  
253 Triton x100 (Sigma). Mouse anti- $\alpha$ -tubulin primary (Sigma, 1:5,000) + goat anti-MYC (Bethyl Laboratories,  
254 1:500) antibodies were incubated overnight at 4°C. Appropriate secondary AlexaFluor-conjugated antibodies  
255 (Life Technologies, 1:1,000) along with AlexaFluor-conjugated phalloidin to visualize F-actin (Life Technologies,

256 1:100) were applied for 1 hour at room temperature. Cover glasses were mounted in ProLong anti-fade media  
257 (Life Technologies) and visualized with 100x oil objective on inverted microscope (Zeiss) fitted with spinning disc  
258 confocal scanner (Perkin-Elmer). Imaging analysis was performed using ImageJ software as follows: Confocal  
259 stacks were projected into a single plane (Z-project, Maximal Intensity), images were thresholded and  
260 fluorescence intensity measured as a mean gray value.

261  
262 **Western Blot.** NIH/3T3 cells were rinsed once with PBS and lysed in M-PER lysis buffer (Thermo Fisher)  
263 supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma). Protein concentration of the lysates  
264 cleared of insoluble cell debris were determined using 660 nm Protein Assay reagent (Thermo Fisher). A total of  
265 15 µg of proteins in LDS electrophoresis loading buffer (Life Technologies) was denatured for 10 min at 70°C  
266 and separated on 4-12% SDS-PAGE gel (Life Technologies). Proteins were transferred onto 0.2 µm  
267 nitrocellulose membrane (Pall) and processed for Western blotting. Primary antibodies were used at the  
268 following dilutions: goat anti-actin (Santa-Cruz Biotechnology, 1:4,000), mouse anti-MYPT1 (Becton-Dickinson,  
269 1:4,000), rabbit anti-MYPT1(pT696) (Millipore, 1:500), rabbit anti-RhoA (Cell Signaling, 1:4,000), rabbit anti-  
270 MLC2 (Cell Signaling, 1:4,000), mouse anti-MLC2(pT19) (Cell Signaling, 1:500). Appropriate secondary IRDye-  
271 conjugated antibodies (LI-COR) were used at 1:10,000. Proteins were detected using Odyssey imager (LI-COR).

272  
273 **Data availability.** The data that support the findings of this study are available from the corresponding authors  
274 upon reasonable request.

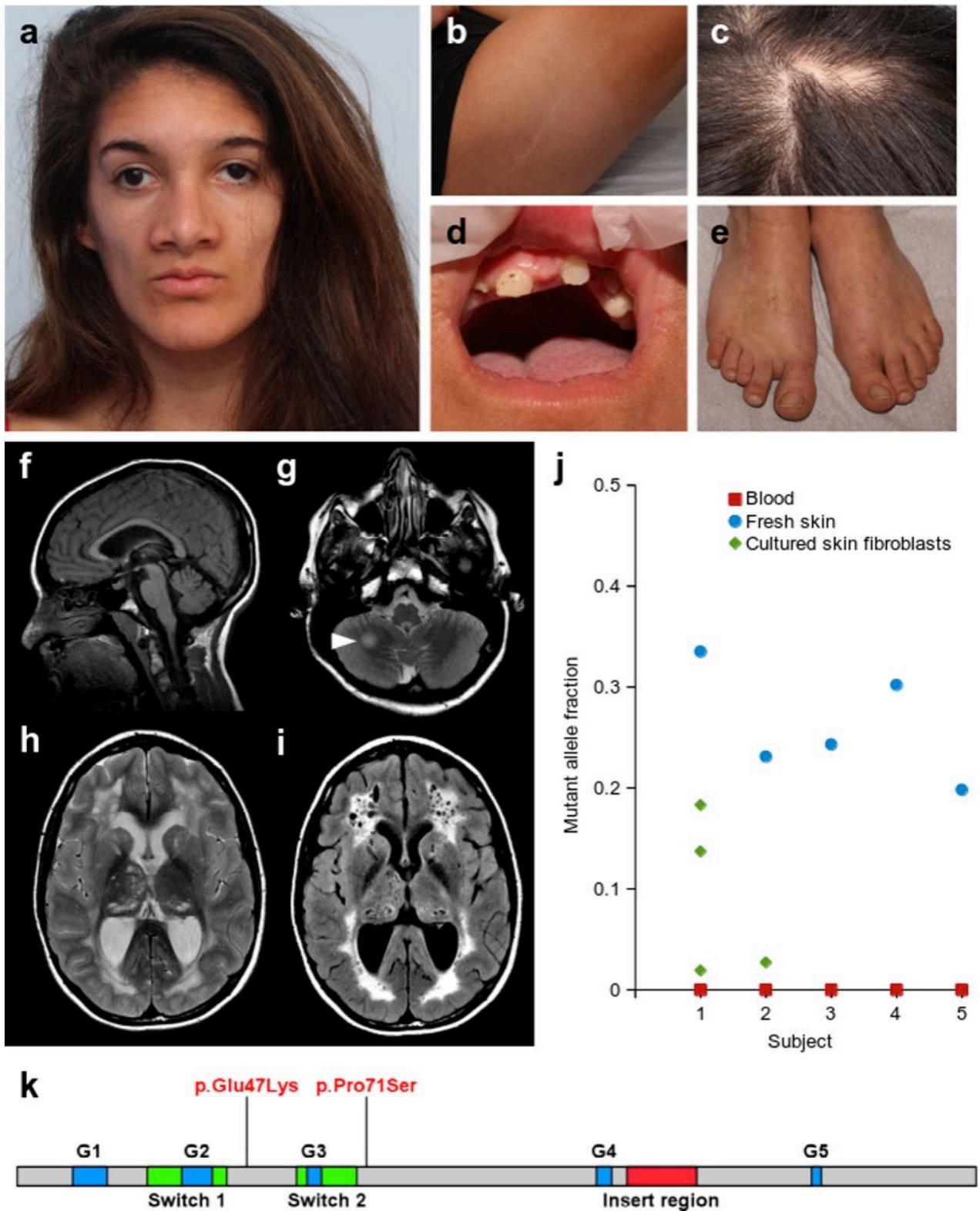
275

## 276 REFERENCES

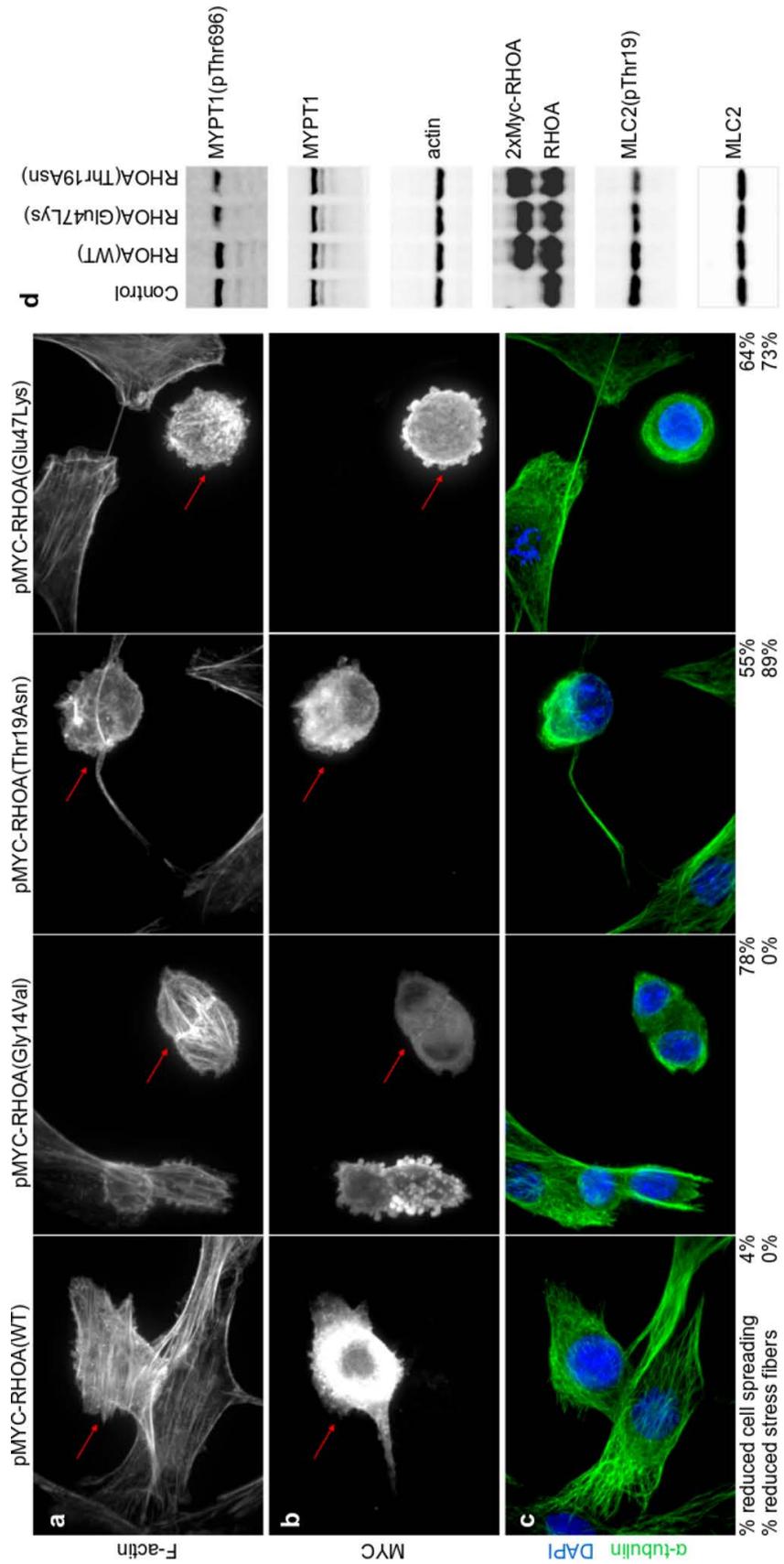
1. Sybert, V. P. *J. Invest. Dermatol.* **103**, 141S–143S (1994).
2. Ruggieri, M. & Pavone, L. *J. Child Neurol.* **15**, 635–644 (2000).
3. Pavone, P., Praticò, A. D., Ruggieri, M. & Falsaperla, R. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* **36**, 1173–1180 (2015).
4. Besenbacher, S. *et al. Nat. Commun.* **6**, 5969 (2015).
5. Canman, J. C. *et al. Science* **322**, 1543–1546 (2008).
6. Narumiya, S. *J. Biochem. (Tokyo)* **120**, 215–228 (1996).
7. Wu, K. Y. *et al. Nature* **436**, 1020–1024 (2005).

8. Hall, A. *Science* **279**, 509–514 (1998).
9. Vetter, I. R. & Wittinghofer, A. *Science* **294**, 1299–1304 (2001).
10. Pan, Z. K. *et al. J. Immunol. Baltim. Md 1950* **160**, 3038–3045 (1998).
11. Zhao, X. *et al. Cancer Res.* **69**, 483–491 (2009).
12. Maekawa, M. *et al. Science* **285**, 895–898 (1999).
13. Mirzaa, G. M. *et al. JAMA Neurol.* **73**, 836–845 (2016).
14. Lee, J. H. *et al. Nat. Genet.* **44**, 941–945 (2012).
15. Van Steensel, M. A. M. *J. Pediatr. Genet.* **4**, 144–153 (2015).
16. Lek, M. *et al. Nature* **536**, 285–291 (2016).
17. Blomen, V. A. *et al. Science* **350**, 1092–1096 (2015).
18. Wang, T. *et al. Science* **350**, 1096–1101 (2015).
19. Happle, R. *J. Am. Acad. Dermatol.* **16**, 899–906 (1987).
20. Fernández, L. C., Torres, M. & Real, F. X. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 43–55 (2016).
21. Happle, R. *Arch. Dermatol.* **129**, 1460–1470 (1993).
22. Thevenon, J. *et al. Am. J. Hum. Genet.* **95**, 113–120 (2014).
23. Rivière, J.-B. *et al. Nat. Genet.* **44**, 934–940 (2012).
24. Cooper, G. M. *et al. Nat. Methods* **7**, 250–251 (2010).
25. Kircher, M. *et al. Nat. Genet.* **46**, 310–315 (2014).

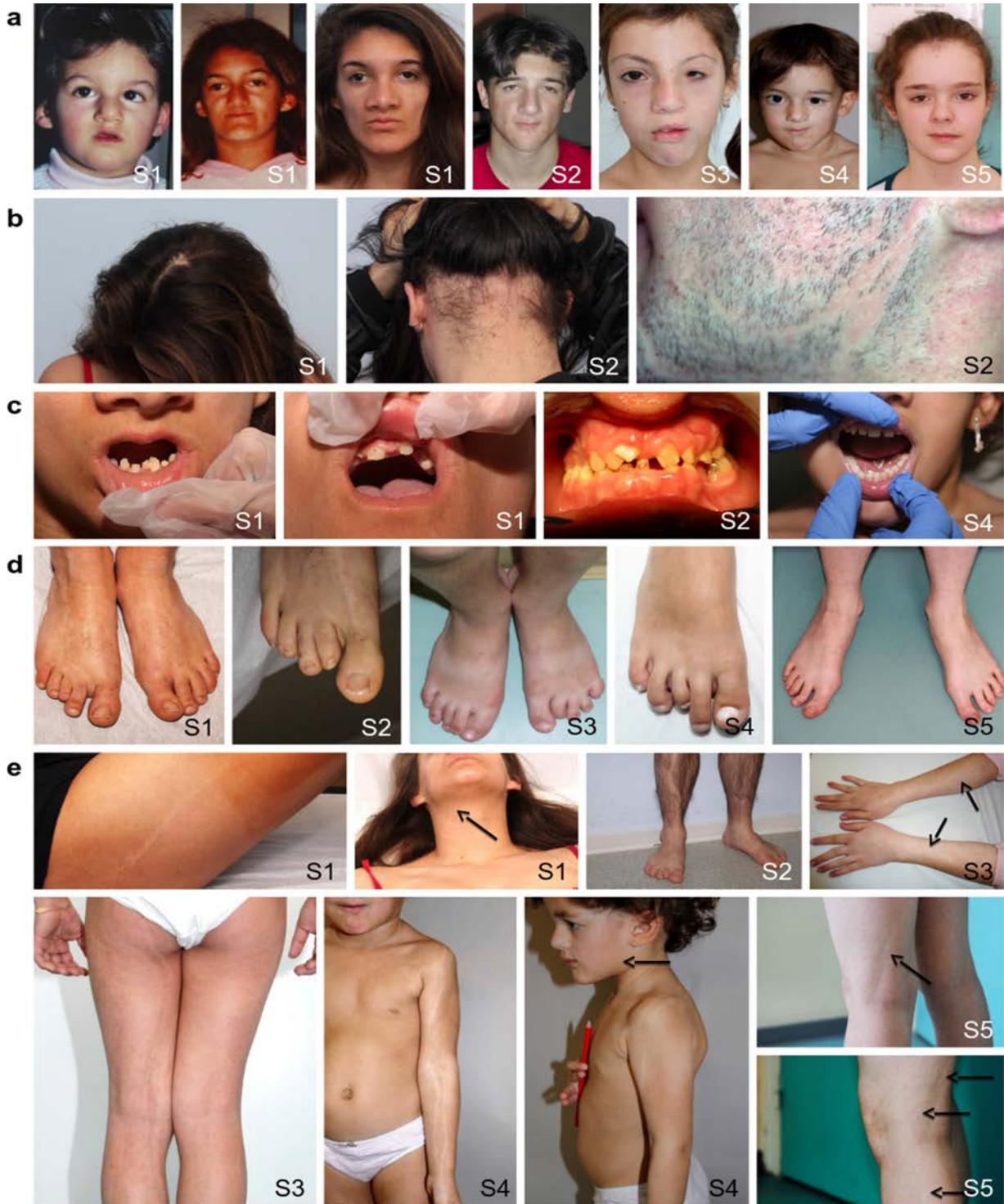
**Figure 1.** Main clinical features of *RHOA*-related mosaic ectodermal dysplasia and *RHOA* mutations.



**Figure 2.** Dominant-negative effect of the *RHOA* c.139G>A mutation encoding p.Glu47Lys.

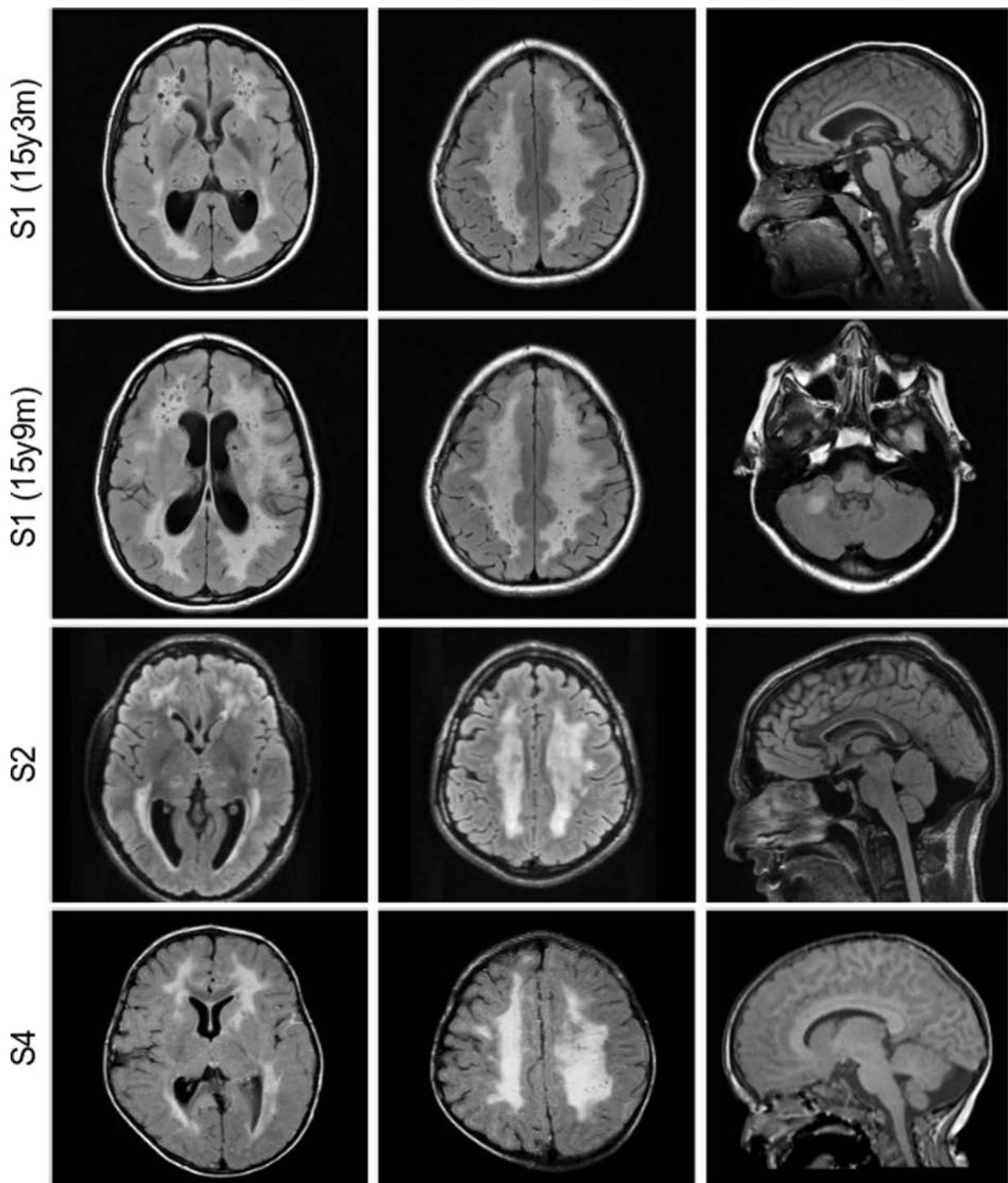


SUPPLEMENTARY FIGURES



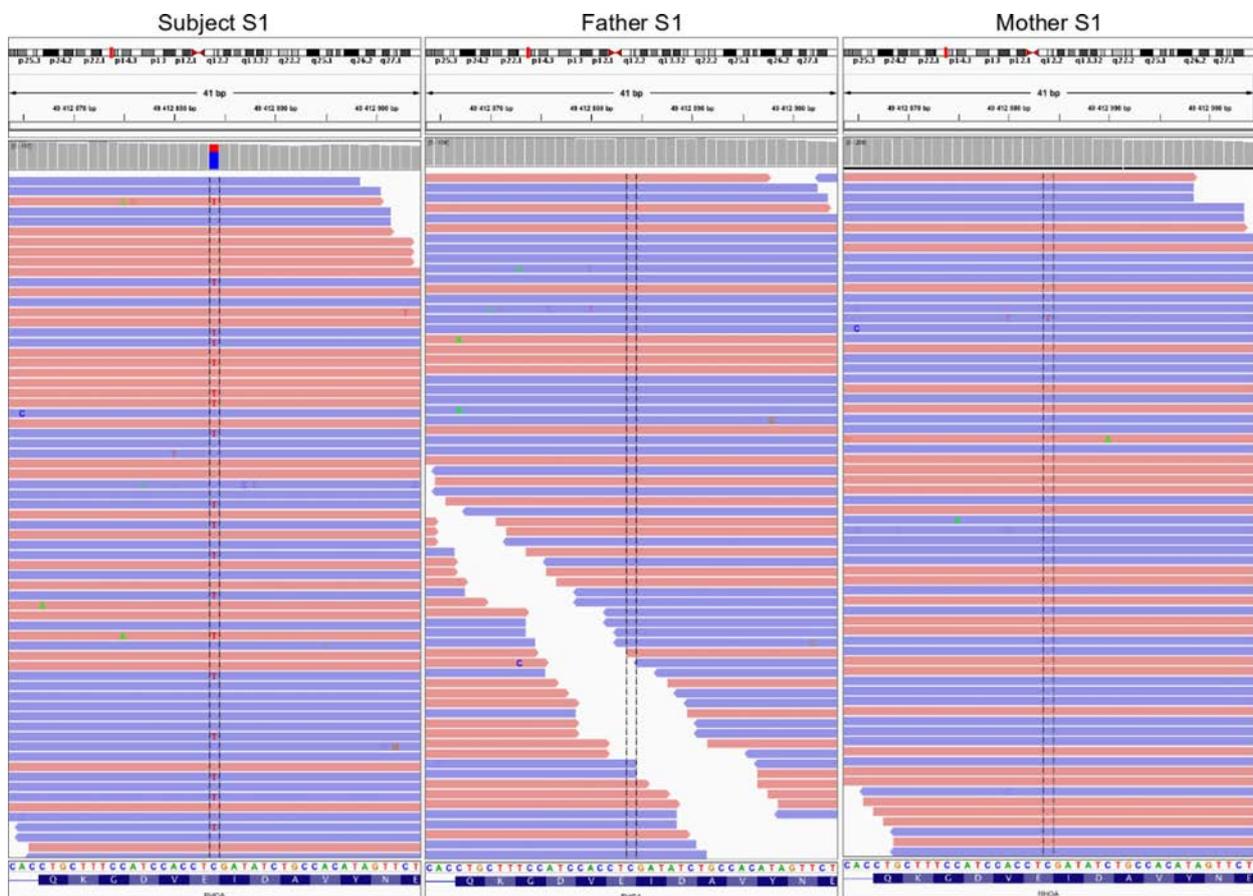
**Supplementary Figure 1.** Main clinical features of affected individuals. **(a)** Craniofacial appearance of affected individuals showing hemifacial microsomia in all subjects. **(b)** Patchy alopecia of hair and beard. **(c)** Teeth

anomalies consisting of oligodontia, microdontia, and conical teeth. **(d)** Variable degrees of acral anomalies including symmetric or asymmetric brachydactyly, syndactyly, and polydactyly. Photograph of subject S3 was taken after surgery. **(e)** Linear hypopigmentation following Blaschko's lines on trunk, limbs, and face. See **Supplementary Table 1** for additional details. We obtained written consent to publish photographs of these individuals.

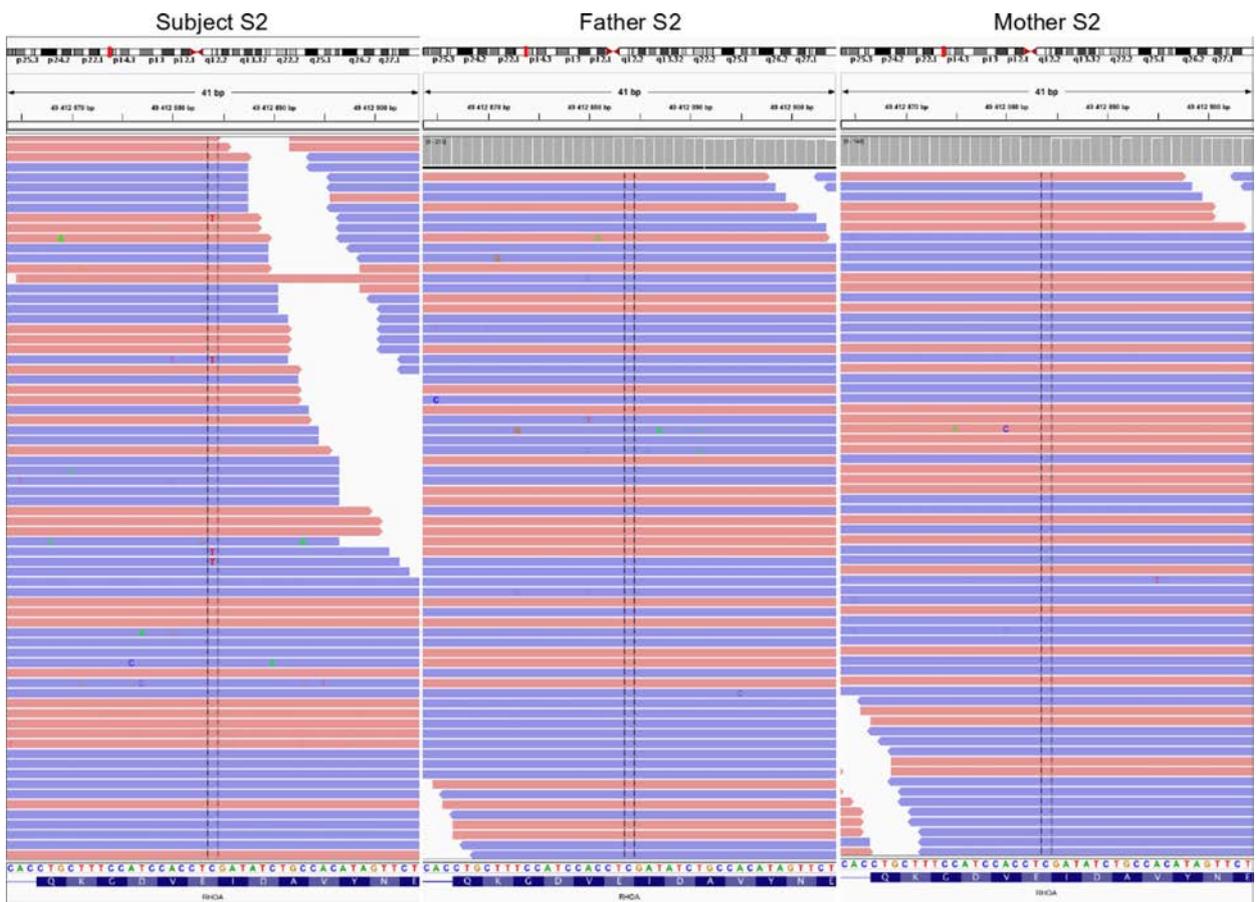


**Supplementary Figure 2.** Brain magnetic resonance imaging (MRI) for subjects S1 (at 15 years and 3 months [first row] and six months later [second row]), S2 (third row), and S4 (fourth row). MRI revealed bilateral and symmetrical marked and diffuse hyperintensities on FLAIR images, with sparing of the subcortical white matter/U-fibers. White matter signal abnormalities extend to the anterior limb of the internal capsule, with sparing

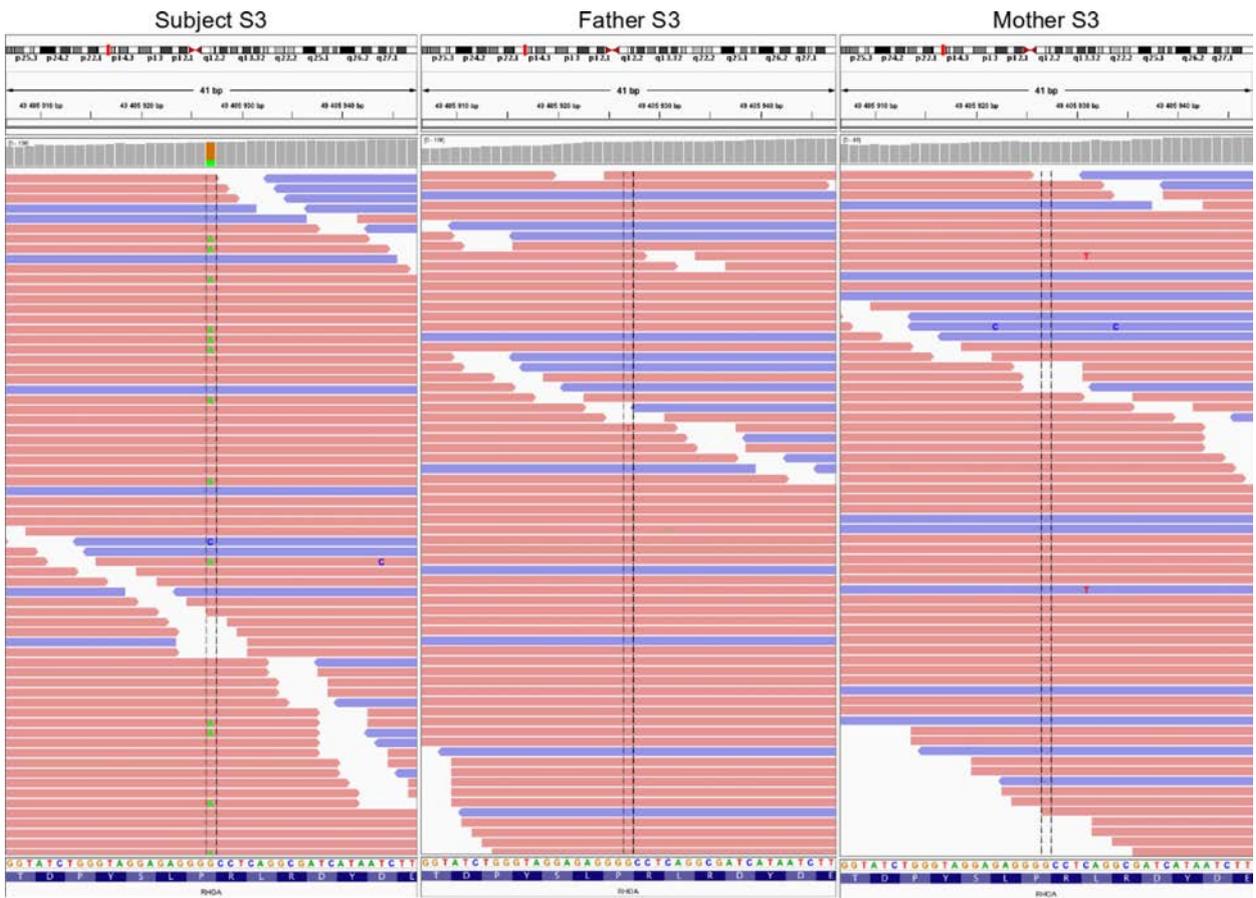
of the posterior limb of the capsule, associated with either cystic formation (S1) or relative dilatation of the Virchow-Robin spaces (S1, S2, and S4). One should note that the corpus callosum is spared. No significant anomalies of thalami and infratentorial cerebellar matter were noted in patients S2 and S4. A posterior fossa cyst is observed in 2 out of 3 patients (S2 and S4), with minimal mass effect on the cerebellum. One focal lesion of the cerebellar white matter was noticed in S1, with a hyperintensity on T2 weighted images. Lesions were stable on the 6-months follow-up MRI for subject S1. It is of interest to note that a leukoencephalopathy with enlarged Virchow-Robin spaces has been described in patients with mutations of *PTEN*<sup>1</sup>, a gene that encodes an inhibitor of the PI3K-AKT-mTOR signaling pathway and is known to be regulated by *RHOA*<sup>2</sup>.



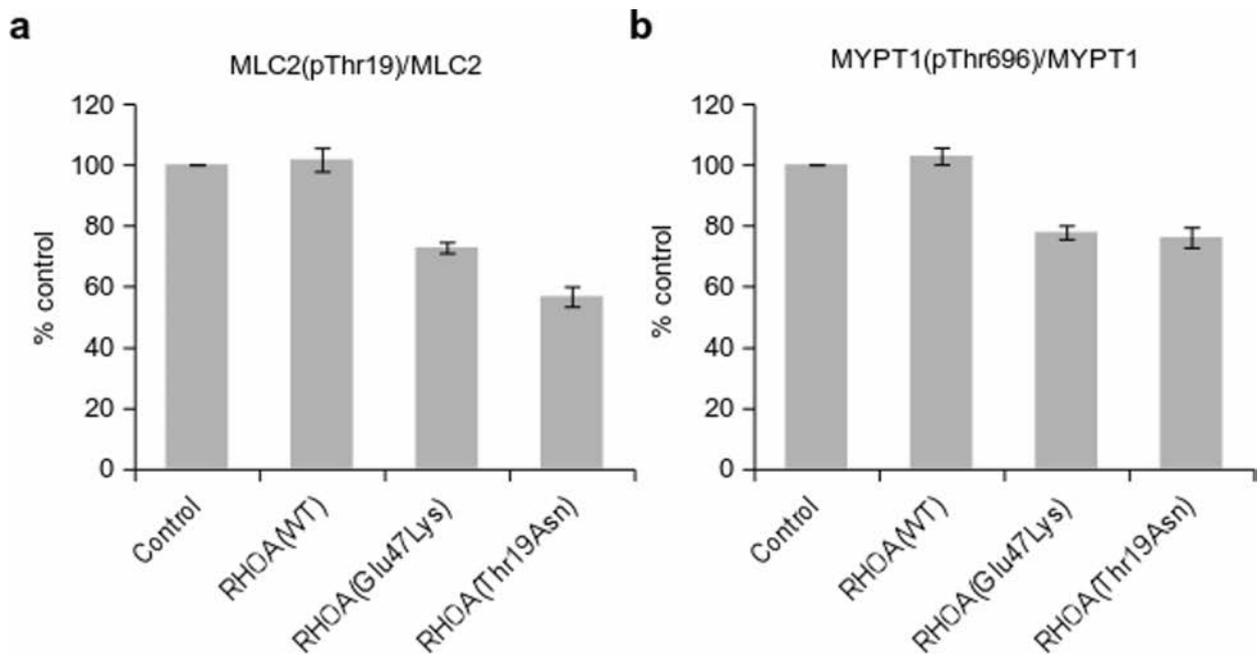
**Supplementary Figure 3.** Integrative Genomics Viewer (IGV)<sup>3</sup> screenshots of the *de novo* postzygotic *RHOA* c.139G>A substitution (encoding p.Glu47Lys) in subject S1 and her parents.



**Supplementary Figure 4.** IGV screenshots of the *de novo* postzygotic *RHOA* c.139G>A substitution (encoding p.Glu47Lys) in subject S2 and his parents.



**Supplementary Figure 5.** IGV screenshots of the *de novo* postzygotic *RHOA* c.211C>T substitution (encoding p.Pro71Ser) in subject S3 and her parents.



**Supplementary Figure 6.** Levels of phosphorylated MYPT1(pThr696) and MLC2(pThr19) in endogenous and transfected NIH/3T3 cells. Cumulative data of average density values ( $\pm$  s.d.) for phosphorylated **(a)** MYPT1(pThr696) and **(b)** MLC2(pThr19) normalized to total MYPT1 and MLC2 respectively indicate significant reduction ( $P < 0.05$ ) in MYPT1(pThr696) and MLC2(pThr19) upon RHOA(Thr19Asn) or RHOA(Glu47Lys) overexpression.

## SUPPLEMENTARY TABLES

**Supplementary Table 1.** Detailed clinical features of the six affected individuals

	Subject 1	Subject 2	Subject 3	Subject 4	Subject 5	Subject 6
<i>RHOA</i> change	c.139G>A	c.139G>A	c.211C>T	c.139G>A	c.139G>A	No mutation found
Sex	Female	Male	Female	Female	Female	Female
Age	18 years (15 years <sup>a</sup> )	28 years (25 years <sup>a</sup> )	14 years (10 years <sup>a</sup> )	6 years (3 years <sup>a</sup> )	16 years (15 years <sup>a</sup> )	9 years (10 years <sup>a</sup> )
Skin anomalies	Linear hypopigmentation and patchy scalp hair scarring alopecia.	Linear hypopigmentation on neck and upper and lower limbs with pilar dysplasia. Patchy scalp hair scarring alopecia.	Linear hypopigmentation on neck and upper and lower limbs with pilar dysplasia.	Linear hypopigmentation on upper and lower limbs.	Linear hypopigmentation on upper and lower limbs. Patchy scalp hair scarring alopecia (right occiput and left frontoparietal regions).	Linear hypopigmentation on limbs.
Craniofacial dysmorphism	Facial asymmetry. Marked malar hypoplasia with retrognathic maxilla and malocclusion. Broad nasal bridge with thick alae nasi.	Facial asymmetry with left malar hypoplasia. Broad nasal bridge with thick alae nasi. Short philtrum.	Facial asymmetry with malar hypoplasia, microtia, and narrower palpebral fissure on the left side. Thick alae nasi. Cleft lip.	Facial asymmetry with left microsomia, left deviation of the maxilla and the mandible, and soft tissue atrophy.	Right malar hypoplasia and moderate right hemifacial microsomia.	Left hemifacial microsomia.
Acral anomalies	Asymmetric III, IV, and V toes	Bilateral brachydactyly. Short II, III, IV, and V toes. Broad first toes.	Left foot postaxial polydactyly. Left III-IV syndactyly.	Brachydactyly of the right third toe.	Bilateral clinodactyly of second toes.	Bilateral brachydactyly of third toes.
Teeth anomalies	Conical teeth, oligodontia and microdontia of deciduous and permanent teeth. Persistent decidual dentition. Linear enamel dysplasia.	Conical teeth, oligodontia and microdontia of deciduous and permanent teeth.	Agensis of twelve tooth: two on the right, six on the left, and the four third molars.	Infraocclusion and conical teeth.	Multiple right dental agensis.	Multiple dental agensis and bilateral microdontia.
Ocular anomalies	Right peripapillary chorioretinal atrophy, high-degree myopia, and strabismus.	Bilateral congenital nystagmus, myopia, astigmatism, asymmetric posterior capsular cataract. Right eye visual acuity: 20/100; Left: hand motion. Normal cornea, corectopia, bilateral pale fundus with diffuse retinal atrophy, papillary dysversion.	Strabismus. No microphthalmia on CT-scan.	Left microphthalmia, atrophy of the left optical nerve (visual evoked potentials), and oculomotor dyssynergia.	Normal examination (visual acuity, visual evoked potentials, fundus ophthalmoscopy, and slit lamp examination).	Myopia. Normal ophthalmoscopy.

Brain anomalies	Non-progressive cystic leukoencephalopathy.	Leukoencephalopathy. Posterior fossa arachnoid cyst.	No brain MRI available. Enlarged lateral ventricle with no calcifications on CT-scan.	Leukoencephalopathy with enlarged perivascular spaces. Posterior fossa arachnoid cyst vs. mega cisterna magna. Small calcifications in the basal ganglia, especially putamen, on CT-scan.	No brain MRI available. No calcifications on CT-scan.	No brain MRI available.
Intelligence	Normal development and intellect.	Normal development and intellect.	Normal development and intellect.	Normal development and intellect.	Normal development and intellect.	Normal development and intellect.
Other features	-	Asymmetrical hearing loss (left: 70% loss; right: normal) due to abnormal cochlear development.	Scoliosis, lower limb length discrepancy, and bilateral vesicoureteral reflux.	-	Sigmoid and rectal atresia.	-

Abbreviations: CT-scan: Computerized tomography scan; MRI: Magnetic resonance imaging. <sup>a</sup>Age at last visit.

**Supplementary Table 2.** Metrics of trio-based whole-exome sequencing (WES) experiments

Subject	Tissue	Mapped sequences <sup>a</sup>	Mean sequencing depth <sup>b</sup>	Percent target $\geq 10x^b$	Percent target $\geq 100x^b$
S1	Fresh skin	5.5	160.3	94.6	68.1
Father S1	Blood	2.4	70.4	92.4	24.7
Mother S1	Blood	4.1	119.4	94.2	55.1
S2	Fibroblasts <sup>c</sup>	6.5	187.1	95.0	74.1
Father S2	Blood	4.5	130.4	94.4	59.2
Mother S2	Blood	3.9	113.3	94.0	52.4
S3	Fresh skin	5.8	169.3	95.8	71.9
Father S3	Blood	2.4	70.5	94.3	23.0
Mother S3	Blood	2.2	65.0	93.9	17.9

<sup>a</sup>In gigabases. <sup>b</sup>Based on RefSeq coding exons and splice junctions. Depth-of-coverage metrics were calculated with the Genome Analysis Toolkit (GATK)<sup>4</sup> DepthofCoverage tool using reads with mapping quality  $\geq 20$  and bases with base quality  $\geq 30$ . <sup>c</sup>Cultured skin fibroblasts.

**Supplementary Table 3.** Amplicons used for *RHOA* ultra-deep sequencing

Amplicon	Sequence	Chromosomal coordinates <sup>a</sup>	Amplicon size
Exon 2	Forward: GATTGCAGAATGTCTACCCAAAC Reverse: ATATGCTAAGGACACCATGTCAA	chr3:49412185-49414215	2,031 bp
Exon 3	Forward: GAGCTTGATGCTCATAAAAGTGA Reverse: CTACAATCCCAAACCTCCAGGAC	chr3:49405714-49406784	1,071 bp
Exons 4-5	Forward: TTGTGTTGTGGATCTTTTGCTC Reverse: GAGACAGGTTATGCCATCTTCC	chr3:49396766-49400342	3,577 bp

Abbreviations: bp: base pair. <sup>a</sup>Based on the human genome reference sequence GRCh37/hg19.

*RHOA* RefSeq accession number: NM\_001664.2.

**Supplementary Table 4.** Summary of *RHOA* ultra-deep sequencing

Individual	Tissue	Target	Mapped sequences <sup>c</sup>	Mean sequencing depth <sup>d</sup>	Percent target $\geq 1,000\times^d$
S1	Fresh skin	Exon 2	12.9	80,873	100
	Fibroblasts (A) <sup>a</sup>	Exon 2	9.1	56,693	100
	Fibroblasts (N) <sup>b</sup>	Exon 2	1.7	10,336	100
	Fibroblasts (N) <sup>b</sup>	Exon 2	9.3	58,156	100
	Blood	Exon 2	9.0	56,262	100
Father S1	Blood	Exon 2	9.0	55,972	100
Mother S1	Blood	Exon 2	7.5	46,805	100
S2	Fresh skin	Exon 2	4.7	29,565	100
	Fibroblasts (A) <sup>a</sup>	Exon 2	4.2	25,955	100
	Blood	Exon 2	8.2	51,100	100
Father S2	Blood	Exon 2	7.8	48,453	100
Mother S2	Blood	Exon 2	9.5	59,361	100
S3	Fresh skin	Exon 3	1.4	11,482	100
	Blood	Exon 3	1.2	9,292	100
Father S3	Blood	Exon 2	1.5	11,871	100
Mother S3	Blood	Exon 3	1.0	8,292	100
S4	Fresh skin	Exon 2	1.7	10,590	100
	Blood	Exon 2	1.4	8,506	100
S5	Fresh skin	Exon 2	2.4	14,739	100
	Blood	Exon 2	2.0	12,226	100
S6	Fresh skin	All coding exons	1.5	2,449	100

<sup>a</sup>Cultured skin fibroblasts derived from a biopsy of an affected (hypopigmented) skin lesion. <sup>b</sup>Cultured skin fibroblasts derived from a biopsy in normal skin. <sup>c</sup>In megabases. <sup>d</sup>Based on targeted coding bases and splice junctions. Depth-of-coverage metrics were calculated with the GATK DepthofCoverage tool using reads with mapping quality  $\geq 20$  and bases with base quality  $\geq 30$ . *RHOA* RefSeq accession number: NM\_001664.2.

**Supplementary Table 5.** Mutant allele fraction of the two *RHOA* mutations in all tested samples

Individual	Tissue	Sequencing method	Mutant reads count <sup>c</sup>	Total reads count <sup>c</sup>	Mutant allele fraction <sup>c</sup>
<i>chr3:g.49412884C&gt;T (c.139G&gt;A; p.Glu47Lys)</i>					
S1	Fresh skin	WES	44	144	30.6
		Targeted	30,761	91,492	33.5
	Fibroblasts (A) <sup>a</sup>	Targeted	11,534	63,041	18.3
	Fibroblasts (N) <sup>b</sup>	Targeted	1,632	11,924	13.7
	Fibroblasts (N) <sup>b</sup>	Targeted	1,186	63,208	1.9
	Blood	Targeted	56	58,126	0.1
Father S1	Blood	WES	0	89	0.0
		Targeted	44	60,811	0.1
Mother S1	Blood	WES	0	173	0.0
		Targeted	57	49,274	0.1
S2	Fibroblasts	WES	6	228	2.6
		Targeted	776	28,774	2.7
	Fresh skin	Targeted	7,729	33,501	23.1
	Blood	Targeted	115	56,144	0.2
Father S2	Blood	WES	0	170	0.0
		Targeted	31	51,869	0.1
Mother S2	Blood	WES	0	123	0.0
		Targeted	32	64,442	0.0
S4	Fresh skin	Targeted	2,939	9,733	30.2
	Blood	Targeted	4	7,674	0.1
S5	Fresh skin	Targeted	3,103	15,639	19.8
	Blood	Targeted	5	11,261	0.0
<i>chr3:g.49405927G&gt;A (c.211C&gt;T ; p.Pro71Ser)</i>					
S3	Fresh skin	WES	28	115	24.3
		Targeted	3,381	11,651	29.0
	Blood	Targeted	7	9,305	0.1

Father S3	Blood	WES	0	79	0.0
		Targeted	10	11,774	0.1
Mother S3	Blood	WES	0	60	0.0
		Targeted	1	8,353	0.0

Abbreviations: WES: whole-exome sequencing . Targeted: targeted ultra-deep sequencing of *RHOA*. <sup>a</sup>Cultured skin fibroblasts derived from a biopsy of an affected (hypopigmented) skin lesion. <sup>b</sup>Cultured skin fibroblasts derived from a biopsy in normal skin. <sup>c</sup>Only bases with base quality  $\geq 30$  were considered.

**Supplementary Table 6.** *RHOA* mutations, frequency in public variant databases, and *in silico* predictions

<i>RHOA</i> variant <sup>a</sup>	dbSNP (build 147)	COSMIC <sup>b</sup>	ExAC <sup>c</sup>	gnomAD <sup>c</sup>	GERP score	CADD score
chr3:g.49412884C>T c.139G>A p.Glu47Lys	Absent	Absent	None (~120,900 alleles sequenced)	None (~252,400 alleles sequenced)	5.9	35.0
chr3:g.49405927G>A c.211C>T p.Pro71Ser	Absent	Absent	None (~121,400 alleles sequenced)	None (~248,700 alleles sequenced)	5.8	33.0

Abbreviations: COSMIC: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer<sup>5</sup>; ExAC: Exome Aggregation Consortium<sup>6</sup>; gnomAD: Genome Aggregation Database; GERP: Genomic Evolutionary Rate Profiling<sup>7</sup>; CADD: Combined Annotation-Dependent Depletion<sup>8</sup>. <sup>a</sup>Coordinates of DNA changes are based on the human genome reference sequence GRCh37/hg19. The nomenclature of nucleotide and amino acid changes is based on *RHOA* RefSeq accession number NM\_001664.2. <sup>b</sup>Presence in COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk/>, accessed in November 2016). <sup>c</sup>Number of alleles found in ExAC (<http://exac.broadinstitute.org/>, accessed in November 2016) and gnomAD (<http://gnomad.broadinstitute.org/>, accessed in November 2016).

**Supplementary Table 7.** Summary of the most frequent somatic mutations of *RHOA* reported in cancer

Amino-acid change	Samples in COSMIC	Cancer type (sample count)	Functional impact
p.Gly17Val	152	Lymphoid neoplasm (151), ovarian carcinoma (1)	Dominant-negative <sup>9,10</sup>
p.Gly17Glu	35	Lymphoid neoplasm (27), stomach carcinoma (6), breast carcinoma (2)	Gain of function (growth-promoting effects) <sup>11</sup>
p.Tyr42Cys	21	Stomach carcinoma (19), breast carcinoma (1), Large intestine carcinoma (1),	Both gain <sup>11</sup> (growth-promoting effects) and loss of function <sup>12</sup> (defective signaling) reported
p.Cys16Arg	18	Lymphoid neoplasm (18)	Gain of function (increased RHOA activity, faster GTP/GDP exchange) <sup>9</sup>
p.Arg5Gln	13	Lymphoid neoplasm (9), large intestine carcinoma (2), stomach carcinoma (2)	Dominant-negative and reduced RhoA activity <sup>13</sup>
p.Arg5Trp	10	Stomach carcinoma (8), breast carcinoma (1), oesophagus carcinoma (1)	Gain of function (growth-promoting effects) <sup>11</sup>
p.Leu57Val	9	Stomach carcinoma (9)	Loss of function (defective signaling) <sup>12</sup>
p.Ala161Val	6	Lymphoid neoplasm (3), urinary tract carcinoma (2), pleural mesothelioma (1),	Gain of function (increased RHOA activity, faster GTP/GDP exchange) <sup>9</sup>
p.Tyr34Cys	5	Large intestine carcinoma (2), stomach carcinoma (2), oesophagus carcinoma (1)	No data available
p.Leu69Arg	5	Stomach carcinoma (3), lymphoid neoplasm (2)	Loss of function (predicted to diminish most RHOA-GEF interactions) <sup>14</sup>

Abbreviations: COSMIC: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer<sup>5</sup>. Only mutations reported at least five times in COSMIC are shown (accessed in November 2016). The nomenclature of amino acid changes is based on *RHOA* RefSeq accession number NM\_001664.2.

### SUPPLEMENTARY REFERENCES

1. Vanderver, A. *et al.* Characteristic brain magnetic resonance imaging pattern in patients with macrocephaly and PTEN mutations. *Am. J. Med. Genet. A.* **164A**, 627–633 (2014).
2. Li, Z. *et al.* Regulation of PTEN by Rho small GTPases. *Nat. Cell Biol.* **7**, 399–404 (2005).
3. Robinson, J. T. *et al.* Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* **29**, 24–26 (2011).

4. McKenna, A. *et al.* The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* **20**, 1297–1303 (2010).
5. Forbes, S. A. *et al.* COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res.* **43**, D805-811 (2015).
6. Lek, M. *et al.* Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* **536**, 285–291 (2016).
7. Cooper, G. M. *et al.* Single-nucleotide evolutionary constraint scores highlight disease-causing mutations. *Nat. Methods* **7**, 250–251 (2010).
8. Kircher, M. *et al.* A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat. Genet.* **46**, 310–315 (2014).
9. Nagata, Y. *et al.* Variegated RHOA mutations in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* **127**, 596–604 (2016).
10. Sakata-Yanagimoto, M. *et al.* Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat. Genet.* **46**, 171–175 (2014).
11. Kakiuchi, M. *et al.* Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma. *Nat. Genet.* **46**, 583–587 (2014).
12. Wang, K. *et al.* Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. *Nat. Genet.* **46**, 573–582 (2014).
13. O'Hayre, M. *et al.* Inactivating mutations in GNA13 and RHOA in Burkitt's lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma: a tumor suppressor function for the Gα13/RhoA axis in B cells. *Oncogene* **35**, 3771–3780 (2016).
14. Rohde, M. *et al.* Recurrent RHOA mutations in pediatric Burkitt lymphoma treated according to the NHL-BFM protocols. *Genes. Chromosomes Cancer* **53**, 911–916 (2014).

## **Partie III - Conclusion et perspectives**

## 1. Identification de variants post-zygotiques de *RHOA*

Le séquençage de l'exome complet en trio chez trois patients porteurs d'un syndrome neuroectodermique en mosaïque non décrit jusqu'à présent a permis l'identification de variants post-zygotiques dans un même gène, *RHOA* (c.139G>A; p.(Glu47Lys) chez les sujets S1 et S2, c.211C>T p.(Pro71Ser) chez le sujet 3). Ce gène, non rapporté en pathologie humaine constitutionnelle, a par la suite été étudié en séquençage ciblé en profondeur (*Targeted Ultra-Deep Sequencing*, TUDS) chez 3 patients supplémentaires, partageant une présentation clinique comparable, menant à l'identification du variant c.139G>A chez deux d'entre eux.

Aucun variant de *RHOA* n'a été détecté chez 24 autres patients porteurs d'hypomélanose linéaire (19 étudiés en exome et 5 en TUDS). Les deux variants étaient absents des bases de données publiques de variants en population normale ExAC et gnomAD, (Partie II - Supplementary Table 6 et Annexe 2), et prédits pathogènes par l'ensemble des scores de prédiction utilisés.

## 2. Phénotype associé aux variants post-zygotiques de *RHOA*

Les cinq patients porteurs de variants post-zygotiques de *RHOA* partagent un phénotype commun, non décrit à ce jour dans la littérature, qui pourrait être qualifié de « *RHOA-related mosaic ectodermal dysplasia* ».

L'ectoderme est un feuillet embryonnaire qui se sépare en deux tissus, l'épiderme et le neuroectoderme, qui quant à lui conduit à la formation de la crête neurale et du tube neural. Il est donc à l'origine tant de la peau (derme et épiderme) que du système nerveux, ce qui explique l'association fréquente entre les signes cutanés et signes neurologiques, par exemple dans la neurofibromatose ou la sclérose tubéreuse de Bourneville. L'HI est ainsi considéré comme une des affections neuroectodermiques les plus fréquentes, après les deux pathologies précédemment citées et un autre syndrome en mosaïque, le syndrome de Sturge-Weber. La fréquence élevée de l'HI, et son association à des signes extra-cutanés variables, ont entraîné une confusion dans la littérature. Il a ainsi été considéré que l'HI n'était pas une entité syndromique propre, mais une manifestation non spécifique d'un mosaïcisme, essentiellement chromosomique (53). Le présent travail montre qu'un phénotypage initial précis, tenant comptes des diverses atteintes extra-cutanées, est nécessaire pour la bonne définition des

syndromes comportant une HI, et permet l'identification de causes monogéniques jusqu'alors inconnues. Ce phénotypage basé sur l'analyse clinique est un préalable indispensable au séquençage d'*exome*, puisqu'il guide l'identification d'un gène candidat commun chez plusieurs patients cliniquement similaires. À l'inverse, l'identification de la même mutation chez des patients partageant la même atteinte cutanée, mais au phénotype moins similaire par ailleurs, a conduit à une réanalyse critique a posteriori du phénotype de ces patients à la lumière des données du génotype (*reverse phenotyping* (54)), et constitue une démarche complémentaire de la caractérisation clinique a priori (*phenotype first*).

Le phénotype associé aux variants post-zygotiques de *RHOA* est défini par l'association d'une hypomélanose d'Ito avec hypotrichose en bandes, d'une asymétrie faciale, d'anomalies des extrémités, d'anomalies dentaires et oculaires évolutives et d'une atteinte de la substance blanche cérébrale apparemment non progressive, chez des patients sans atteinte intellectuelle (Tableau 1). Ce syndrome polymalformatif, même en l'absence de signe pathognomonique le caractérisant, est cliniquement reconnaissable. Sa définition devrait aider au diagnostic d'autres patients.

**Tableau 1 : Dysplasie ectodermique en mosaïque associée à *RHOA***

<b>Anomalies cutanées</b>	Hypopigmentation suivant les lignes de Blaschko, avec juxtaposition d'une alopecie
<b>Dysmorphie faciale</b>	Asymétrie hémifaciale : hypoplasie malaire avec obliquité des fentes palpébrales, rétrognathie, microtie, micro-orbitie
<b>Anomalies dentaires</b>	Oligodontie, microdontie, dents coniques. Concerne la dentition lactéale et définitive. Dysplasie linéaire de l'émail
<b>Anomalies oculaires</b>	Nystagmus, strabisme, myopie, cataracte congénitale
<b>Anomalies des extrémités</b>	Brachydactylies, syndactylies, prédominant aux pieds, rarement polydactylie
<b>Anomalies cérébrales</b>	Leucoencéphalopathie non progressive, dilatation des espaces de Virchow-Robin, dilatation ventriculaire, kyste arachnoïde de la fosse postérieure, calcifications
<b>Développement intellectuel</b>	Normal
<b>Signes mineurs</b>	Scoliose, perte d'audition

### 3. Suivi des patients actuels et inclusion de nouveaux patients

La détermination de modalités évolutives du phénotype et du pronostic associés aux mutations post-zygotiques de *RHOA* nécessitera la constitution d'une cohorte prospective de patients d'âges différents, permettant le suivi des patients durant plusieurs années. Plusieurs questions sont aujourd'hui sans réponse, en particulier celle du pronostic neurologique, devant les anomalies à l'imagerie cérébrale aujourd'hui asymptomatiques, la possibilité d'un recours à la chirurgie reconstructive, et, du fait des voies de signalisation cellulaire impliquées, la susceptibilité aux cancers<sup>2</sup>.

Étant donnée la diversité des tableaux cliniques associés à une HI, et la difficulté à documenter finement une atteinte multi-organique, une revue de la littérature pour rechercher des patients comparables aux patients rapportés dans cette étude a apporté peu de résultats pertinents, à l'exception peut-être de deux descriptions isolées (55,56) compatibles avec le diagnostic. Les équipes en charge de ces patients ont été contactées, sans réponse actuellement ; une étude de *RHOA* pourra éventuellement leur être proposée.

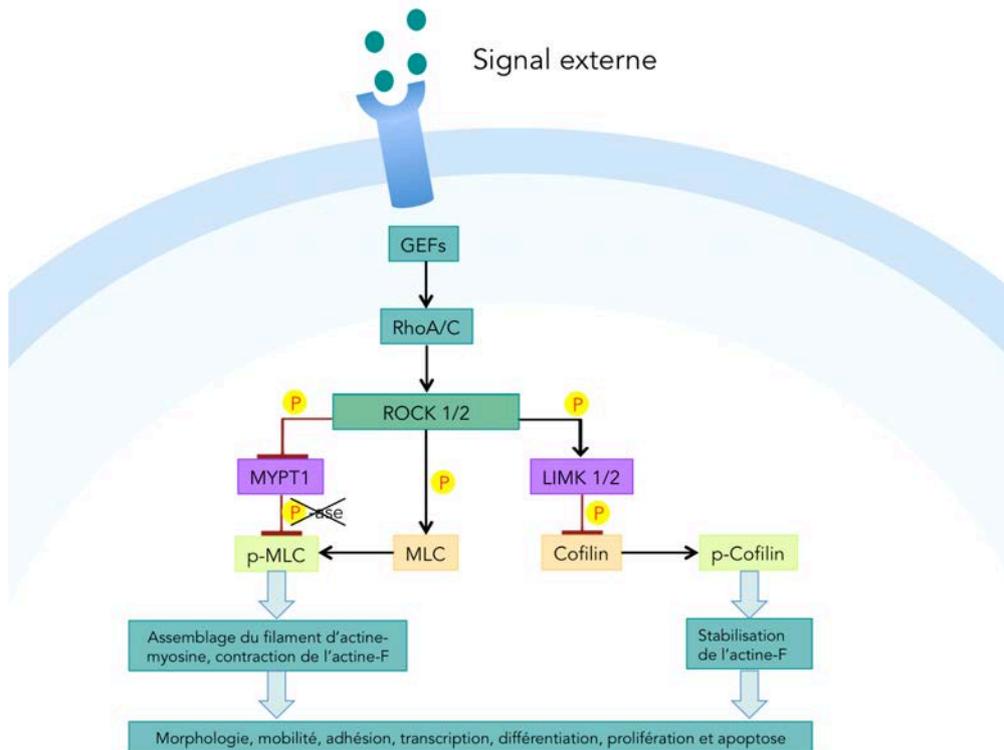
### 4. Évaluation des conséquences fonctionnelles des variants

*RHOA* code la protéine RhoA (Ras homologous gene family, member A), une petite GTPase de la superfamille Ras dont le rôle a été particulièrement étudié en pathologie cancéreuse (57). Elle intervient notamment dans la polarité cellulaire, la migration et l'adhésion, à travers la dynamique du cytosquelette d'actine, la régulation de la formation des fibres de stress et des adhésions focales (58,59). L'action de RhoA passe par la kinase ROCK (Rho-associated protein kinase), qui contrôle l'équilibre d'activité entre MLC2 et Cofilin, dont dépendent ces fonctions. ROCK phosphoryle MLC2 (*Myosin light chain 2*), tout en prévenant la déphosphorylation de MLC2 en phosphorylant MYPT1 (*Myosin phosphatase target subunit 1*), ce qui conduit à son inactivation (Figure 5).

---

<sup>2</sup> Si le risque de tumeur dans les syndromes en mosaïque n'est pas connu, la présence de mutations somatiques des voies de signalisations PIK3CA-AKT-mTOR et RAS-MAPK ne permet pas d'exclure un surrisque de cancer dans les anomalies du développement en mosaïques. Cette question constitue, en particulier pour les syndromes avec hypertrophie, une thématique de recherche active.

**Figure 5 : Rôle de la protéine RhoA**



MLC2 est normalement activée par ROCK à la fois de manière directe, mais également indirectement par la phosphorylation de MYPT1, une phosphatase de MLC2. Cofilin, qui a une action antagoniste de MLC2 (déstabilisation des filaments d'actine), est inhibé par la kinase LIMK1.

Pour évaluer les conséquences fonctionnelles des variants de *RHOA* identifiés, nous avons comparé l'impact de la substitution c.139G>A p.(Glu47Lys), présent chez 4 patients, avec ceux de mutations connues : p.Gly14Val, entraînant une hyper-activation de RhoA, et p.Thr19Asn, avec un effet dominant négatif (60,61). L'étude des conséquences fonctionnelles du second variant c.211C>T p.(Pro71Ser) est en cours.

En immunocytochimie comme en Western Blot, nous constatons un effet du variant Glu47Lys similaire à celui du variant dominant négatif p.Thr19Asn. Il s'agit donc de l'illustration d'un nouveau mécanisme de pathogénicité parmi les mutations post-zygotiques impliquées dans les anomalies du développement en mosaïque : elles ont jusqu'à présent toujours été décrites comme activatrices, responsables d'une dérégulation de la cascade de signalisation concernée (activation constitutive), qui expliquerait l'hypertrophie présente dans plusieurs de ces syndromes. Nous pouvons formuler l'hypothèse qu'une altération des fonctions de RhoA dans

la morphogénèse, le chimiotactisme, la guidance axonale ou encore le cycle cellulaire, est susceptible d'entraîner les différentes atteintes tissulaires observées dans ce tableau de dysplasie neuroectodermique.

## 5. Un gène nécessaire au développement – la survie par le mosaïcisme

La plupart des mutations des gènes impliqués dans les anomalies du développement en mosaïque, en particulier dans les syndromes hypertrophiques, sont des mutations activatrices, ayant pour conséquence une hyperactivation d'une voie de signalisation. Le mosaïcisme permet donc l'expression d'une mutation dont la présence à l'état constitutionnel serait létale. Il s'agit de la validation récente d'une hypothèse sur la physiopathologie des anomalies en mosaïque, formulée par Happle en 1986 (31). Il est probable qu'une mutation perte de fonction à l'état constitutionnel de *RHOA* soit également létale chez l'humain, et que la poursuite du développement ne soit permise que par la présence de ces mutations de manière non homogène dans les cellules de l'organisme. Plusieurs arguments indirects peuvent être avancés :

*Absence de variants de RhoA dans les bases de données en population dite « normale »* – Dans la base de données ExAC, le nombre de mutations faux-sens observées est significativement inférieur au nombre attendu (5/66,9, z-score à 3,70) et aucune mutation tronquante n'est rapportée (contre 5,1 attendues, non significatif). Un total de 3230 gènes sont ainsi exempts de variant tronquant, en majeure partie inconnus en pathologie humaine (47). Des données plus complètes sont attendues avec la base gnomAD, mais ne sont pas encore disponibles. Une première approximation en est fournie par le score RVIS (*Residual Variation Intolerance Score*) (62). En tenant compte de la dernière version des données de gnomAD, ce score situe *RHOA* parmi les 38 % des gènes les plus intolérants aux variants – résultat également non significatif (classé « Edge case – Y »), en raison du trop faible nombre globale de variations pour ce gène.

*Présence de RHOA dans les listes des gènes indispensables au développement* – *RHOA* fait partie des gènes nécessaires à la survie cellulaire, parmi 1333 gènes mis en évidence à la fois par deux techniques d'identification par mutagénèse à grande échelle, induisant des pertes de fonction : une technique *gene-trap* ayant identifié 1734 gènes dits du *core essentialome* (63), et une technique CRISPR-Cas9 ayant identifié 1878 gènes (64). Dans ces deux études, et partiellement dans une troisième (65) (dans 2 lignées sur 5), il a été montré qu'un *knock-out* de *RHOA* est donc incompatible avec le développement.

*Biais de culture* – La forte pression de sélection attendue sur ce gène est illustrée par le faible taux de mutations détectées en séquençage à forte profondeur sur l'ADN issu de culture de fibroblastes. En effet, alors qu'un taux allélique de 23,1 % est constaté dans les cellules d'une biopsie de peau lésionnelle fraîche pour le Sujet 2, la mise en culture de ces mêmes cellules a entraîné une diminution relative de cette population cellulaire, avec un taux allélique constatée de seulement 2,1 %. Ces variants de *RHOA* ont donc un impact sélectif négatif fort sur les cellules. Ce résultat confirme par ailleurs l'importance du choix du tissu prélevé pour la recherche d'une mutation causale dans le cadre des anomalies du développement en mosaïque. L'absence des mutations dans le sang de l'ensemble des 5 sujets étudiés peut ainsi être expliquée soit par l'origine mésodermique des leucocytes, dans l'hypothèse d'une mutation post-zygotique confinée à l'ectoderme, soit par une sélection négative des cellules sanguines mutantes (66).

## 6. Conseil génétique

L'identification d'une nouvelle affection et de sa cause génétique a mis fin chez ces patients à l'inévitable incertitude diagnostique, et a permis de proposer à leur famille un conseil génétique. Dans le cas d'une mutation post-zygotique, le risque de récurrence dans la fratrie peut être considéré comme nul. À la différence des mutations constitutionnelles *de novo*, le risque de mosaïque germinale parentale (67), qui donnerait lieu à une atteinte homogène chez un autre enfant de la fratrie, n'existe pas. Pour la descendance du patient lui-même, dans la mesure où *RHOA* est un gène nécessaire au développement dont les mutations sont létales en période embryonnaire, le risque est virtuellement nul. Il existe cependant un risque théorique de fausse couche précoce plus élevé, si la mosaïque comporte également une atteinte de la lignée germinale. Il n'a toutefois pas été rapporté de cas de transmission à la descendance de mutation post-zygotique d'un parent, ni d'hypofertilité en lien avec des fausses couches. Cette absence de donnée peut s'expliquer par le fait que l'identification des bases moléculaires des affections en mosaïque est récente, et que le recrutement des patients est principalement pédiatrique. Un suivi prospectif de la cohorte pourrait permettre de répondre à ces interrogations.

## 7. Une nouvelle voie de signalisation impliquée dans les syndromes en mosaïque ?

L'identification d'un nouveau gène responsable d'anomalies du développement en mosaïque ouvre de nouvelles perspectives dans ce domaine.

Elle permet de formuler l'hypothèse du rôle encore non décrit d'une nouvelle voie de signalisation liée à *RHOA*, distincte des voies RAS-MAPK et PIK3CA-AKT-mTOR qui comportent la majorité des gènes identifiés dans ces pathologies. Par ailleurs, la pathogénicité des mutations post-zygotiques de cette voie pourrait passer par un nouveau mécanisme, différent de l'activation constitutive de la voie résultant d'une mutation gain de fonction.

Nous pouvons donc supposer qu'il reste encore d'autres gènes à identifier dans les anomalies du développement en mosaïque, en particulier dans les phénotypes pigmentaires.

Dans notre étude, l'absence de mutation de *RHOA* chez le Sujet 6, qui présente des manifestations cliniques très évocatrices, pourrait indiquer le rôle d'un gène à la fonction proche de *RHOA* ou de l'un de ses effecteurs. Chez cette patiente un séquençage de l'exome, actuellement en cours, ou du génome en cas de négativité, pourrait être informatif.

Il serait également intéressant de poursuivre ce travail chez un plus grand nombre de patients porteurs d'une HI. Ainsi, au sein du même groupe de patients, d'autres gènes sont actuellement considérés comme candidats par l'analyse génomique, et font l'objet d'explorations fonctionnelles. Pour le diagnostic moléculaire, *RHOA* et d'autres gènes candidats pourront être étudiés au sein d'un panel rassemblant les gènes impliqués dans les mosaïques, actuellement en cours de mise au point, qui pourra être utilisé pour l'ensemble de la cohorte.

## 8. Perspectives thérapeutiques

L'identification des bases moléculaires d'une pathologie est un pas important vers l'élaboration de pistes thérapeutiques. Pour certaines pathologies en mosaïque, le double rôle du gène impliqué, causant à la fois des anomalies du développement en mosaïque et des pathologies cancéreuses, a permis d'envisager le recours à certains agents déjà employés en cancérologie, tels que des inhibiteurs de la voie PI3K-AKT-mTOR. Cependant, si *RHOA* est effectivement impliqué dans de nombreux cancers (Partie II, Supplementary Table 7), le fait

que les mutations post-zygotiques de *RHOA* entraînent une dysplasie non évolutive et non une hypertrophie évolutive, rend difficile la transposition de cette approche au cas présent. En l'état actuel, la prise en charge des patients reste donc essentiellement symptomatique, avec en particulier une prise en compte de l'atteinte fonctionnelle oculaire et dentaire, et du préjudice esthétique de l'atteinte faciale.

## 9. Limites de la stratégie d'analyse actuelle

La stratégie employée pour l'étude des bases moléculaires des anomalies de la pigmentation cutanée en mosaïque, en deux temps (une analyse d'exome en trio, sur prélèvement de tissu atteint, en cas d'absence d'orientation diagnostique, ou une analyse ciblée d'un ou plusieurs gènes en cas de présentation clinique évocatrice d'un syndrome identifié), a montré une relative efficacité. Chez cinq patients avec un phénotype commun, elle a permis l'identification d'un nouveau gène, et au sein de la cohorte deux autres gènes candidats sont en cours d'étude. Cependant, l'approche actuelle comporte plusieurs limites, pour lesquelles des améliorations pourront être envisagées :

*Absence de détection des CNV* – Le protocole actuel de WES permet la détection de SNP mais est inefficace pour la détection de CNV. Il existe plusieurs méthodes pour la détection de CNV sur données d'exome, reposant sur l'analyse de la variation de profondeur de séquençage, mais aucune n'a été validée pour l'étude des CNV en mosaïque. Plusieurs outils exploitent cette méthode, dont le logiciel XHMM (68), qui est actuellement évalué. Dans le cas des anomalies de la pigmentation en mosaïque, cette approche pourrait être d'un grand intérêt.

*Absence de détection des remaniements structuraux* – Les variants structuraux équilibrés (translocations intra- ou inter-chromosomiques, inversions), à l'exception des rares cas où un point de cassure surviendrait dans la cible de l'exome (un exon ou une jonction intron-exon), ne peuvent pas être détectés par la technique de WES.

*Problème de la détection des mosaïques à faible taux* – Les variants présents à des taux inférieurs à 10 % dans au moins une lecture, ne sont pas détectés par l'outil de *variant calling*, intégré au protocole actuel (GATK). Ils doivent donc être recherchés manuellement, par la revue sur IGV des gènes candidats. Cette approche est donc inadaptée à la découverte de nouveau gène

d'intérêt. Pour autant il a été démontré qu'en séquençage d'exome sur technologie Illumina, la significativité peut être atteinte à partir de 3 lectures portant la variation (5). D'autres outils de *variant calling* doivent donc être envisagés.

*Mosaïcisme physiologique* – Une autre limite de l'approche en trio est l'accumulation de mosaïcisme inter- et intra-organe qui survient avec l'âge, et qui peut être une source de confusion. Ainsi, le sang (des parents, ou du cas index) n'est pas nécessairement un bon « génome de référence » pour la détection de mosaïque, dans la mesure où il peut lui-même comporter de nombreuses variations acquises – jusqu'à 551 SNV et 28 indels chez une patiente centenaire (69). De telles variations constitueraient donc des faux-positifs. Les données dans la littérature à ce sujet sont encore trop rares pour identifier des points-chauds de « mutations somatiques physiologiques » qu'il conviendrait d'exclure de l'analyse.

*Nature du prélèvement* – Comme évoqué plus haut, le choix du tissu à étudier (tissu atteint chez le cas index, tissu sain de référence) est un élément capital pour le succès de l'analyse. Il s'agit cependant de matériel parfois plus difficile d'accès que la peau, qui peut être prélevée de façon peu invasive par biopsie cutanée. Il peut aussi être difficile d'identifier et délimiter avec certitude la zone atteinte. Dans le cadre d'un projet national ou international, impliquant des patients dispersés sur le territoire, les conditions de conservation du prélèvement doivent également être prises en considération. À ce jour, la technique d'extraction employée nécessite un tissu non fixé, non cultivé, et fraîchement prélevé, dont le transport requiert parfois une logistique lourde. Le développement de séquençage d'ADN extrait de pièces opératoires fixées et incluses (*FFPE*, *Formalin-fixed, paraffin-embedded*), ou le recours à la microdissection, constitue une piste d'amélioration.

*Quantité minimale d'ADN* – Le WES en profondeur nécessite actuellement un minimum de 3µg d'ADN, qui ne sont pas toujours disponibles compte tenu de la petite taille de la plupart des prélèvements. Si l'amélioration des techniques de séquençage autorisera peut être à l'avenir de travailler à partir de volumes plus faibles, il est aujourd'hui nécessaire de développer des techniques complémentaires, moins consommatrices d'ADN. Dans ce contexte, un panel permettant l'étude d'une sélection de gènes, nécessitant environ 10 fois moins d'ADN, est en développement. À l'inverse, il peut être envisagé de diminuer le nombre de techniques nécessaires, pour éviter la multiplicité des examens : par exemple permettre la détection des CNV sur les données d'exome, pour éviter le recours à une *CGH-array* en complément de la

recherche de SNP par NGS. Le développement d'une approche globale par WES semble donc un objectif souhaitable.

*Pertinence des bases de données de variants* – Lors de l'interprétation des données issues de WES, il est utile d'interroger des bases de données permettant de classer un variant selon ses conséquences fonctionnelles connues – bénin, pathogène, indéterminé, non répertorié. Deux bases de données majeures peuvent être citées : ClinVar (70), répertoriant l'ensemble des variants, et COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer) (71) dédiée aux variants somatiques présents dans des prélèvements tumoraux. Aucune de ces deux bases n'est donc réellement adaptée aux mutations post-zygotiques : elles ne peuvent pas être enregistrées dans COSMIC, et leur nature particulière n'est pas identifiable dans ClinVar, où il n'existe pas de catégorie « *post-zygotic* ». En l'absence d'évolution de ClinVar pour permettre l'intégration des variations post-zygotiques, une base de données spécialisée reste donc à créer.

## Conclusion générale

La technique de séquençage d'exome à forte profondeur nous a permis de mettre en évidence un gène responsable d'un tableau de dysplasie ectodermique en mosaïque. Ces données nouvelles concernant l'étiologie moléculaire des anomalies de la pigmentation cutanée en mosaïque sont originales à plusieurs titres. D'une part, le gène identifié, *RHOA*, était jusqu'alors inconnu en pathologie humaine constitutionnelle, et contribue à une voie de signalisation différente de celles habituellement impliquées dans les pathologies en mosaïque. D'autre part, les manifestations cliniques liées aux mutations post-zygotiques de *RHOA* constituent une nouvelle entité syndromique récurrente, associant une hypomélanose d'Ito, une asymétrie faciale, des anomalies des extrémités, des anomalies dentaires, oculaires, et cérébrales. De nombreuses questions restent à élucider quant au devenir des patients et à leur prise en charge, nécessitant la poursuite des investigations cliniques. Enfin, le mécanisme de pathogénicité des mutations, qui présentent un effet dominant-négatif, est atypique dans le contexte des anomalies en mosaïques, ces dernières étant jusqu'à présent constamment causées par des mutations gain de fonction.

Il s'agit de la première identification d'un gène responsable d'un tableau comportant de manière constante parmi les patients étudiés une hypopigmentation cutanée le long des lignes de Blaschko, ou hypomélanose d'Ito. Ce cadre nosologique est emblématique des anomalies du développement en mosaïque, car à l'origine des premières définitions cliniques de la notion de mosaïque, et très tôt relié à de nombreuses anomalies chromosomiques en mosaïque. La mise en évidence des bases moléculaires d'un tableau clinique particulier d'HI constitue un premier pas vers une meilleure compréhension des anomalies de la pigmentation en mosaïque. Elle permettra d'améliorer les capacités de diagnostic, d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, et de faire progresser la prise en charge des patients. Les anomalies du développement avec atteinte cutanée en mosaïque, même peu fréquentes, constituent un modèle pour l'étude de la survenue des mutations, de leurs conséquences cliniques et de leurs techniques de détection, qui permet d'améliorer notre compréhension de l'ensemble des maladies génétiques.

## Bibliographie

1. Lynch M. Rate, molecular spectrum, and consequences of human mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 19 janv 2010;107(3):961-8.
2. Youssoufian H, Pyeritz RE. Mechanisms and consequences of somatic mosaicism in humans. *Nat Rev Genet*. oct 2002;3(10):748-58.
3. Happle R. Mosaicism in human skin. Understanding the patterns and mechanisms. *Arch Dermatol*. nov 1993;129(11):1460-70.
4. Lindhurst MJ, Sapp JC, Teer JK, Johnston JJ, Finn EM, Peters K, et al. A Mosaic Activating Mutation in AKT1 Associated with the Proteus Syndrome. *N Engl J Med*. août 2011;365(7):611-9.
5. Rivière J-B, Mirzaa GM, O'Roak BJ, Beddaoui M, Alcantara D, Conway RL, et al. De novo germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. *Nat Genet*. août 2012;44(8):934-40.
6. Kurek KC, Luks VL, Ayturk UM, Alomari AI, Fishman SJ, Spencer SA, et al. Somatic Mosaic Activating Mutations in PIK3CA Cause CLOVES Syndrome. *Am J Hum Genet*. juin 2012;90(6):1108-15.
7. Groesser L, Herschberger E, Ruetten A, Ruivenkamp C, Lopriore E, Zutt M, et al. Postzygotic HRAS and KRAS mutations cause nevus sebaceous and Schimmelpenning syndrome. *Nat Genet*. juillet 2012;44(7):783-7.
8. Thomas AC, Zeng Z, Rivière J-B, O'Shaughnessy R, Al-Olabi L, St-Onge J, et al. Mosaic Activating Mutations in GNA11 and GNAQ Are Associated with Phakomatosis Pigmentovascularis and Extensive Dermal Melanocytosis. *J Invest Dermatol*. avril 2016;136(4):770-8.

9. Mirzaa GM, Campbell CD, Solovieff N, Goold C, Jansen LA, Menon S, et al. Association of MTOR Mutations With Developmental Brain Disorders, Including Megalencephaly, Focal Cortical Dysplasia, and Pigmentary Mosaicism. *JAMA Neurol.* 1 juill 2016;73(7):836-45.
10. Sybert VP. Hypomelanosis of Ito: A Description, Not a Diagnosis. *J Invest Dermatol.* 1 nov 1994;103(5):S141-3.
11. Poduri A, Evrony GD, Cai X, Walsh CA. Somatic Mutation, Genomic Variation, and Neurological Disease. *Science.* 5 juill 2013;341(6141):1237758.
12. Abuelo D. Clinical significance of chimerism. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* mai 2009;151C(2):148-51.
13. Lynch M. Evolution of the mutation rate. *Trends Genet TIG.* août 2010;26(8):345.
14. Forsberg LA, Gisselsson D, Dumanski JP. Mosaicism in health and disease — clones picking up speed. *Nat Rev Genet.* février 2017;18(2):128-42.
15. Vanneste E, Voet T, Le Caignec C, Ampe M, Konings P, Melotte C, et al. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med.* mai 2009;15(5):577-83.
16. Taylor TH, Gitlin SA, Patrick JL, Crain JL, Wilson JM, Griffin DK. The origin, mechanisms, incidence and clinical consequences of chromosomal mosaicism in humans. *Hum Reprod Update.* août 2014;20(4):571-81.
17. Dreyer WJ, Roman JM. Immunology and embryogenesis: the chromosomal editing hypothesis. *Adv Exp Med Biol.* 1984;181:87-97.
18. Lodato MA, Woodworth MB, Lee S, Evrony GD, Mehta BK, Karger A, et al. Somatic mutation in single human neurons tracks developmental and transcriptional history. *Science.* 2 oct 2015;350(6256):94.
19. McConnell MJ, Lindberg MR, Brennand KJ, Piper JC, Voet T, Cowing-Zitron C, et al. Mosaic Copy Number Variation in Human Neurons. *Science.* 1 nov 2013;342(6158):632-7.

20. Baillie JK, Barnett MW, Upton KR, Gerhardt DJ, Richmond TA, De Sapio F, et al. Somatic retrotransposition alters the genetic landscape of the human brain. *Nature*. 30 oct 2011;479(7374):534-7.
21. Blaschko A. Die Nervenverteilung in der Haut in ihrer Beziehung zu den Erkrankungen der Haut. In Breslau: Wien ; Leipzig : W. Braumèuller; 1901.
22. Happle R. Mosaicism in Human Skin - Understanding Nevi, Nevoid Skin Disorders, and Cutaneous Neoplasia [Internet]. Berlin: Springer; 2014 [cité 7 mai 2017]. Disponible sur: <http://www.springer.com/gp/book/9783642387647>
23. Maruani A, Khallouf R, Machet M-C, Lorette G. Diffuse linear and whorled nevoid hypermelanosis in a newborn. *J Pediatr*. janv 2012;160(1):171.
24. Sorlin A, Maruani A, Aubriot-Lorton M-H, Kuentz P, Duffourd Y, Teyssere S, et al. Mosaicism for a KITLG mutation in linear and whorled nevoid hypermelanosis. *J Invest Dermatol*. 28 févr 2017;
25. Jackson R. The lines of Blaschko: a review and reconsideration. *Br J Dermatol*. 1 oct 1976;95(4):349-60.
26. Happle R. Genetic significance of Blaschko's lines. *Z Hautkr*. 15 sept 1977;52(18):935-44.
27. Happle R. The categories of cutaneous mosaicism: A proposed classification. *Am J Med Genet A*. févr 2016;170A(2):452-9.
28. Biesecker LG, Spinner NB. A genomic view of mosaicism and human disease. *Nat Rev Genet*. mai 2013;14(5):307-20.
29. Myers JN, Davis L, Sheehan D, Kulharya AS. Mosaic tetrasomy 13q and phylloid hypomelanosis: a case report and review of the literature. *Pediatr Dermatol*. avr 2015;32(2):263-6.
30. Ruggieri M, Roggini M, Kennerknecht I, Polizzi A, Distefano A, Pavone V. Spectrum of skeletal abnormalities in a complex malformation syndrome with «cutis tricolor» (Ruggieri-Happle syndrome). *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992. janv 2011;100(1):121-7.

31. Happle R. Cutaneous manifestation of lethal genes. *Hum Genet.* mars 1986;72(3):280.
32. Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV, Merino MJ, Friedman E, Spiegel AM. Activating Mutations of the Stimulatory G Protein in the McCune–Albright Syndrome. *N Engl J Med.* décembre 1991;325(24):1688-95.
33. Gajecka M. Unrevealed mosaicism in the next-generation sequencing era. *Mol Genet Genomics.* 2016;291:513-30.
34. Kuentz P, St-Onge J, Duffourd Y, Courcet J-B, Carmignac V, Jouan T, et al. Molecular diagnosis of PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS) in 162 patients and recommendations for genetic testing. *Genet Med* [Internet]. février 2017 [cité 9 mai 2017]; Disponible sur: <http://www.nature.com/gate2.inist.fr/gim/journal/vaop/ncurrent/full/gim2016220a.html>
35. Shirley MD, Tang H, Gallione CJ, Baugher JD, Frelin LP, Cohen B, et al. Sturge–Weber Syndrome and Port-Wine Stains Caused by Somatic Mutation in GNAQ. *N Engl J Med.* mai 2013;368(21):1971-9.
36. van Steensel MAM. Neurocutaneous Manifestations of Genetic Mosaicism. *J Pediatr Genet.* sept 2015;4(3):144-53.
37. Nathan N, Keppler-Noreuil KM, Biesecker LG, Moss J, Darling TN. Mosaic Disorders of the PI3K/PTEN/AKT/TSC/mTORC1 Signaling Pathway. *Dermatol Clin.* janv 2017;35(1):51-60.
38. Hafner C, Groesser L. Mosaic RASopathies. *Cell Cycle.* 1 janv 2013;12(1):43-50.
39. Ruggieri M, Praticò AD. Mosaic Neurocutaneous Disorders and Their Causes. *Semin Pediatr Neurol.* déc 2015;22(4):207-33.
40. Ito M. Studies on melanin XI. Incontinentia pigmenti achrominans. A singular case of nevus depigmentosus systematicus bilateralis. *Tohoku J Exp Med.* 1952;55(Supplement):57-9.
41. Ruiz-Maldonado R, Toussaint S, Tamayo L, Laterza A, del Castillo V. Hypomelanosis of Ito: Diagnostic Criteria and Report of 41 Cases. *Pediatr Dermatol.* 1 mars 1992;9(1):1-10.

42. Donnai D, Read AP, McKeown C, Andrews T. Hypomelanosis of Ito: a manifestation of mosaicism or chimerism. *J Med Genet.* 1 déc 1988;25(12):809-18.
43. Taibjee SM, Bennett DC, Moss C. Abnormal pigmentation in hypomelanosis of Ito and pigmentary mosaicism: the role of pigmentary genes. *Br J Dermatol.* août 2004;151(2):269-82.
44. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics.* 15 juill 2009;25(14):1754-60.
45. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 9 janv 2010;20(9):1297-303.
46. Karczewski KJ, Weisburd B, Thomas B, Solomonson M, Ruderfer DM, Kavanagh D, et al. The ExAC browser: displaying reference data information from over 60 000 exomes. *Nucleic Acids Res.* 4 janv 2017;45(D1):D840-5.
47. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature.* août 2016;536(7616):285-91.
48. Kircher M, Witten DM, Jain P, O’Roak BJ, Cooper GM, Shendure J. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet.* mars 2014;46(3):310-5.
49. Grantham R. Amino Acid Difference Formula to Help Explain Protein Evolution. *Science.* 6 sept 1974;185(4154):862-4.
50. Cooper GM, Stone EA, Asimenos G, Green ED, Batzoglou S, Sidow A. Distribution and intensity of constraint in mammalian genomic sequence. *Genome Res.* 7 janv 2005;15(7):901-13.
51. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet.* janv 2013;Chapter 7:Unit7.20.
52. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc.* juin 2009;4(7):1073-81.

53. Ruggieri M, Pavone L. Topical Review: Hypomelanosis of Ito: Clinical Syndrome or Just Phenotype? *J Child Neurol.* 1 oct 2000;15(10):635-44.
54. Schulze TG, McMahon FJ. Defining the Phenotype in Human Genetic Studies: Forward Genetics and Reverse Phenotyping. *Hum Hered.* 2004;58(3-4):131-8.
55. Inoue M, Fukuda M, Ishii E, Sayama K. Linear Leukoplakia and Central Nervous System Lesions: A Clinical Clue to the Diagnosis of Hypomelanosis of Ito. *J Pediatr.* sept 2015;167(3):771-771.e1.
56. Souza PVS de, Pinto WBV de R, Calente FG, Burlin S, Pedroso JL, Oliveira ASB, et al. Hypomelanosis of Ito presenting with adult-onset dementia and marked enlarged Virchow-Robin spaces. *Arq Neuropsiquiatr.* avr 2015;73(4):366-8.
57. Orgaz JL, Herraiz C, Sanz-Moreno V. Rho GTPases modulate malignant transformation of tumor cells. *Small GTPases.* 2 oct 2014;5(4):e983867.
58. Hall A. Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton. *Science.* 23 janv 1998;279(5350):509-14.
59. Burridge K, Guilly C. Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension. *Exp Cell Res.* 10 avr 2016;343(1):14-20.
60. Pan ZK, Ye RD, Christiansen SC, Jagels MA, Bokoch GM, Zuraw BL. Role of the Rho GTPase in Bradykinin-Stimulated Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation and IL-1 $\beta$  Gene Expression in Cultured Human Epithelial Cells. *J Immunol.* 15 mars 1998;160(6):3038-45.
61. Zhao X, Lu L, Pokhriyal N, Ma H, Duan L, Lin S, et al. Overexpression of RhoA Induces Preneoplastic Transformation of Primary Mammary Epithelial Cells. *Cancer Res.* 15 janv 2009;69(2):483-91.
62. Petrovski S, Wang Q, Heinzen EL, Allen AS, Goldstein DB. Genic Intolerance to Functional Variation and the Interpretation of Personal Genomes. *PLOS Genet.* août 2013;9(8):e1003709.
63. Blomen VA, Májek P, Jae LT, Bigenzahn JW, Nieuwenhuis J, Staring J, et al. Gene essentiality and synthetic lethality in haploid human cells. *Science.* 27 nov 2015;350(6264):1092-6.

64. Wang T, Birsoy K, Hughes NW, Krupczak KM, Post Y, Wei JJ, et al. Identification and characterization of essential genes in the human genome. *Science*. 27 nov 2015;350(6264):1096-101.
65. Hart T, Chandrashekhar M, Aregger M, Steinhart Z, Brown KR, MacLeod G, et al. High-Resolution CRISPR Screens Reveal Fitness Genes and Genotype-Specific Cancer Liabilities. *Cell*. décembre 2015;163(6):1515-26.
66. Zhang S, Zhou X, Lang RA, Guo F. RhoA of the Rho Family Small GTPases Is Essential for B Lymphocyte Development. *PLOS ONE*. 16 mars 2012;7(3):e33773.
67. Acuna-Hidalgo R, Bo T, Kwint MP, van de Vorst M, Pinelli M, Veltman JA, et al. Post-zygotic Point Mutations Are an Underrecognized Source of De Novo Genomic Variation. *Am J Hum Genet*. 2 juill 2015;97(1):67-74.
68. Fromer M, Purcell SM. Using XHMM software to detect copy number variation in whole-exome sequencing data. *Curr Protoc Hum Genet* Editor Board Jonathan Haines Al. 24 avr 2014;81:7.23.1-7.23.21.
69. Holstege H, Pfeiffer W, Sie D, Hulsman M, Nicholas TJ, Lee CC, et al. Somatic mutations found in the healthy blood compartment of a 115-yr-old woman demonstrate oligoclonal hematopoiesis. *Genome Res*. mai 2014;24(5):733-42.
70. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown G, Chao C, Chitipiralla S, et al. ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res*. 4 janv 2016;44(D1):D862-8.
71. Forbes SA, Beare D, Gunasekaran P, Leung K, Bindal N, Boutselakis H, et al. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res*. 28 janv 2015;43(D1):D805-11.

## **Annexes**

**Annexe 1 – Description du phénotype des patients de la cohorte M.U.S.T.A.R.D. avec hypopigmentation linéaire étudiés en séquençage haut débit**

Subject	<i>RHOA</i> 's related clinical manifestation							Other symptom	Test	Result
	Linear hypopigmentation	Craniofacial asymmetry	Acral anomalies	Teeth Anomalies	Ocular anomalies	Brain anomalies	Intellectual disability			
S1	+	+	+	+	+	+	-	-	WES	<i>RHOA</i>
S2	+	+	+	+	+	+	-	Asymmetrical hearing loss	WES	<i>RHOA</i>
S3	+	+	+	+	-	+	-	Skeletal and vesicoureteral anomalies	WES	<i>RHOA</i>
S4	+	+	+	+	+	+	-	-	TUDS	<i>RHOA</i>
S5	+	+	+	+	-	-	-	Sigmoid and rectal atresia	TUDS	<i>RHOA</i>
S6	+	+	+	+	-	NA	-	-	TUDS	-
S7	+	+	+	-	-	-	-	Skeletal anomalies	WES	-
S8	+	-	-	-	+	+	+	Autism, Skeletal anomalies, seizure, spina	WES	Other postzygotic

										bifida occulta			cause
S9	+	-	-	-	+	-	+	+	+	Atrial septal aneurysm, cryptorchidism	WES	Other constitutional cause	
S10	+	-	+	-	+	+	+	+	+	Feeding difficulties, hypospadias, short stature, scoliosis, bilateral hearing loss, brachycephaly, hypertelorism	WES	Other postzygotic cause	
S11	+	-	-	-	-	+	+	+	+	Autism, seizure	WES	Other postzygotic cause	
S12	+	-	-	-	-	-	-	+	+	Fronto-nasal dysplasia, epilepsy, lower limbs hypoplasia	WES	Other constitutional cause	
S13	+	-	+	-	-	-	-	+	+	Eczema, tongue protrusion	WES	-	
S14	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Skeletal anomalies, ichtiosis	WES	Other postzygotic cause	
S15	+	-	-	-	-	-	-	+	+	Autism, hypotonia, feeding difficulties, hand stereotypies	WES	Other constitutional cause	
S16	+	-	-	-	-	-	-	+	+	Low set hairline	WES	Other postzygotic cause	

S17	+	-	-	-	-	-	-	+	Ptosis, Kawasaki disease, encopresia.	WES	-
S18	+	-	-	-	-	-	+	-	Movement disorder	WES	Other postzygotic cause
S19	+	-	-	-	-	-	+	-	Scoliosis, kidney anomalies, leg length discrepancy	WES	-
S20	+	-	-	-	-	-	+	-	Progressive peripheral neuropathy	WES	Other postzygotic cause
S21	+	-	-	-	-	+	-	+	Seizures, autism	WES	-
S22	+	-	-	-	-	-	+	-	Macrocephaly	WES	-
S23	+	-	+	-	-	-	-	+	Leg length discrepancy, scoliosis, delayed puberty, cardiac valvular dysplasia	WES	Other postzygotic cause
S24	+	-	-	-	-	-	+	+	Obesity, synophris, blepharophimosis, ideomotor apraxia	WES	Other postzygotic cause
S25	+	-	-	-	-	-	-	-	Focal epilepsy	WES	Other postzygotic cause
S26	+	-	-	-	-	-	NA	+	Cryptorchidism, strabismus	TUDS	-

S27	+	-	-	+	-	NA	+	+	Microcephaly	TUDS	-
S28	+	-	-	-	NA	+	+	+	Feeding difficulties, atrial septal defect	TUDS	-
S29									-	TUDS	-
S30	+	-	-	+	+	-	+	+		TUDS	-

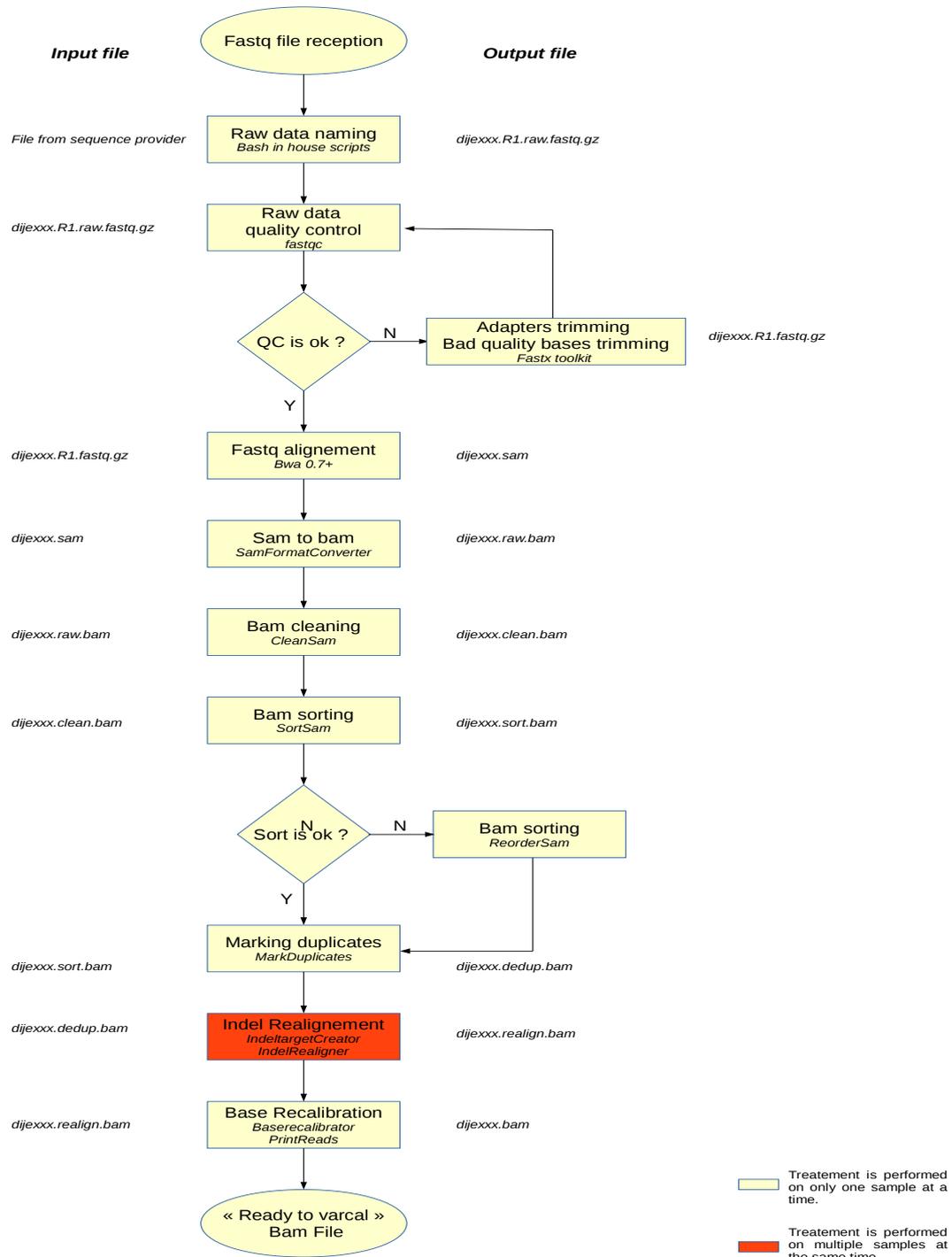
**Annexe 2 – Version révisée de la Supplementary Table 6 : RHOA mutations, frequency in public variant databases, and in silico predictions**

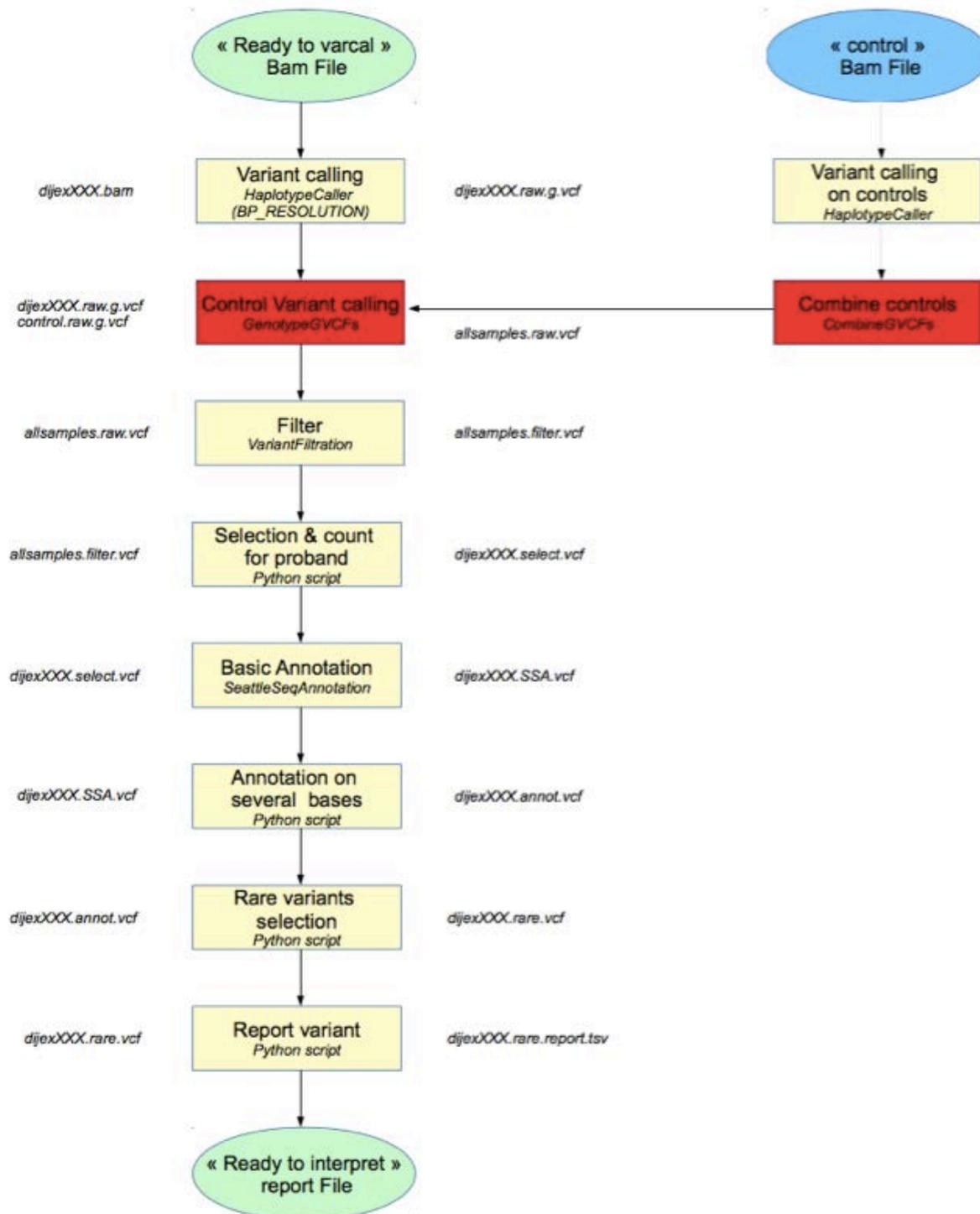
Variant	dbSNP (build 147)	COSMIC <sup>b</sup>	ExAC <sup>c</sup>	gnomAD <sup>e</sup>	GERP score	CADD score	PolyPhen-2 HumVar score <sup>d</sup>	SIFT score	Grantham score
chr3:g.49412884C>T c.139G>A p.Glu47Lys	Absent	Absent	None (~120,900 alleles sequenced)	None (~252,400 alleles sequenced)	5.9	35.0	0,855 (possibly damaging)	0.010 (damaging)	56
chr3:g.49405927G>A c.211C>T p.Pro71Ser	Absent	Absent	None (~121,400 alleles sequenced)	None (~248,700 alleles sequenced)	5.8	33.0	0,516 (possibly damaging)	0.002 (damaging)	74

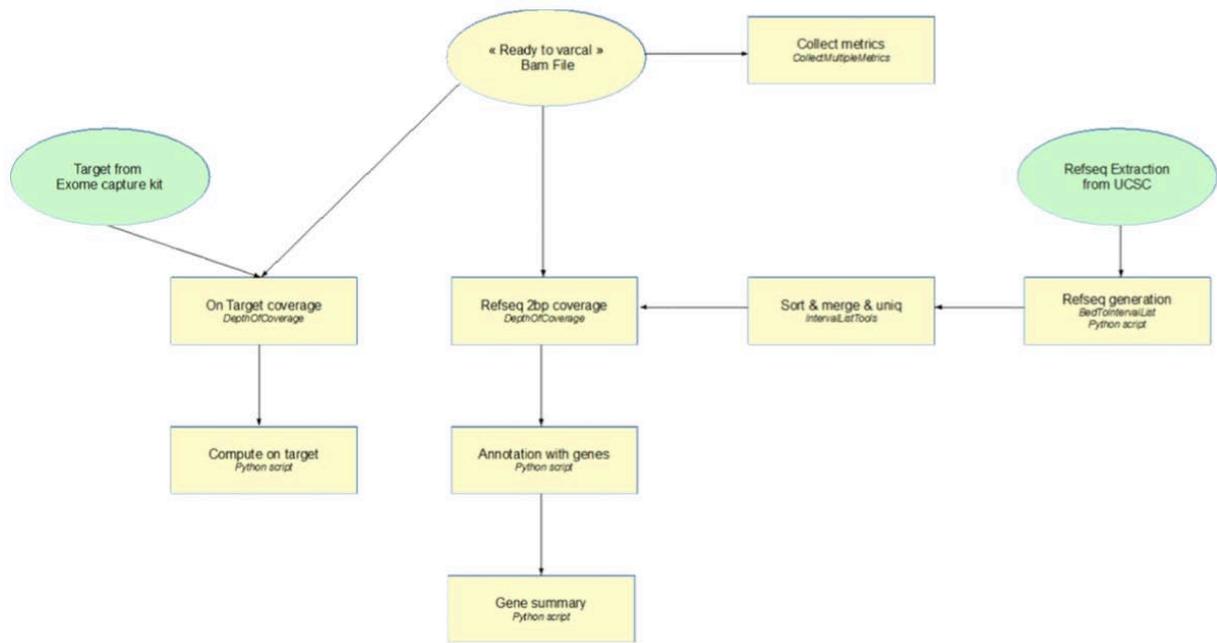
Abbreviations: COSMIC: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (71) ; ExAC: Exome Aggregation Consortium (46) ; gnomAD: Genome Aggregation Database; GERP: Genomic Evolutionary Rate Profiling (50) ; CADD: Combined Annotation-Dependent Depletion (48) ; PolyPhen-2: Polymorphism Phenotyping v2 (51) ; SIFT: Sorting Tolerant From Intolerant (52).

<sup>a</sup>Coordinates of DNA changes are based on the human genome reference sequence GRCh37/hg19. The nomenclature of nucleotide and amino acid changes is based on *RHOA* RefSeq accession number NM\_001664.2. <sup>b</sup>Presence in COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk/>, accessed in November 2016). <sup>c</sup>Number of alleles found in ExAC (<http://exac.broadinstitute.org/>, accessed in November 2016) and gnomAD (<http://gnomad.broadinstitute.org/>, accessed in November 2016). <sup>d</sup> Among the two scores provided by PolyPhen-2 the HumVar-trained model is the most appropriate for Mendelian diseases.

### Annexe 3 – Algorithme de l'analyse bioinformatique (pipeline) utilisée pour l'identification des variants d'intérêt







VU

NANCY, le 17 mai 2017  
Le Président de Thèse

Professeur Philippe JONVEAUX

NANCY, le 22 mai 2017  
Pour le Doyen de la Faculté de Médecine  
Le Vice-Doyen,

Professeur Marc DEBOUVERIE

AUTORISE À SOUTENIR ET À IMPRIMER LA THÈSE/ 9859

NANCY, le 26 mai 2017

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE,

Pierre MUTZENHARDT

---

## RÉSUMÉ

L'hypomélanose d'Ito est communément perçue comme une manifestation aspécifique de mosaïcisme. En raison de son association fréquente avec des manifestations extracutanées, en particulier cérébrales, elle est souvent considérée comme un syndrome neurocutané. À l'exception de rares rapports d'anomalies chromosomiques en mosaïque, non récurrentes, et de la récente description d'une hypopigmentation linéaire dans certains tableaux d'hémimégalencéphalie liés à *MTOR*, les causes génétiques de l'hypomélanose d'Ito restent inconnues.

Nous avons étudié 5 sujets indépendants présentant un syndrome neuroectodermique non décrit jusqu'alors, associant une hypopigmentation linéaire et une hypotrichose le long des lignes de Blaschko, une dysmorphie faciale asymétrique, des anomalies oculaires et dentaires, des anomalies des extrémités, ainsi qu'en leucoencéphalopathie apparemment asymptomatique. Le séquençage de l'exome complet de biopsies de peau atteinte, en trio cas index-parents, chez deux patients, a permis l'identification du même variant post-zygotique du gène *RHOA* chez les 2 sujets. Ce variant a également été retrouvé en séquençage cible *RHOA* chez deux autres sujets. Le cinquième sujet était porteur d'un autre variant de *RHOA*, détecté en exome en trio.

La protéine RhoA, codée par *RHOA*, est une petite GTPase de la superfamille Ras, impliquée dans le chimiotactisme, la guidance axonale, et le contrôle du cycle cellulaire. Il s'agit d'une protéine très conservée au cours de l'évolution, intolérante aux substitutions d'acides aminés, ajoutant la dysplasie ectodermique en mosaïque liée à *RHOA* aux syndromes causés par des mutations létales, pour lesquelles la survie n'est possible que par mosaïcisme. La transfection de plasmides mutants de *RHOA* dans des cellules NIH 3T3 a montré une diminution de l'étalement cellulaire, de la formation de fibre de stress, et de la phosphorylation des effecteurs de RhoA, MYPT1 et MLC2, suggérant un effet dominant-négatif des variants identifiés. Nos résultats ouvrent la voie à l'élucidation des étiologies moléculaires des tableaux de mosaïcisme pigmentaire, et mettent en évidence l'importance de *RHOA* dans le développement humain.

---

## TITRE EN ANGLAIS

Clinical and genetic characterization of a novel mosaic ectodermal dysplasia

---

## THÈSE :

MÉDECINE SPÉCIALISÉE – ANNÉE 2017

---

## MOTS CLÉS

Hypomélanose d'Ito, Anomalie du développement en mosaïque, Mutation post-zygotique, *RHOA*, Dysplasie ectodermique.

---

## UNIVERSITÉ DE LORRAINE

### Faculté de Médecine de Nancy

9, avenue de la Forêt de Haye

54505 VANDOEUVRE LES NANCY Cedex

---