



HAL
open science

Apport de l'analyse chromosomique sur différents microréseaux d'ADN dans l'identification de nouvelles mutations et la caractérisation de gènes candidats impliqués dans la déficience intellectuelle

Minh Tuan Huynh

► **To cite this version:**

Minh Tuan Huynh. Apport de l'analyse chromosomique sur différents microréseaux d'ADN dans l'identification de nouvelles mutations et la caractérisation de gènes candidats impliqués dans la déficience intellectuelle. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2013. Français. NNT : 2013LORR0129 . tel-01750122

HAL Id: tel-01750122

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750122>

Submitted on 29 Mar 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-theses-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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

Ecole doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

THESE

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Science de la Vie et de la Santé »

Par MINH TUAN HUYNH

**Apport de l'analyse chromosomique sur différents microréseaux d'ADN
dans l'identification de nouvelles mutations et la caractérisation de gènes candidats
impliqués dans la déficience intellectuelle**

Le 15 Novembre 2013

Membres du jury:

Rapporteurs :

Monsieur le Professeur Jean-Luc BRESSON

Biologie du développement et de la reproduction

Université de Franche-Comté

Madame le Professeur Dominique GAILLARD

Génétique

Université de Reims Champagne Ardennes

Examineurs :

Monsieur le Professeur Bruno LEHEUP

Génétique, Université de Lorraine

Monsieur le Professeur Philippe JONVEAUX

Génétique, Université de Lorraine

(Directeur de thèse)

INSERM U954-Université de Lorraine

Laboratoire de génétique-CHU de Nancy, rue du Morvan, 54511 Vandœuvre lès Nancy

Remerciements

Je tiens à remercier ici :

Monsieur le Professeur Philippe JONVEAUX, mon directeur de thèse : un grand merci pour sa direction, son précieux encadrement tout au long de mon travail, son encouragement, sa bienveillance afin que je puisse finir mon projet à terme.

Madame le Professeur Dominique GAILLARD et à Monsieur le Professeur Jean-Luc BRESSON pour l'honneur qu'il m'ont fait en acceptant d'évaluer ce travail, et d'être rapporteur de thèse.

Monsieur le Professeur Bruno LEHEUP d'avoir accepté d'examiner mes travaux et pour son intérêt et son soutien chaleureux au sein de notre équipe de recherche.

Madame le Docteur Céline Bonnet pour son aide et son encadrement sur le plan technique et scientifique, en particulier, la technique de l'analyse chromosomique sur microréseau d'ADN.

Madame le Docteur Mylène Béri pour son encadrement et son aide au début lorsque je suis venu au labo. Merci de m'avoir aidé sur l'analyse chromosomique sur microréseau d'ADN.

Madame le Docteur Mydriam Bronner pour la technique de séquençage de Sanger et le séquençage à haut débit ainsi que la technique de HRM (High Resolution Melting).

Monsieur le Docteur Christophe Philippe pour la biologie moléculaire.

Emmanuel Bresso pour les données bioinformatiques et les médecins généticiens cliniciens et neuropédiatres du CHU de Nancy, et des autres CHU qui ont contribué à notre travail de recherche.

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire de génétique : à toutes celles et ceux qui m'ont accompagné dans ce travail, m'ont encouragé et ont mis toutes leurs compétences et leur savoir à profit pour faire avancer mon travail. Merci pour leur disponibilité de tous les instants.

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	2
TABLES DES FIGURES.....	7
LISTE DES TABLES.....	10
LISTE DES ABREVIATIONS.....	11
PREAMBULE ET OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE.....	14
INTRODUCTION.....	16
I. Définition.....	16
II. Classification de la DI en fonction du QI.....	16
III. Classification de la DI en fonction de la clinique.....	17
IV. Bases génétiques de la déficience intellectuelle.....	17
1. DI due aux anomalies chromosomiques.....	18
1.1. DI due aux anomalies du nombre de chromosomes (aneuploïdies).....	18
1.2. DI due aux anomalies de la structure des chromosomes (aneusomies segmentaires).....	19
2. Déficience intellectuelle monogénique.....	24
2.1. Déficience intellectuelle liée à l'X.....	24
2.2. Déficience intellectuelle autosomique.....	25
V. Fonctions des gènes de la déficience intellectuelle.....	26
1. Gènes impliqués dans la mise en circulation des vésicules pré synaptiques.....	28
2. Gènes impliqués dans l'organisation du compartiment postsynaptique.....	28
3. Gènes impliqués dans la dynamique du cytosquelette.....	29
4. Gènes impliqués dans la cascade de signalisation intracellulaire.....	30
5. Gènes impliqués dans la régulation épigénétique de la transcription.....	30
VI. Continuum étiologique entre DI et autres phénotypes neurodéveloppementaux.....	31
VII. Déficience intellectuelle : quel mode d'hérédité ?.....	32
VIII. Mécanismes des réarrangements génomiques dans les maladies génomiques.....	33
1. Recombinaison Homologue Non Allélique (NAHR).....	33
2. Ligature d'extrémités d'ADN non homologues (Non Homologous End Joining ou NHEJ).....	35
3. Fork Stalling and Template Switching (FoSTeS).....	35

MATERIEL ET METHODES	37
I. Recrutement des patients.....	37
II.Méthodes.....	37
1. Prélèvements des échantillons et extraction d'ADN.....	37
2. Analyse chromosomique sur microréseau d'ADN.....	38
2.1. Contrôle de la qualité d'ADN.....	38
2.2. Digestion d'ADN par l'enzyme de restriction.....	39
2.3. Marquage des produits digérés.....	40
2.4. Purifications des produits marqués.....	40
2.5. Hybridation des produits purifiés.....	41
2.6. Lavage des lames.....	41
2.7. Analyse des données.....	41
2.8. Différents types d'ACM utilisés.....	43
3. PCR quantitative.....	44
3.1. Design des amorces.....	45
3.2. Tester l'efficacité des amorces.....	45
3.3. Analyse des résultats par la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$	48
3.4. Amorces spécifiques des gènes de DI pour la qPCR.....	49
4. Séquençage des gènes candidats de DI.....	51
4.1. Design des amorces.....	51
4.2. Amorces spécifiques utilisées pour le séquençage.....	52
5. Transcription inverse PCR.....	57
6. Transcription inverse PCR quantitative (<i>RTq-PCR</i>).....	57
7. PCR semi-quantitative (analyse de l'haplotype).....	58
RESULTATS	
I. Déficience intellectuelle légère liée au gène <i>RUNX1T1</i>	
1. Observation clinique.....	59
2. Délétion du gène <i>RUNX1T1</i> par ACM 180K.....	60
3. Délétion <i>de novo</i> du gène <i>RUNX1T1</i> par PCR en temps réel.....	61
4. Séquençage du point de jonction du transcrit aberrant <i>RUNX1T1</i>	62
5. Exclusion de la mutation sur l'allèle normal du gène <i>RUNX1T1</i>	63

II. Déficience Intellectuelle légère à modérée liée au gène *ANKRD1*

1. Observation clinique.....	63
2. Délétion du gène <i>ANKRD11</i> par ACM 180K.....	63
3. PCR quantitative du gène <i>ANKRD11</i>	65

III. Déficience Intellectuelle sévère, spasmes infantiles et délétion du gène *KIAA1468*

1. Observation clinique.....	65
2. Délétion du gène <i>KIAA1468</i> sur ACM 180K.....	66
3. Délétion du gène <i>KIAA1468 de novo</i> sur la PCR quantitative.....	68
4. Etude de l'expression du gène <i>KIAA1468</i> par PCR quantitative.....	69
5. Origine parentale de la délétion du gène <i>KIAA1468</i>	70
6. Séquençage du gène candidat <i>KIAA1468</i>	71
7. Recherche de grands réarrangements intragéniques du gène <i>KIAA1468</i>	74

IV. Déficience intellectuelle sévère, encéphalopathie infantile précoce et la délétion du gène *FABP7*

1. Observation clinique.....	74
2. ACM 180K avec la délétion du gène <i>FABP7</i>	75
3. Délétion <i>de novo</i> du gène <i>FABP7</i> sur PCR quantitative.....	77
4. Etude de l'expression du gène <i>FABP7</i>	78
5. Séquençage de l'allèle normal du gène <i>FABP7</i>	78

V. Analyse chromosomique sur microréseau 1M spécifique des gènes de la déficience intellectuelle

1. Contrôle de la qualité des lames.....	78
2. Analyse des lames d'ACM-1M-DIS-DIS.....	81
2.1. Analyse des régions génomiques en déséquilibre étape par étape en fonction des critères d'analyse chromosomique sur microréseau d'ADN 1M.....	81
2.1.1. Données obtenues.....	81
2.1.2. Critères utilisés pour le filtrage des données.....	83
2.1.3. Algorithme d'analyse.....	84
2.2. Contrôle des déséquilibres génomiques par la PCR quantitative.....	88
2.2.1. CNV contrôlés par qPCR.....	88
2.2.2. Quelques exemples de contrôles par qPCR.....	91

2.2.2.1. Un exemple d'un faux positif.....	91
2.2.2.2. Un exemple d'une région déséquilibrée héritée d'un parent.....	92
2.2.2.3. Une délétion délétère de novo du gène <i>ZEB2</i>	93
2.2.2.3.1. Observation clinique.....	93
2.2.2.3.2. Résultat de l'ACM-1M-DIS avec la délétion du gène <i>ZEB2</i>	94
2.2.2.3.3. Résultat de l'ACM 105K.....	96
2.2.2.3.4. Délétion de novo du gène <i>ZEB2</i> sur PCR quantitative.....	97
2.2.2.3.5. Séquençage du point de cassure de l'allèle délété.....	97
2.3. Contrôles des déséquilibres génomiques réalisés par PCR.....	99
2.4. Régions en déséquilibre ayant un potentiel effet pathogène non contrôlées dans la première phase de l'étude.....	101
2.4.1. CNV ne contenant pas de gène exerçant un potentiel effet de position sur les gènes voisins.....	101
2.4.2. CNV touchant des gènes impliqués dans des maladies de transmission autosomique récessive.....	103
DISCUSSION	
1. Haploinsuffisance du gène <i>RUNX1T1</i> , gène candidat autosomique dominant de déficience intellectuelle.....	104
2. DI syndromique et variabilité phénotypique : exemple du syndrome KBG et du gène <i>ANKRD11</i>	106
3. Délétion du gène <i>KIAA1468</i> et spasmes infantiles.....	107
4. DI sévère avec la délétion du gène <i>FABP7</i>	118
5. Analyse chromosomique sur microréseau de haute résolution 1M ciblée sur les gènes de la déficience intellectuelle.....	122
CONCLUSION et PERSPECTIVES	125
BIBLIOGRAPHIE	128
ANNEXES	139

Liste des Figures

Figure 1 : Anomalies chromosomiques de grande taille.....	19
Figure 2 : Mécanismes de l'effet de position.....	22
Figure 3 : Pictogramme avec 85 gènes de DI syndromique et 39 gènes de DI non syndromique sur l'X.....	24
Figure 4 : Principales voies d'action des protéines impliquées dans la DI.....	27
Figure 5 : Mécanisme de NAHR.....	34
Figure 6 : Mécanismes de NHEJ et FoSTeS.....	36
Figure 7 : Contrôle de la qualité d'ADN sur gel d'agarose 0.8%.....	39
Figure 8 : Contrôle de la qualité d'ADN après digestion enzymatique.....	39
Figure 9 : Rapport de contrôle de qualité des lames d'ACM-1M-DIS.....	42
Figure 10 : Design d'ACM-1M-DIS avec les régions de forte densité des sondes au niveau des gènes candidats de DI et de leurs régions en amont et en aval.....	44
Figure 11 : Principe de la PCR en temps réel.....	46
Figure 12 : Exemple de contrôle de l'efficacité des amorces de la PCR en temps réel.....	47
Figure 13 : Photo de la patiente avec la délétion du gène <i>RUNX1T1</i>	59
Figure 14 : ACM 180K avec la délétion 37.85 kb du gène <i>RUNX1T1</i>	60
Figure 15 : Délétion d'une taille minimale de 37.85 kb emportant des exons 3 à 6 du gène <i>RUNX1T1</i> sur ACM 180K.....	61
Figure 16 : PCR en temps réel confirme la délétion <i>de novo</i> des exons 3 à 7 du gène <i>RUNX1T1</i>	61
Figure 17 : Séquençage du point de jonction du transcrit aberrant <i>RUNX1T1</i> par la Gap-PCR.....	62
Figure 18 : ACM 180K avec la délétion du gène <i>ANKRD11</i>	64
Figure 19 : Délétion d'une taille maximale de 232 kb du gène <i>ANKRD11</i> sur ACM 180K.....	64
Figure 20 : PCR quantitative et la délétion du gène <i>ANKRD11</i>	65
Figure 21 : ACM 180K avec la délétion du gène <i>KIAA1468</i>	67
Figure 22 : Délétion du gène <i>KIAA1468</i> à partir de l'exon 09 sur ACM 180K.....	67

Figure 23 : Délétion du gène <i>KIAA1468</i> à partir de l'exon 09 sur PCR quantitative.....	68
Figure 24 : RT-qPCR du gène <i>KIAA1468</i> avec 4 témoins normaux.....	69
Figure 25 : Etudes parentales du marqueur 18x GT du gène <i>KIAA1468</i>	70
Figure 26: Détection du variant c.2761-7 T>C du gène <i>KIAA1468</i> par le séquençage.....	72
Figure 27 : Variant c.3547 G>A hérité d'un parent détecté par le séquençage du gène <i>KIAA1468</i>	73
Figure 28 : Recherche de grands réarrangements intragéniques du gène <i>KIAA1468</i> par la PCR quantitative.....	74
Figure 29 : ACM 180K et la délétion du gène <i>FABP7</i>	76
Figure 30 : Délétion d'une taille minimale de 142 kb emportant le gène <i>FABP7</i> sur ACM 180K.....	76
Figure 31 : Decipher : Cas de délétion 6q- emportant le gène <i>FABP7</i> dans la littérature.....	77
Figure 32 : Délétion <i>de novo</i> du gène <i>FABP7</i> sur la PCR quantitative.....	77
Figure 33 : Algorithme d'analyse des résultats des 46 patients avec DI par ACM-1M-DIS.....	84
Figure 34 : Exemple d'un faux-positif sur ACM-1M-DIS.....	91
Figure 35 : Exemple d'une région déséquilibrée héritée d'un parent.....	92
Figure 36 : Photographie de face et de profil de la patiente atteinte du syndrome de Mowat-Wilson.....	94
Figure 37 : Délétion <i>de novo</i> à partir de l'exon 5 du gène <i>ZEB2</i> sur ACM-1M-DIS.....	95
Figure 38 : Délétion des exons 5 à 9 du gène <i>ZEB2</i> avec 301 sondes déviantes sur ACM-1M-DIS et la sonde A_14_P122661 sur ACM 105K.....	95
Figure 39 : ACM 105K avec une seule sonde déviante A_14_P122661 sur la région 2q22.3.....	96
Figure 40 : Délétion des exons 5 à 9 du gène <i>ZEB2</i> a été confirmée par la PCR quantitative.....	97
Figure 41 : Séquençage du point de cassure du gène <i>ZEB2</i>	98
Figure 42 : Exemple de contrôle d'un CNV détecté par ACM-1M-DIS par la PCR.....	100

Figure 43 : Exemple d'une délétion en aval du gène <i>GRIK2</i> contenant d'un rétrotransposon du gène de <i>R3HDM2</i>	102
Figure 44 : Prédiction d'interaction de la protéine KIAA1468 (UniProt).....	109
Figure 45 : Structure du gène <i>KIAA1468</i> , domaines fonctionnelles codés par ses exons et mutation c.1675C>T p.R559*.....	112
Figure 46 : Structure du gène <i>FABP7</i> et mutation c.316_317insT/p.R107fs*4.....	121

Liste des tableaux

Tableau 1 : Revue de l'effet de position des gènes dans des maladies génétiques humaines.....	23
Tableau 2 : Paramètres de contrôle après l'extraction d'ADN.....	38
Tableau 3 : Rendement attendu et activité spécifique après marquage et purification.....	40
Tableau 4 : Evaluation de la performance de la PCR en temps réel.....	45
Tableau 5 : Récapitulatif des polymorphismes d'un seul nucléotide du séquençage du gène <i>KIAA1468</i>	71
Tableau 6 : Critères et valeurs limites retenues pour l'évaluation de la qualité des lames 1M-DIS.....	79
Tableau 7 : Valeurs des indicateurs obtenues pour les 46 hybridations.....	79
Tableau 8 : Scores qualité obtenus pour les lames d'ACM-1M-DIS.....	80
Tableau 9 : Nombre de CNVs détectés selon les différents seuils appliqués.....	82
Tableau 10 : Dix délétions exoniques uniques détectées chez un seul parmi les 45 patients.....	86
Tableau 11 : Pourcentage en GC des 28 délétions exoniques détectées.....	86
Tableau 12 : Récapitulatif des contrôles par la PCR quantitative.....	88
Tableau 13 : Récapitulatifs des anomalies déséquilibrées exoniques détectées par ACM-1M-DIS et contrôlées par PCR.....	101
Tableau 14 : Decipher : cas de délétion rapportés emportant le gène <i>RUNX1T1</i>	105
Tableau 15 : Liste des protéines (Uniprot) qui interagissent avec la protéine <i>KIAA1468</i>	108
Tableau 16 : Decipher : cas de délétion en 18q- emportant le gène <i>KIAA1468</i> avec des données cliniques rapportées disponibles dans la base de données Decipher.....	111
Tableau 17 : Récapitulatif des variants du gène <i>KIAA1468</i> dans Exome Variant Server.....	117
Tableau 18 : Variant du gène <i>FABP7</i> dans Exome Variant Server.....	120
Tableau 19 : Comparaison des signes cliniques du syndrome de Mowat-Wilson chez le probant et des cas atteints du syndrome de Mowat-Wilson rapportés.....	123

Abréviations

ACM : Analyse Chromosomique sur Microréseau d'ADN
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ARNm : ARN messenger
ARX : Aristaless-related homeobox, X-linked
ATP : Adenosine triphosphate
CHD7 : Chromodomain helicase DNA-Binding Protein 7
CIA : Communication InterAuriculaire
CIV : Communication InterVentriculaire
CNV : Copy Number Variation
CREBBP : CREB Binding Protein
DGV : Databases des variants génomiques ou Databases of Genomic Variants
DI : Déficience Intellectuelle
ddNTP : dideoxynucleotid
dNTP : deoxynucleotid
DYNC1H1 : Dynein, Cytoplasmic 1, Heavy Chain 1
EDTA : Acid éthylène diamine tétra-acétique
EEG : Electroencéphalogramme
FISH : Hybridation in situ en Fluorescence
FMRI : Fragile Mental Retardation 1
FoSTeS : Fork Stalling and Template Switching
HEATR2 : Heat-Repeat Containing Protein 2
HEATR4 : HEAT Repeat Containing Protein 4
IMR : Imagerie par Résonance Magnétique
Kb : Kilobase
KANSL1 : KAT 8 Regulatory NSL Complex Subunit 1
LCR : Low Copy Repeat
LINE : Long Interspersed Nuclear Element
Mb : Mégabase
MBD5 : Methyl CpG-Binding Domain Protein 5
MECP2 : Methyl CpG Binding Protein 2

NAHR : Non Allelic Homologous Recombination
ng : nanogramme
NGS : Next Generation Sequencing
NHEJ : Non Homologous End Joining
NMD : Nonsense-mediated RNA decay
OMIM (MIM) : Online Mendelian Inheritance in Man
PAX6 : Paired Box Gene 6
PCR : Réaction en Chaîne par Polymérase ou Polymerase Chain Reaction
PEV : Position Effect Variegation
Pmol : picomole
PIGN : Phosphatidyl-inositol glycan, class N
PKIB : Protein Kinase Inhibitor Kinase
PTPN11 : Protein tyrosine phosphatase, non receptor type 11
PSD : Post synaptic Density
QI : Quotient Intellectuelle
QPCR : Quantitative PCR
RAI1 : Retinoid Acid Induced 1
RELN : Reelin
RPPH1 : Ribonuclease P RNA component H1
RPS6KA3 : Ribosomal Protein S6, Kinase, 90 KD
RT-PCR : Reverse-Transcriptase PCR
RTq-PCR : Reverse transcriptase quantitative PCR
RUNX1T1 : Runt related transcription factor 1, translocated to, 1
SD : Standard Deviation
SI : Spasmes infantiles
SIFT : Sorting Intolerant From Tolerant
SMPDL3A : Sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3A
SMS : Smith-Magenis
SMW : Syndrome de Mowat-Wilson
SNAP : Screening for non-acceptable polymorphisms
SNP : Single-Nucleotide Polymorphism

Ss : Site splicing

TBE : Tris-Borate-EDTA

TOF : Tetralogy of Fallot

UBE3A : Ubiquitin-protein ligase 3A

UV : Ultraviolet

WT1 : WT1 gene

ZEB2 : Zinc finger E Box-Binding Homeobox 2

ZNF674 : Zinc finger protein 674

μl : microlitre

μg : microgramme

Préambule et objectif du travail de thèse

La déficience intellectuelle (DI) se caractérise par une insuffisance stable et définitive du développement intellectuel qui compromet une adaptation normale à l'environnement. La prévalence de la déficience intellectuelle est actuellement évaluée à 3% de la population générale. La cause en est retrouvée dans 50% des formes modérées à sévères, et dans 20 à 25 % des formes légères. La part de la génétique est à ce jour estimée entre 10 et 20% de l'ensemble des handicaps intellectuels. Il existe une très grande hétérogénéité génétique avec selon les estimations les plus récentes entre 1500 et 2000 gènes candidats dont seulement quelques centaines réellement impliqués dans la survenue de la déficience intellectuelle.

Les progrès observés dans l'identification des gènes candidats de DI sont le reflet des innovations technologiques, notamment la disponibilité d'outils d'analyse pangénomique de haute résolution. L'objectif de notre thèse s'inscrit dans l'apport de l'analyse chromosomique sur microréseau d'ADN (ACM) visant à identifier de nouvelles mutations et à caractériser des gènes candidats de la déficience intellectuelle.

Notre travail a mis à profit le recrutement du centre de référence maladies rares « Anomalies du développement » du CHU de Nancy pour le diagnostic étiologique de déficience intellectuelle et la plateforme de génomique du laboratoire de génétique du CHU de Nancy.

Nous présentons dans un premier temps les données générales et génétiques de la déficience intellectuelle.

Les résultats de nos travaux portent en premier lieu sur l'utilisation d'un microréseau d'ADN 180K avec l'identification de déséquilibres génomiques au sein de 4 gènes pour lesquels un rôle dans la DI est évoqué. Nous présentons par la suite les premiers résultats sur une cohorte de 46 patients étudiés à partir d'un nouveau microréseau d'ADN que nous avons mis en place et testé, microréseau spécifique de haute résolution 1M ciblé sur les gènes connus et candidats de la DI. Notre raisonnement a été basé sur deux observations : (i) à côté des déséquilibres exoniques, des anomalies siégeant dans les introns ou dans les régions intergéniques situées en amont et aval d'un gène peuvent contribuer à la dérégulation de son expression, (ii) le fait de cibler l'analyse sur des gènes connus pour être associés à la survenue d'une DI renforce l'implication d'un tel microremaniement à l'origine de la DI chez les individus étudiés.

Notre discussion nous a conduit, au regard de nos résultats, à souligner la difficulté rencontrée pour valider l'association entre variation du nombre de copies génomiques et la déficience intellectuelle avec l'importance de la consultation des bases de données des variations génomiques et de la nécessité de répliquions sur de grandes séries. Les données obtenues à partir de l'ACM-1M-DIS dédiée spécifiquement aux gènes de la DI nécessiteront des analyses complémentaires notamment s'agissant des CNV identifiés dans de potentielles régions régulatrices hautement conservées qui pourraient être impliquées dans la survenue de la déficience intellectuelle.

Ce travail de thèse a été en partie soutenu par le Ministère de la santé (DGOS) et une aide financière de l'Agence de la Biomédecine

Monsieur Minh Tuan HUYNH est boursier de l'Ambassade de France à HO CHI MINH Ville, VIET NAM.

INTRODUCTION

I. La déficience intellectuelle (DI). Définition

Selon l'American Association on Intellectual and Developmental Disabilities – (AAIDD) (<http://aaid.org/intellectual-disability/definition#.Ufpqb224kWI>) (Shogren et al., 2010) et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la déficience intellectuelle (DI) peut être définie par les critères suivants:

- Un quotient intellectuel (QI) inférieur à 70 (- 2 DS).
- Une diminution des capacités d'adaptation touchant au moins 2 champs et incluant : la communication (capacité à comprendre et produire une langue), la santé, la sécurité, le plaisir, l'autonomie et les relations sociales, les compétences liées au travail.
- Une apparition avant l'âge de 18 ans.

La déficience intellectuelle dont la fréquence est estimée en population occidentale entre 1 à 3 % a un impact médical, social et économique tant pour les personnes affectées que leur famille et la société. Il est indispensable d'en connaître l'étiologie afin de déterminer le risque de récurrence au sein de la famille, le pronostic à court terme et à long terme, les options thérapeutiques éventuelles, et d'évaluer la disponibilité des services spéciaux de prise en charge et les tous les autres problèmes importants pour les parents...Par ailleurs, la connaissance des causes, notamment génétiques, pourrait contribuer à mieux définir des solutions thérapeutiques adaptées aux modifications moléculaires et cellulaires participant à la DI.

II. Classification de la Déficience intellectuelle en fonction du QI

La classification de la DI se fait le plus souvent selon la DSM (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) quatrième édition, texte révisé (DSM-IV-TR), élaborée par l'American Psychiatric Association (APA) en fonction du niveau du QI, distinguant la DI légère, modérée, sévère et profonde.

1. Déficience intellectuelle légère : C'est la plus fréquente des DI (environ 80-85% des cas). Le QI est entre 50 à 69, les personnes souffrant d'une DI légère peuvent acquérir certaines compétences académiques. L'acquisition du langage est retardée. Elles peuvent vivre de façon autonome dans la communauté avec un soutien social.

2. Déficience intellectuelle modérée : elle représente environ 10% des déficients intellectuels avec un QI évalué entre 35 à 49. Une scolarité adaptée peut conduire à l'acquisition de rudiments de lecture, d'écriture. Ces patients peuvent communiquer et vivre dans une petite communauté (groupe de la famille) mais l'autonomie reste incomplète.

3. Déficience intellectuelle sévère : elle représente 3-4% des patients ayant une déficience intellectuelle avec un QI entre 20 à 34. Ces personnes nécessitent un soutien constant, la communication est altérée, les compétences sont limitées, certains selon les cas pouvant vivre dans l'espace familial.

4. Déficience intellectuelle profonde : elle représente 1-2% des patients avec un QI inférieur à 20. Ces patients ont besoin d'une surveillance permanente et il existe souvent des troubles neurologiques associés.

III- Classification de la déficience intellectuelle en fonction de la clinique

Classiquement la DI a été divisée selon deux types de présentation clinique: la DI syndromique et la DI non syndromique. La DI syndromique outre l'atteinte cognitive associe à des degrés divers des signes physiques (dysmorphie crânio-faciale, anomalies d'organes, malformations des extrémités, trouble de la croissance), des symptômes neurologiques (épilepsie), des troubles métaboliques, à l'opposé des formes non-syndromiques où la DI est la seule caractéristique clinique présente. Si certaines présentations cliniques syndromiques contribuent à orienter le diagnostic étiologique, il est actuellement clairement démontré que pour certaines causes la frontière entre ces deux présentations est floue, rendant difficile l'établissement de corrélations phénotype-génotype (Regan et al., 2010). Par exemple, les gènes *RPS6KA3* (MIM 300075) ou *ARX* (MIM 300382) responsables d'une DI syndromique spécifique peuvent, pour certaines de leurs mutations, être associés à une DI non syndromique.

IV. Les bases génétiques de la déficience intellectuelle

A côté des causes environnementales pouvant survenir à différentes étapes du développement (période anténatale, périnatale ou postnatale) telles les causes nutritionnelles, traumatiques, infectieuses, toxiques (syndrome d'alcoolisation foetal) et la naissance prématurée, les causes génétiques représentent une cause non négligeable, et de nos jours semblent plus particulièrement contribuer aux formes modérées à sévères de DI. Ainsi selon les données de la littérature, avec

toutefois certaines discordances selon les séries, les causes génétiques représenteraient 65% des formes modérées à sévères à l'opposé des formes légères pour lesquelles une cause génétique n'est identifiée que dans 20% des cas (von Bokhoven et al, 2011). Différentes approches ont été développées pour l'identification des gènes de la DI : (i) le clonage positionnel basé sur des réarrangements chromosomiques ou des variations de nombre de copie génomique (CNV), (ii) la recherche de mutation dans des gènes situés dans un intervalle candidat identifié via une analyse de liaison dans des familles avec plusieurs individus atteints de DI, (iii) le séquençage direct de gènes candidats en raison de leur fonction, de leur profil d'expression suggérant un rôle dans la cognition, et (iv) le séquençage haut débit de l'exome chez des individus atteints de DI.

Les causes génétiques comprennent les anomalies chromosomiques quantitatives (aneuploïdies, aneusomies segmentaires et déséquilibres génomiques de petite taille) et les maladies monogéniques.

1. Déficience intellectuelle due aux anomalies chromosomiques

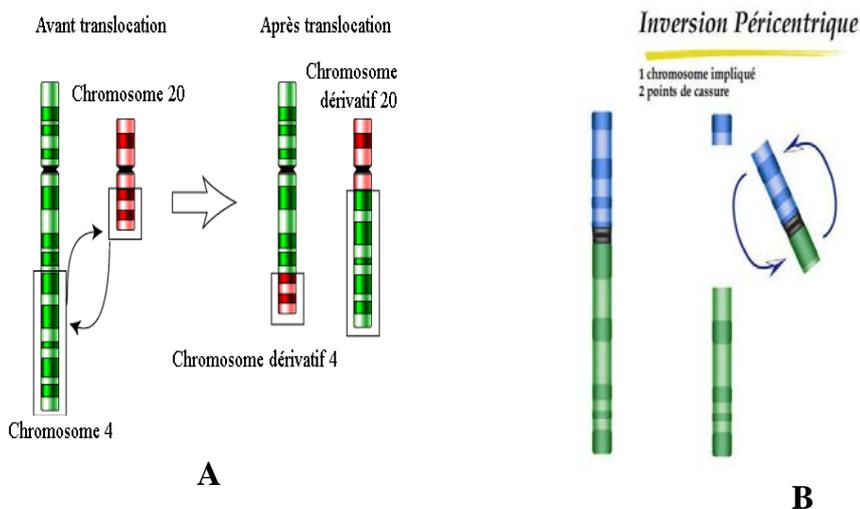
Ces anomalies sont détectées le plus souvent à partir de *l'analyse du caryotype conventionnel* (avec un seuil de résolution de 5-10 Mb) parfois complété par *l'analyse en hybridation in situ en fluorescence (FISH)*.

1.1. DI due aux anomalies du nombre de chromosomes (aneuploïdies)

Le syndrome de Down ou trisomie 21 est la cause la plus fréquente de déficience intellectuelle non héréditaire, 1/800 naissances (Hassold et al, 2000). Les principaux traits observés sont une dysmorphie crânio-faciale et un déficit intellectuel modéré à sévère, auxquelles peuvent s'associer, une cardiopathie congénitale (le plus souvent le canal atrio-ventriculaire), une prédisposition aux hémopathies malignes, une maladie d'Alzheimer précoce. L'âge maternel avancé à la conception est le facteur de risque le plus clairement identifié de survenue de la trisomie 21 qui est le résultat d'une non-disjonction en méiose I maternelle. Parmi les autres aneuploïdies autosomiques on note la trisomie 13 (syndrome de Patau), la trisomie 18 (syndrome d'Edwards). Les aneuploïdies des chromosomes sexuels sont quant à elles inconstamment associées à une DI, le plus souvent légère comme le syndrome de Klinefelter (47,XXY), le syndrome de Turner (45,X).

1.2. DI due aux anomalies de la structure des chromosomes (aneusomies segmentaires)

Les réarrangements structuraux résultent de cassures chromosomiques suivies d'une reconstitution anormale. Les réarrangements chromosomiques sont divisés en 2 types: anomalie équilibrée et anomalie déséquilibrée. Les réarrangements équilibrés (telles les translocations, inversions) sont portés par des personnes cliniquement asymptomatiques car le remaniement chromosomique ne conduit pas à une perte ou un gain de matériel chromosomique mais à un repositionnement des chromosomes (**Figure 1**). Fait important, un remaniement chromosomique équilibré peut toutefois se déséquilibrer lors de la production des gamètes, avec pour la descendance du parent porteur, le risque de survenue d'un syndrome malformatif et/ou DI en raison du gain ou de la perte chromosomique partielle (trisomie-monosomie). Dans de très rares cas, un réarrangement dit « équilibré » peut s'associer à une pathologie de point de cassure à l'origine d'un phénotype (DI et/ou syndrome malformatif). Le point de cassure chromosomique interrompt alors la structure ou altère la régulation d'un gène important pour le développement de l'individu. Ces situations exceptionnelles ont contribué à identifier le gène candidat de certaines maladies génétiques. Le gène *EXOC6B* (EXOCyst complex Component 6B) situé en 2p13.2, a été identifié comme candidat de la DI lors du clonage moléculaire du point de cassure de la translocation réciproque t(2;8)(p13.2;q22.1) survenue *de novo* chez une fille présentant une DI, une épilepsie, des troubles autistiques, et des traits dysmorphiques mineurs (Frühmesser et al., 2013). Ce gène code un composant du complexe protéique important dans le transport vésiculaire à la membrane plasmique lors de l'exocytose, mécanisme important dans les processus de signalisation au niveau des terminaisons neuronales.



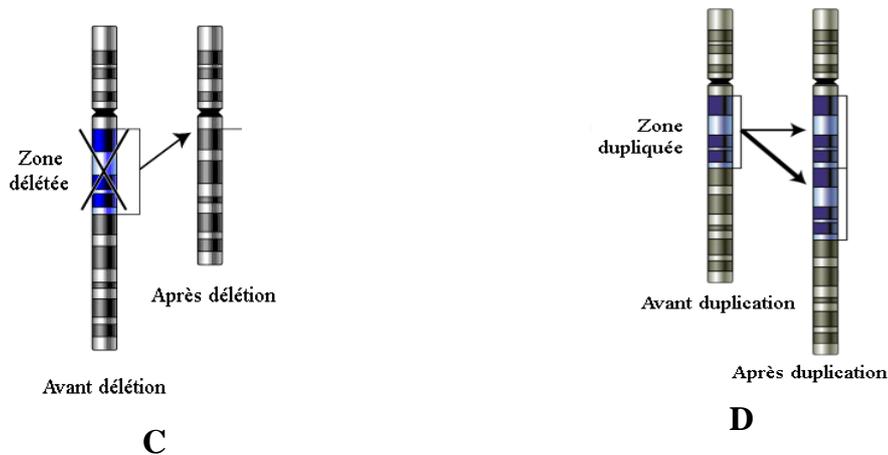


Figure 1 : Différents types d'anomalies chromosomiques de grande taille. A. Translocation chromosomique. B. Inversion chromosomique. C. Délétion. D. Duplication

Certaines anomalies chromosomiques sont d'emblée déséquilibrées, telles les délétions et les duplications chromosomiques (**Figure 1**). Ces anomalies visibles sur le caryotype conventionnel ou seulement en FISH emportent plusieurs Mb de matériel génétique et donc plusieurs gènes dont certains sont sensibles à l'*effet de dosage* et responsables du phénotype observé. C'est le cas du syndrome de Smith-Magenis, $\text{del}(17)(\text{p}11.3)$ dont le gène *RAI1* est sensible à l'*haploinsuffisance*. On identifie le terme de *syndrome des gènes contigus* lorsque le phénotype est la résultante du déséquilibre de plusieurs gènes. Le syndrome WAGR qui associe tumeur de Wilms, Aniridie, anomalie Génitale et Retard mental est du à la délétion 11p13 au sein de laquelle les gènes *WT1* et *PAX6* contribuent principalement au phénotype. Parfois, le mécanisme physiopathologique implique certaines régions chromosomiques soumises à *empreinte parentale* avec l'apparition d'un phénotype selon l'origine parentale du chromosome porteur de l'anomalie déséquilibrée. C'est le cas du syndrome d'Angelman, $\text{del}(15)(\text{q}11\text{q}13)$, apparaissant lorsque la délétion est survenue sur le chromosome 15 maternel. D'autres anomalies déséquilibrées aboutissent à un gain de matériel (trisomie partielle) ou une perte (délétion partielle) tels les chromosomes en anneaux, les chromosomes marqueurs surnuméraires et les isochromosomes.

Approximativement 15% des DI seraient attribuables aux anomalies cytogénétiques visibles sur le caryotype dont au moins 2/3 en rapport avec la trisomie 21 (Leonard et al, 2002). Les réarrangements de plus petite taille (inférieurs à 5 Mb) ne sont détectés que par des techniques

moléculaires telle *l'analyse chromosomique sur microréseau d'ADN (ACM) ou Hybridation génomique comparative sur microréseau (array-CGH)*. Cette technique consiste à co-hybridiser, en quantité identique, 2 types d'ADN marqués par un fluorochrome différent, l'ADN du patient et celui d'un témoin du même sexe, sur un support où sont déposées (microréseau) des sondes spécifiques d'une région donnée du génome. Plus le nombre de sondes est important et plus l'espacement entre les sondes est faible, plus la résolution de la technique est élevée. Ces approches, beaucoup plus résolutive (de quelques Mb jusqu'à quelques kb) ont conduit à identifier de nouveaux remaniements génomiques, infra-cytogénétiques (perte ou gain) appelées **CNV** ou variation du nombre de copie génomique. Les données de la littérature se sont accumulées ces dernières années pour confirmer l'association de ces CNV avec la DI et souvent identifiant de nouveaux syndromes appelés *troubles ou maladies génomiques* (Genomic disorders) (Kaminsky et al, 2011). Les estimations actuelles rapportent environ 15 à 20% des cas de DI qui seraient dus à ces CNV (Miller et al, 2010). Dans un certain nombre de cas, des gènes impliqués dans la DI ont pu être ainsi identifiés via leur localisation au sein de ces CNV, et cela en comparant différents patients porteurs d'un CNV identique en taille, ou proche chevauchant entre eux, afin de définir une région minimale remaniée contenant le meilleur gène candidat : par exemple la délétion del(2p23.1) et le gène *MBD5* (Talkowski et al, 2011 ; Bonnet et al, 2013), et la délétion del(17q21.31) et le gène *KANSL1* (Koolen et al, 2012). La confirmation du rôle de certains de ces gènes candidats a été par la suite obtenue, entre autres, chez des patients avec DI porteurs d'une mutation ponctuelle dans un de ces gènes, sans CNV de la région.

Les réarrangements chromosomiques observés au caryotype et les remaniements génomiques (CNV) ont aussi contribué par *effet de position* à identifier des mécanismes de dérégulation de l'expression génique et donc à l'identification potentielle de nouveaux gène candidats (**Tableau 1**). L'effet de position est défini comme une modification de l'expression d'un gène résultant d'un changement de la position de ce gène par rapport à son environnement chromosomique normal, ce changement d'expression n'étant pas associé à des mutations intragéniques ou à la délétion de ce gène. Trois catégories de facteurs déterminent une expression correcte des gènes (**Figure 2**) : (i) la région promotrice, site où la machinerie basale de transcription se fixe sur l'ADN afin d'initier la transcription. La séparation du gène de son promoteur peut conduire à une diminution de l'expression de ce gène, (ii) les éléments Enhancer

et Silencer, régions qui contiennent des sites de liaison pour les facteurs de transcription. Ces éléments ont une activité souvent spécifique de tissu et aident à assembler la machinerie de transcription sur la séquence promotrice du gène. La séparation du gène de ses éléments enhancer/silencer peut entraîner une sous-expression ou une surexpression de ce gène, respectivement, (iii) l'environnement chromatinien qui confère au gène et à ses éléments régulateurs un état plus ou moins accessible pour les interactions protéiques. Des réarrangements chromosomiques peuvent ainsi conduire à une altération de l'environnement du gène. La Variégation (PEV : Position Effect Variegation) en est un exemple traduisant l'extinction de l'expression d'un gène en raison de l'environnement chromatinien avec la juxtaposition avec une région d'hétérochromatine de l'expression de ces gènes.

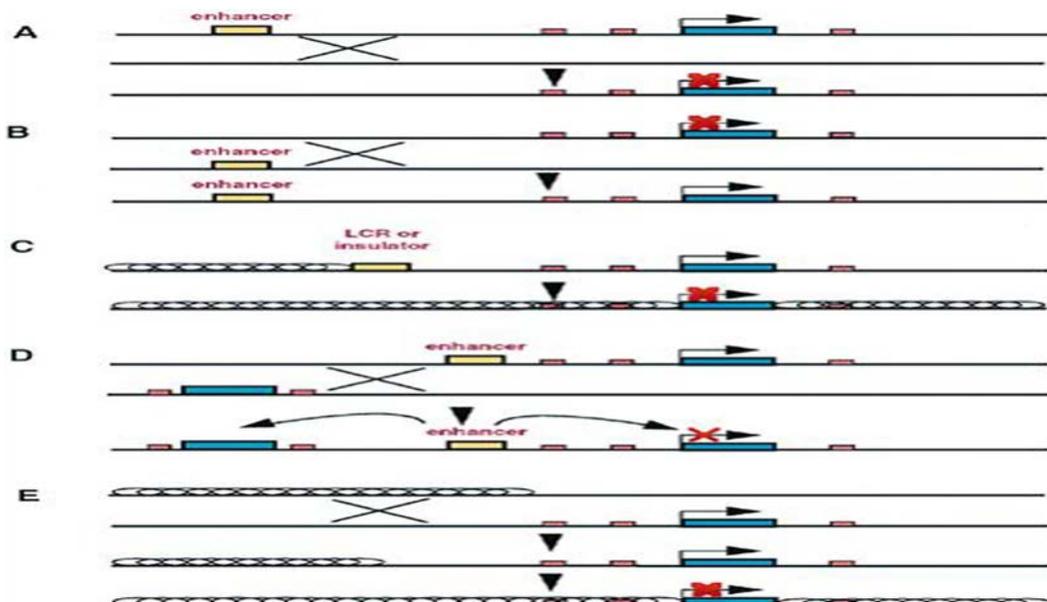


Figure 2 : Mécanismes pouvant conduire à un effet de position. **(A)** : un réarrangement chromosomique sépare le promoteur/l'unité de transcription (tête de flèche noire) d'un élément cis-régulateur distal. Ici la séparation d'un élément enhancer aboutira à une extinction de l'expression **(B)** : la juxtaposition d'un élément enhancer d'un autre gène auprès d'un gène peut conduire à une expression inappropriée de ce gène. **(C)** : la perte d'une borne d'isolement (Insulator) peut laisser s'étendre la conformation d'hétérochromatine conduisant à l'extinction du gène **(D)** Phénomène de compétition entre enhancers. Un gène localisé au niveau du site de translocation rivalise pour l'interaction avec les éléments régulateurs d'un autre gène **(E)** phénomène de Variégation mettant en contact une région d'hétérochromatine (pris et modifié Kleinjan J.D et al., 1998).

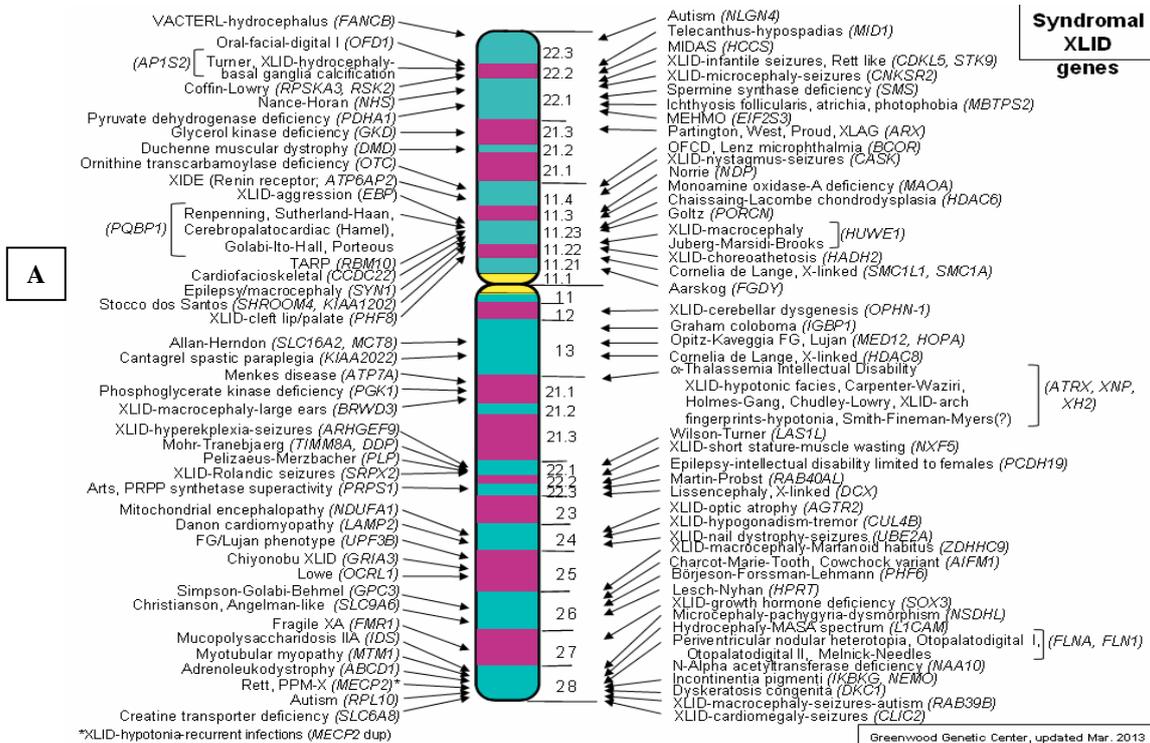
Gene	Chromosome	Phenotype	Regulation Element	Modification
APC	5q22.2	Adenomatous polyposis		Disruption
DLX5/DLX6/DSS 1	7q22	Split-Hand/Foot Malformation type I	5'/3'	Disruption
FOXC1	6p25	Primary Congenital Glaucoma	5'	Disruption
FOXC2	16q24.3	Lymphedema Distichiasis	3'	Disruption
FOXL2	3q23	Blepharophimosis Ptosis Epicanthus inversus Syndrome	5'/3'	Disruption/deletion
FOXP2	7q31	Speech and language disorder	3'	Disruption
GLI3	7p13	Greig Cephalopolysyndactyly syndrome	3'	Disruption
HBA	16p13.3	Alpha-Thalassemia	3'	Deletion
HBB	11p15.5	Gamma/Beta-Thalassemia	5'	Disruption/deletion
HOXB	17q21.3	Mental retardation, hexadactyly	5'	Disruption
HOXD	2q31	Limb malformations	5'/3'	Disruption
LCT	2q21	Adult-type hypolactasia	5'	Mutation
MAF	16q23	Cataract, anterior segment dysgenesis, microphthalmia	5'	Disruption
PAX6	11p13	Aniridia	3'	Disruption
PITX2	4q25	Rieger syndrome	5'	Disruption
PLP1	Xq22	Pelizaeus-Merzbacher syndrome/Spastic Paraplegia, neuropathy	5'/3'	Disruption/Duplication
POU3F4	Xq21.1	X-linked Deafness	5'	Deletion
REEP3	10q21.3	Autism	5'	Disruption
RUNX2	6p21	Cleido Cranial Dysplasia	5'	Disruption
SALL1	16q12.1	Townes-Brocks syndrome	3'	Disruption
SDC2	8q22	Autism, Multiple Exostoses	3'	Disruption
SHH	7q36	Holoprosencephaly	5'	Disruption
SHH	7q36	Pre-axial Polydactyly	5'	Disruption
SHOX	Xp22.3	Leri-Weill Dyschondrosteosis	3'	Deletion/Mutation
SIX3	2p21	Holoprosencephaly	5'	Disruption
SOST	17q21	Van Buchem disease	3'	Deletion
SOX3	Xq27.1	Hypoparathyroidism	3'	Disruption
SOX9	17q24.3	Campomelic Dysplasia/Pierre Robin Sequence	5'/3'	Disruption/deletion/mutation
SRY	Yp11.3	Sex Reversal	3'	Deletion
TGFB2	1q41	Peters anomaly	3'	Disruption
TRPS1	8q23.3	Ambras syndrome	3'/5'	Disruption/deletion
TWIST	7p21.1	Saethre-Chotzen syndrome	3'	Disruption

Tableau 1 : Revue de l'effet de position des gènes dans des maladies génétiques humaines pour lesquelles l'effet de position a été démontré (pris et modifié Schluth-Boland et al., 2011).

2. Déficience intellectuelle monogénique

2.1. Déficience intellectuelle liée à l'X

Le gène *FMR1* en Xq27.3 est le gène responsable du syndrome de l'X fragile et la cause la plus fréquente de DI héréditaire avec une incidence estimée de 1/5000 garçons (donc environ 0,5% de l'ensemble des DI) (Oberle et al, 1991; Bagni et al, 2012). Le gène *MECP2* en Xq28, impliqué dans le syndrome de Rett, a été démontré comme étant sensible au dosage génique, et outre la perte de fonction, la duplication du gène est responsable de DI chez le garçon (Ramocki et al, 2010). La déficience intellectuelle liée à l'X concerne environ 10% des déficiences intellectuelles et actuellement le nombre de gènes du chromosome X associés à la DI est >100 (Lubs et al, 2012 ; Greenwich Genetic Center, mis à jour Mars 2013 : <http://www.ggc.org>) (**Figure 3**). Si les résultats initiaux ont porté sur l'identification des gènes responsables de déficience intellectuelle syndromique (85 à ce jour), **les techniques de séquençage de nouvelle génération (séquençage haut débit de l'ensemble des séquences codantes des gènes ou exome)** contribuent à la découverte de nouveaux gènes et plus particulièrement dans les formes non syndromiques (Tarpey et al, 2009). Par exemple, le gène *ZNF674* a été identifié chez un patient déficient intellectuel avec une microdélétion génomique et une mutation non-sens retrouvée dans une autre famille présentant une déficience intellectuelle non-syndromique liée à l'X (Lugtenberg et al., 2006).



B

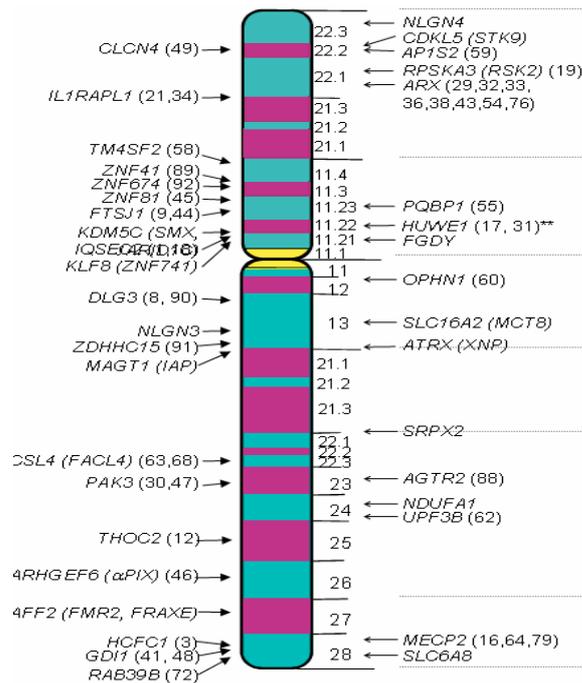


Figure 3 : Pictogramme du chromosome X avec en **A** les 85 gènes responsables de DI syndromique et en **B** les 39 gènes responsables de DI non syndromique (d'après Greenwich Genetic Center, mis à jour Mars 2013 : <http://www.ggc.org>)

2.2. Déficience intellectuelle autosomique

Jusqu'à l'utilisation des techniques de séquençage haut débit de l'exome, très peu de gènes autosomiques étaient connus comme responsables de DI. Il s'agissait de DI syndromique tels le syndrome d'Angelman (gène *UBE3A*), le syndrome de Rubinstein-Taybi (gène *CREBBP*), le syndrome de Smith-Magenis (gène *RAI1*), le syndrome de Mowat-Wilson (gène *ZEB2*) (Raymond et al, 2010). Comme signalé précédemment, l'analyse chromosomique sur microréseau d'ADN a aussi contribué, au travers d'une région critique minimale, à identifier un gène candidat, tel le syndrome CHARGE et le gène *CHD7* (Vissers et al., 2004). L'analyse par séquençage haut débit de l'exome de 10 individus avec une DI modérée à sévère, sans histoire familiale de DI, en utilisant *l'approche des trios* (comparaison de l'exome du cas probant à celui de ses parents) a permis à Vissers et al (2010) de démontrer l'impact des mutations *de novo*. Outre une mutation d'un gène connu de DI lié à l'X héritée de la mère, 9 mutations de novo ont été trouvées dont 2 pour des gènes connus de DI (un lié à l'X et un autosomique dominant). Pour les 7 autres, 4

intéressent des gènes ayant un rôle potentiel au cours du neurodéveloppement en tenant compte soit des interactions des protéines candidates avec des gènes connus du neurodéveloppement soit un modèle murin d'inactivation génique. Fait important, des études ultérieures ont conduit à reconnaître des mutations dans un de ces gènes, *DYNC1H*, chez des individus avec DI (Willensen et al, 2012). Une autre grande étude d'exome de trios à partir de 100 individus avec un QI<50 a révélé 70 mutations *de novo* chez 53 des 100 patients. Dix variants autosomiques et 3 liés à l'X ont été observés dans des gènes déjà connus de la DI. Pour 22 patients, une mutation potentiellement causale a été identifiée dans de nouveaux gènes candidats. Ces données concluaient à un taux diagnostique de 16% de l'analyse par séquençage haut débit de l'exome dans la DI avec essentiellement des mutations *de novo* (de Ligt et al, 2012).

La stratégie d'identification des causes monogéniques de **DI autosomique récessive** a utilisé la cartographie par autozygotie dans des familles avec unions consanguines et plusieurs individus atteints de DI. Au sein de ces familles, les analyses de liaison génétiques ont isolé au préalable des intervalles génomiques et la recherche de mutation dans les gènes candidats a largement bénéficié des outils de séquençage haut débit. Une étude portant sur 136 familles a permis de trouver des mutations homozygotes dans 23 gènes connus pour être associés à la DI ou des troubles neurodéveloppementaux (Najmabadi et al, 2011). Par ailleurs, des mutations ont été observées dans 50 nouveaux gènes candidats dont certains ont des fonctions spécifiques cérébrales et/ou des interactions avec d'autres gènes connus de la DI. Ces gènes candidats nécessitent une validation de leur rôle causal sur d'autres familles et par des études fonctionnelles. Un des principaux freins repose sur le fait que, le plus souvent, ces DI prises isolement dans leur étiologie sont des affections extrêmement rares et la recherche d'une récurrence de l'altération de ces gènes dans d'autres familles reste un défi majeur qui pourra sans doute, dans les années à venir, être résolu par la mise en place du séquençage haut débit dans un contexte diagnostique. Ces avancées technologiques laissent à penser aussi que le nombre de gènes de la DI serait de 1500 à 2000 (Von Bokhoven, 2011).

V. Fonctions des gènes de la déficience intellectuelle

En dépit de l'importante hétérogénéité génétique de la déficience intellectuelle, il est observé tant sur des tissus cérébraux post mortem ou issus de biopsies chirurgicales, des altérations de l'*arborisation des dendrites* et de la *structure des épines dendritiques*, et bien souvent sans

anomalie cérébrale morphologique apparente. Plusieurs mécanismes différents impliquant les gènes de la DI peuvent conduire à modifier *la plasticité synaptique* et donc affecter les fonctions cognitives. Les réseaux moléculaires au sein desquels agissent les gènes de la DI peuvent être ceux des voies présynaptiques, des complexes protéiques post synaptiques, de la dynamique du cytosquelette, des voies de la transduction intracellulaire du signal, les voies de la régulation de la transcription et celles de la modulation épigénétique de la structure de la chromatine (**Figure 4**).

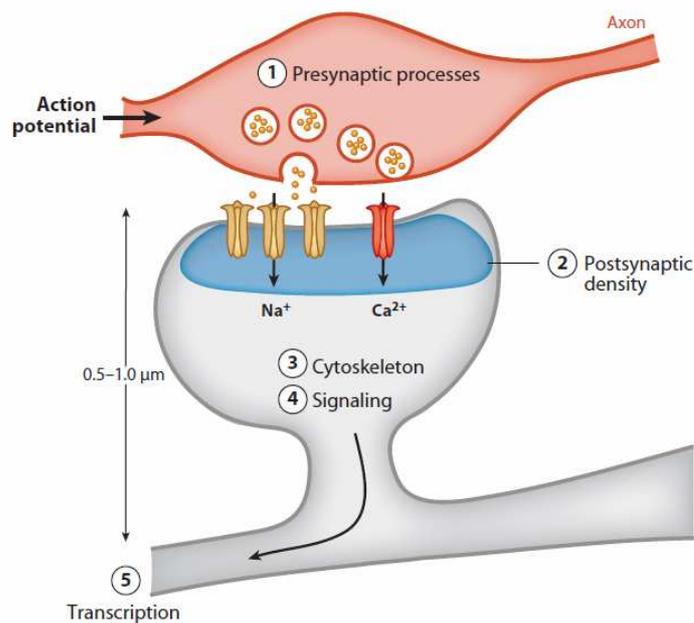


Figure 4 : Principales voies d'action des protéines impliquées dans la DI. Représentation d'une synapse reliant l'axone d'un neurone présynaptique à l'épine dendritique d'un neurone postsynaptique. **1** Sous l'effet de la stimulation, les vésicules contenant les neurotransmetteurs se rassemblent au niveau de la membrane et libèrent les neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Les récepteurs des neurotransmetteurs de la membrane postsynaptique vont s'activer, libérant un second messager et dans le compartiment postsynaptique (PSD) l'ouverture des canaux ioniques et la génération d'un potentiel postsynaptique. **2** L'activation des récepteurs initie tout un ensemble de signalisation dont la traduction locale de protéines. D'autres événements impliqués dans la plasticité synaptique et la formation de la mémoire surviennent : **3** la réorganisation du cytosquelette, **4** l'activation des voies de signalisation, **5** avec une action sur le contrôle de l'expression des gènes (d'après van Bokhoven, 2011)

1. Gènes impliqués dans la mise en circulation des vésicules pré synaptiques

La mise en cycle dans l'espace pré synaptique des vésicules aboutit à la libération des neurotransmetteurs dans la fente synaptique, précédée d'une série d'étapes complexes pour l'empaquetage des neurotransmetteurs dans les vésicules et le ciblage de ces vésicules à la membrane.

Gene	Function ^a	Locus	Disease	OMIM ^b	Remarks
Presynaptic proteins					
CASK	Protein kinase	Xp11.4	ID, microcephaly, cerebellar hypoplasia	300749	Pre- and postsynaptic roles
			FG syndrome 4	300422	
			XLID	300749	
CDH15	Cell adhesion		ADID	612580	Further validation required
GDI1	RAB GDI	Xq28	NS XLID	300104	
IL1RAPL1	receptor	Xp21.3	NS XLID	300143	
NRXN1	Cell adhesion	2p16.3	Pitt-Hopkins-like syndrome 2	600565	Ligand for neuroligins
OPHN1	RHO GAP	Xq12	XLID, cerebellar hypoplasia	300486	Rho GTPase signaling
PRSS12	protease	4q26	ARID, MRT1	249500	Neurotrypsin
RAB39B	RAB GTPase	Xq28	XLID, ASD, seizures	300271	
RAB3GAP1	RAB3 GAP	2q21.3	Warburg-Micro syndrome	600118	
STXBP1	Vesicle docking	9q34.11	Severe ID, epilepsy (Ohtahara syndrome)	612164	Syntaxin binding protein, Mun18-1
SYN1	phosphoprotein	Xp11.23	XLID, epilepsy	300491	Associated with synaptic vesicles

(van Bokhoven, *Annu. Rev. Genet.*, 2011)

2. Gènes impliqués dans l'organisation du compartiment postsynaptique

Les neurones glutaminergiques excitateurs de l'hippocampe participent au premier chef dans la formation de mémoire et toute altération de la voie de cette signalisation peut contribuer à la DI. Il existe 2 types de récepteur glutaminergique au niveau des épines dendritiques postsynaptiques, NMDA (N-Methyl-D-Aspartate) et AMPA (2-Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazole Propionic-Acid). Certains gènes de la DI participent à la transmission de ces voies de signalisation.

Gene	Function ^a	Locus	Disease	OMIM ^b	Remarks
Proteins of the postsynaptic density (PSD)					
CASK	Protein kinase	Xp11.4	ID, microcephaly, cerebellar hypoplasia	300749	Pre- and postsynaptic roles
			FG syndrome 4	300422	
			XLID	300749	
CNTNAP2	Cell adhesion	7q36.1	Pitt-Hopkins-like syndrome 1	610042	Ligand for contactins
			Cortical Dysplasia, focal epilepsy	610042	
			ASD susceptibility, AUTS15	612100	
DLG3	scaffold	Xq13.1	Gilles de la Tourette	-	Synapse-associated protein SAP102
			XLID	300189	
GRIA3	AMPA	Xq25	XLID	300699	Subunit GLUR3
GRIN2A	NMDAR	16p13	ID, epilepsy, encephalopathy	138253	Subunit NR2A
GRIN2B	NMDAR	12p13.1	ID, epilepsy	138252	Subunit NR2B
NLGN3	Cell surface	Xq13.1	Asperger syndrome	300425	NRXN ligand
NLGN4	Cell surface		XLID, ASD	300427	NRXN ligand
SHANK2	Scaffold	11q13	ASD and ID	613436	
SHANK3	Scaffold	22q13	ASD, ID (Phelan-McDermid syndrome)	606232	Prosap2

(van Bokhoven, *Annu. Rev. Genet.*, 2011)

Le compartiment post synaptique (PSD: Post synaptic Density) est composé d'un réseau de protéines connectées au cytosquelette d'actine. Le protéome du PSD comprend plus de 1500 protéines dont au moins 133 sont impliquées dans la DI. Le niveau de ces protéines est soumis à une régulation dont l'altération contribue à la DI. La protéine FMRP codée par le gène FMR1 est une protéine se liant à l'ARN qui s'associe avec le complexe DICER-microARN pour réguler la traduction locale des ARN messagers cibles. Le turnover des protéines est soumis au système de protéolyse du protéasome via l'Ubiquitine. Ces deux grands mécanismes participent à la régulation du niveau des protéines du PSD.

Gene	Function ^a	Locus	Disease SCZ	OMIM ^b	Remarks
Regulation of PSD protein levels					
<i>CUL4B</i>	Ubiquitin ligase	Xq24	XLID, short stature, hypogonadism	300354	targets include histones
<i>FMR1</i>	RNA-binding	Xq27.3	Fragile X syndrome	300624	Local synaptic translation
<i>HUWE1</i>	Ubiquitination	Xp11.22	XLID Turner type	300706	Ubiquitination of histones and other proteins
<i>UBE2A</i>	Ubiquitin ligase	Xq24	XLID	-	Required for DNA repair
<i>UBE3A</i>	Ubiquitin ligase	15q11-q13	Angelman syndrome	601623	Maternally Imprinted in brain
<i>UBR1</i>	Ubiquitin ligase	15q15.2	Johanson-Blizzard syndrome	243800	

(van Bokhoven, *Annu. Rev. Genet.*, 2011)

3. Gènes impliqués dans la dynamique du cytosquelette

La dynamique du cytosquelette avec notamment la polymérisation/dépolymérisation des filaments d'actine est sous le contrôle de gènes dont l'altération est à l'origine de la DI.

Gene	Function ^a	Locus	Disease	OMIM ^b	Remarks
Cytoskeleton dynamics					
<i>AP1S2</i>	Adaptor protein	Xp22.2	XLID, hydrocephaly and calcification of basal ganglia	300630	Vesicle endocytosis
<i>ARHGEF6</i>	RHO GEF	Xq26.3	NS XLID	300436	Encodes alpha-PIX
<i>ARHGEF9</i>	RHO GEF	Xq11	XLID, epileptic encephalopathy	300607	Encodes Collybistin
<i>FGD1</i>	RHO GEF	Xp11.22	Aarskog-Scott Syndrome	305400	
<i>IQSEQ2</i>	ARF GEF	Xp11.22	XLID	309530	Vesicle endocytosis
<i>LIMK1</i>	Kinase	7q11.23	In deletion Williams-Beuren syndr.	194050	Downstream of Rho signalling
<i>MEGAP</i>	RAC GAP	3p25.3	Translocation and deletions in 3p- syndrome	606525	
<i>OCRL1</i>	RHO GAP	Xq25-q26.1	Lowé syndrome	309000	Protein is a phosphatidylinositol polyphosphate 5-phosphatase
<i>OPHN1</i>	RHO GAP	Xq12	XLID, cerebellar hypoplasia	300486	Rho GTPase signaling
<i>PAK3</i>	Kinase	Xq23	XLID	300558	Effector of RAC and CDC42

(van Bokhoven, *Annu. Rev. Genet.*, 2011)

4. Gènes impliqués dans la cascade de signalisation intracellulaire

L'activation des récepteurs glutaminergiques conduit à toute une cascade de processus de signalisation intra cellulaire telles les voie Ras et PI3K-mTOR.

Gene	Function ^a	Locus	Disease	OMIM ^b	Remarks
Cellular signaling					
<i>BRAF</i>	Kinase	7q34	Cardiofaciocutaneous syndrome Noonan syndrome 7 LEOPARD syndrome	115150 613706 613707	RAS/MAPK/ERK pathway
<i>HRAS</i>	RAS GTPase	11p15.5	Costello syndrome	218040	RAS/MAPK/ERK pathway
<i>KRAS</i>	RAS GTPase	12p12.1	Noonan syndrome 3 Cardiofaciocutaneous syndrome	609942 115150	RAS/MAPK/ERK pathway
<i>MEK1</i>	Kinase	15q21	Cardiofaciocutaneous syndrome	115150	RAS/MAPK/ERK pathway
<i>MEK2</i>	Kinase	19p13.3	Cardiofaciocutaneous syndrome	115150	RAS/MAPK/ERK pathway
<i>NF1</i>	RAS-GAP	17q11.2	Neurofibromatosis type I	162200	RAS/MAPK/ERK pathway
<i>PTEN</i>	phosphatase	9p13.3	Cowden disease Lhermitte-Duclos disease Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome	158350 158350 153480	PI3K/AKT/mTOR pathway
<i>RAF1</i>	Kinase	3p25	Noonan syndrome 5 LEOPARD syndrome 2	611553 611554	RAS/MAPK/ERK pathway
<i>RPS6KA3</i>	Kinase	Xp22	Coffin-Lowry syndrome	303600	RSK2, RAS/MAPK/ERK pathway
<i>SHOC2</i>	Scaffold	10q25.2	Noonan syndrome-like	607721	RAS/MAPK/ERK pathway
<i>SHP2</i>	phosphatase	12q24.1	Noonan syndrome 1 LEOPARD syndrome	163950 151100	PTPN11, RAS/MAPK/ERK pathway
<i>SPRED1</i>	Regulatory	15q13.2	Legius syndrome	611431	RAS/MAPK/ERK pathway
<i>SOS1</i>	RAS GEF	2p22-p21	Noonan syndrome 4	610733	RAS/MAPK/ERK pathway
<i>TSC1</i>	Regulatory	9q34.13	Tuberous sclerosis 1	191100	PI3K/AKT/mTOR pathway
<i>TSC2</i>	Regulatory	16p13.3	Tuberous sclerosis 2	613254	PI3K/AKT/mTOR pathway

(van Bokhoven, *Annu. Rev. Genet.*, 2011)

5. Gènes impliqués dans la régulation épigénétique de la transcription

La modulation de la structure chromatinienne ou régulation épigénétique implique la modification covalente de l'ADN de type méthylation et les modifications post traductionnelle des protéines histones de type acétylation, méthylation, phosphorylation, ubiquitination, sumoylation, ADP ribosylation. Ces modifications déterminent l'accessibilité de l'ADN à la machinerie de transcription et donc l'expression des gènes cibles. L'acquisition de la mémoire à long terme repose sur la régulation de la transcription et de la traduction. Les inhibiteurs de la traduction et de la transcription affectent la plasticité synaptique et la mémoire (Davis et al, 1984). Plusieurs gènes impliqués dans la DI ont un rôle direct dans la régulation de la structure chromatinienne.

Gene	Function ^a	Locus	Disease	OMIM ^b	Remarks
Epigenetic writers: genes encoding proteins with enzymatic properties in chromatin remodeling					
<i>CREBBP</i>	HAT	16p13	Rubinstein-Taybi syndrome	180849	
<i>DNMT3B</i>	DNMT	20q11	ICF syndrome	242860	
<i>EHMT1</i>	HMT	9q34	9q subtelomeric deletion syndrome	610253	H3K9me2/3
<i>EP300</i>	HAT	22q13	Rubinstein-Taybi syndrome 2	602700	
<i>HDAC4</i>	HDAC	2q37.3	Brachydactyly ID syndrome	600430	
<i>HUWE1</i>	Ubiquitination	Xp11.22	XLID Turner type	300706	Ubiqu. of histones and other proteins
<i>JARID1C</i>	HDM	Xp11	Syndromic XLID	300534	
<i>MLL2</i>	HMT	12q13.12	Kabuki syndrome	147920	H3K4
<i>MYST4</i>	HAT	10q22.2	Noonan-like phenotype		Controls RAS pathway genes
<i>NSD1</i>	HMT	5q35	Sotos syndrome Weaver syndrome	117550 277590	H3K36
Epigenetic readers and maintenance: genes encoding proteins which indirectly modulate the chromatin structure					
<i>ATRX</i>	Helicase	Xq13	α -thalassaemia ID syndrome ID-hypotonic facies syndrome (MRXHF1)	301040 309580	
<i>BCOR</i>	CR	Xp11.4	OFCD syndrome	300166	
<i>CDK8</i>	kinase	13q12.13	Syndromic ID		Mediator complex protein
<i>CUL4B</i>	Ubiquitin ligase	Xq24	XLID, short stature, hypogonadism	300354	targets include histones
<i>CDKL5</i>	Kinase	Xp22	Infantile Spasm syndrome X-linked	300672	Retts-like syndrome
<i>BRWD3</i>	CB	Xq13	XLID and macrocephaly	300659	
<i>CHD7</i>	HB	8q12	CHARGE syndrome	214800	
Gene	Function ^a	Locus	Disease	OMIM ^b	Remarks
<i>DYRK1a</i>	Kinase	21q22.1	Down syndrome ID + primary microcephaly	190685	Contributes to ID in DS Intragenic deletions
<i>MECP2</i>	MDB	Xq28	Retts syndrome Angelman syndrome NS XLID	312750 105830 -	<i>MECP2</i> duplications
<i>MED12</i>	TR	Xq13	FG/Opitz-Kaveggia Syndrome Lujan-Fryns Syndrome Risk factor for SCZ and psychosis	305450 309520 -	Mediator complex protein
<i>MED17</i>	TR	11q21	Recessive ID, spasticity, seizures	-	Mediator complex protein
<i>MED23</i>	TR	6q23.2	ARID	-	Mediator complex protein
<i>PHF6</i>	TR	Xq26	Borjeson-Forssmann-Lehman syndrome	301900	
<i>PHF8</i>	TR	Xp11.2	XLID + cleft palate	300560	
<i>RAI1</i>	TR	17p11.2	Smith-Magenis syndrome	182290	
<i>RPS6KA3</i>	Kinase	Xp22	Coffin-Lowry syndrome	303600	RSK2
<i>SETBP1</i>	Unknown	18q12.3	Schinzel-Giedion syndrome	269150	
<i>TCF4</i>	TR	18q21.2	Pitt-Hopkins syndrome Associated with bipolar affective disorder	610954 125480	Associated with REST and SMARCA2 complexes
<i>YY1</i>	TR	14q32.2	ID, growth retardation	-	
<i>ZNF41</i>	DB	Xp11.3	NS-XLID	314995	
<i>ZNF81</i>	DB	Xp11.23	NS-XLID	314998	Disrupted by translocation (X;9) also involving <i>EHMT1</i>
<i>ZNF674</i>	DB	Xp11.3	NS-XLID	300573	
<i>ZNF711</i>	DB	Xq21	NS-XLID	300803	

^aCB: chromatin Binding CR: co-repressor; DB: DNA binding protein; DNMT: DNA methyltransferase; GAP: GTPases-activating protein; GDI: guanine-nucleotide-dissociation-inhibitor of small GTPases; GEF: guanine-nucleotide-exchange factor of small GTPases; HAT: histone acetyltransferase; HB: histone binding protein; HDAC: histone deacetylase; HDM: histone demethylase; HMT: histone methyltransferase; MDB: methyl DNA-binding protein; TR: transcription regulation; Ubi: E3 ubiquitin ligase.

^bOMIM: identifier in Online Mendelian Inheritance in Man (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim>).

(van Bokhoven, *Annu. Rev. Genet.*, 2011)

VI. Continuum étiologique entre DI et autres phénotypes neurodéveloppementaux

Il y a une grande variabilité phénotypique chez les individus avec DI, non seulement au niveau du QI mais aussi celui des autres manifestations neuro-comportementales. Environ 28% des

personnes avec une DI auraient des critères diagnostiques en faveur d'un autisme (Bryson et al, 2008). Réciproquement, une fraction encore plus élevée d'individus avec un autisme a une DI associée (Fombonne et al, 2003). Il est démontré que certains des CNV et des gènes associés à la DI sont retrouvés altérés chez d'autres patients avec des troubles psychiatriques tels la schizophrénie, la psychose bipolaire, l'hyperactivité avec troubles de l'attention (Mefford et al, 2012 ; Walsh et al, 2008 ; Malhotra et al, 2012). Les bases d'une telle variabilité ne sont pas actuellement connues mais le rôle du fond génétique avec des allèles modificateurs, des mutations somatiques, des modifications épigénétiques, des facteurs environnementaux voire des événements stochastiques au cours de développement pourrait intervenir.

VII. Déficience intellectuelle : quel mode d'hérédité ?

Il existe un paradoxe entre la prévalence relativement élevée de la DI et le désavantage reproductif des individus atteints de DI. Un mode d'hérédité autosomique récessif de la DI conduirait au maintien de cette prévalence de par une fréquence significative d'allèles délétères à l'état hétérozygote chez les personnes asymptomatiques. Toutefois pour les sociétés occidentales, et selon les données les plus récentes de séquençage haut débit il n'apparaît pas, sur les séries analysées, un taux significatif de cause de DI autosomiques récessives (Vissers et al, 2010 ; de Ligt et al, 2012). Une autre explication serait plutôt qu'un grand nombre de cas de DI répondrait à des néomutations dominantes (Lupski JR, 2010; Robinson PN, 2010 ; Huang K, 2011 ; Need et al, 2012). Si la majorité des analyses a porté jusqu'alors sur les DI modérées à sévères (QI<50) essentiellement sporadiques, les DI légères à modérées s'observent plus souvent dans un contexte familial. Si l'on considère que l'intelligence est un trait continu (comme la taille, la pression artérielle) et que les formes légères de DI représentent l'extrémité la plus basse du spectre du QI, une influence multifactorielle/polygénique est alors évoquée. L'expressivité et la pénétrance de certains phénotypes neuro-développementaux, tels ceux liés à la microdélétion 16p12.1 seraient affectés par la présence d'autres CNV, dont la co-occurrence répondrait au modèle du double « hit » (Girirajan et al, 2010). Le modèle d'hérédité non mendélien, avec une pénétrance réduite, souvent observé dans ces familles, reposerait sur plusieurs allèles de susceptibilité, chacun responsable d'un effet faible mais cumulatif. Toutefois la dichotomie entre affection monogénique et affection polygénique doit tenir compte du concept de gènes modificateurs. Un modèle de mutations rares et récentes (de novo) dans un des nombreux gènes de la DI aurait sa

place (Mitchell KJ, 2012) et un ou des allèles modificateurs affecteraient la pénétrance et l'expressivité de la DI (Badano et al, 2002). Les gènes modificateurs candidats sont nombreux : les gènes connus ou candidats récemment identifiés de la DI, les réseaux de protéines partenaires interagissant avec le produit de ces derniers. L'identification de ces allèles nécessitera l'analyse par séquençage à grande échelle des membres des familles au sein desquelles existe ces DI, combinée à une expertise clinique pour bien appréhender les phénotypes associés.

VIII. Mécanismes des réarrangements génomiques dans les troubles génomiques

Les outils d'exploration du génome ont conduit à identifier ces dernières années des réarrangements génomiques, larges délétions, duplications, inversions, comme une cause fréquente de la DI (Mefford et al, 2012; Pfundt et al, 2012). Le séquençage des points de cassure de ces remaniements a permis de révéler que l'architecture de notre génome, avec des régions répétées non codantes, contribue largement à la survenue de ces réarrangements. Trois mécanismes de recombinaison sont principalement reconnus: la recombinaison homologue non allélique (NAHR : Non Allelic Homologous Recombination), la jonction d'extrémités non homologues (NHEJ : Non Homologous End Joining) et un remaniement basée sur la réplication (FoSTeS: Fork Stalling ans Template switching).

1. Recombinaison Homologue Non Allélique (NAHR)

La NAHR survient lors de la méiose ou de la mitose et la recombinaison peut être inter chromosomique ou inter chromatidienne ou intra chromatidienne. La recombinaison et les conséquences de cette recombinaison vont dépendre des séquences répétées qui servent de substrat à ces réarrangements : LCR (Low Copy Repeat) ou duplicons avec en particulier leur taille, leur % d'homologie et leur orientation (directe ou inverse) (**Figure 5**).

Un exemple de NAHR est celui concernant la duplication de la région comprenant le gène *PMP22* responsable de la maladie Charcot Marie Tooth type 1A (CMT1A) et la délétion en miroir de cette même région responsable de la neuropathie héréditaire avec hypersensibilité à la pression (HNPP). Les études ont déterminé les deux LCR(s) CMT1A-REPs, localisés en 17p11.2-p12, véritables points chauds de recombinaison à l'origine de la récurrence précise de ce

type de remaniement génomique entre les différents patients atteints de ces affections. Il existe aussi des remaniements non récurrents dont la taille et la localisation varient d'un individu à un autre. Des séquences répétées ayant un haut degré d'homologie (les éléments Alu et LINE par exemple) peuvent induire certaines recombinaisons homologues non alléliques rares, responsables de certains remaniements non-récurrents.

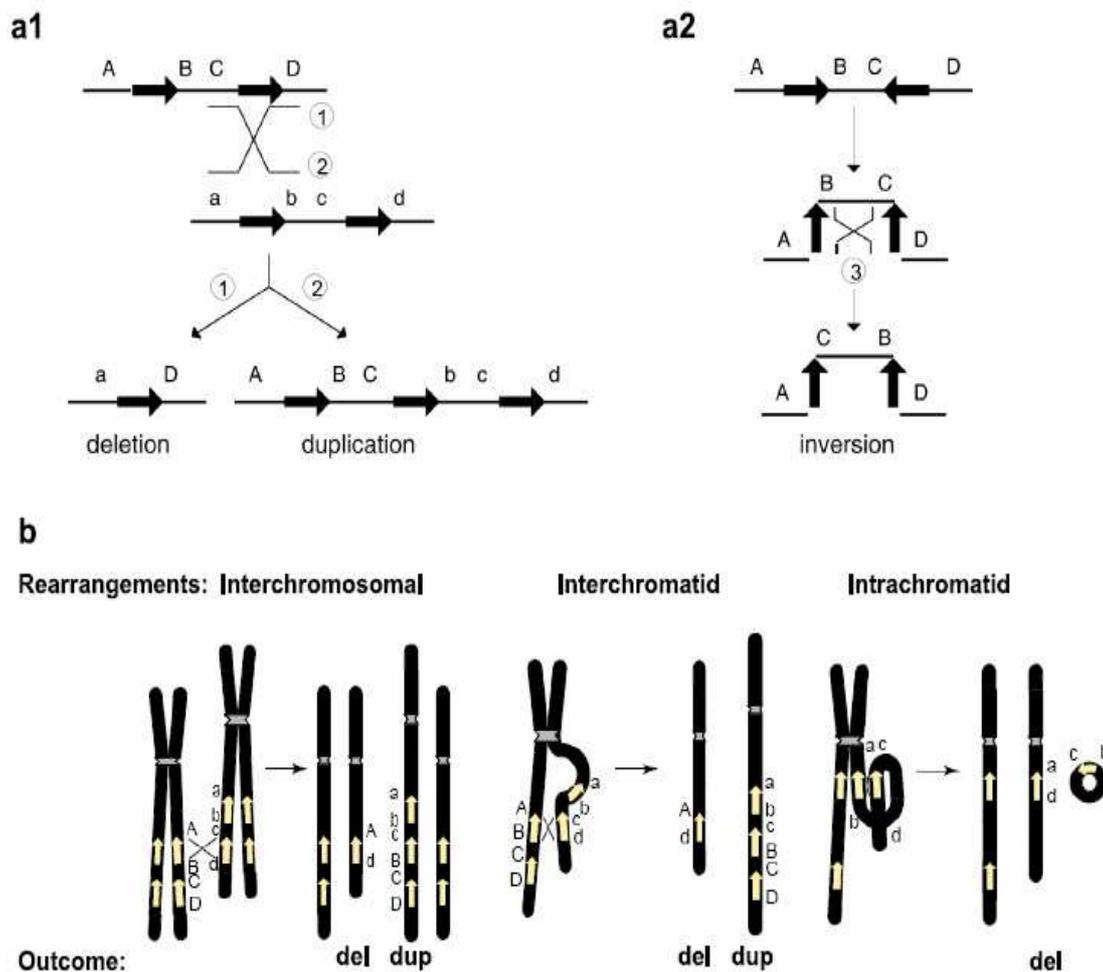


Figure 5 : Mécanisme de NAHR: a1. NAHR entre les 2 LCR(s) de même orientation entraîne une délétion/duplication. a2. NAHR entre les 2 LCR(s) avec orientation inversée donne une inversion du gène. b. De gauche à droite, une NAHR interchromosomique ou interchromatidienne (intrachromosomique) entraîne une délétion/duplication tandis qu'une NAHR intrachromatidienne ne donne qu'une délétion (pris et modifié Gu et al., 2008)

2. Ligature d'extrémités d'ADN non homologues (Non Homologous End Joining ou NHEJ)

La majorité des remaniements non-récurrents sont expliqués grâce aux modèles de jonction d'extrémités non homologues (non homologous end joining ou NHEJ), qui est un mécanisme de réparation des cassures d'ADN double-brin qui ne nécessite que de très courtes séquences de microhomologie. L'analyse de la séquence des jonctions révèle une homologie minimale (1 à 5 nucléotides d'homologie dans 60% des jonctions non homologues) où le duplex d'ADN est rejoint (**Figure 6**).

3. Fork Stalling and Template Switching (FoSTeS)

Le mécanisme de FoSTeS ou interruption de la fourche de réplication et commutation de la matrice est différent de la recombinaison homologue non-allélique et de la jonction d'extrémités non homologues, car basé sur la réplication qui ne nécessite pas forcément la survenue d'une cassure double brin. Ce mécanisme est responsable de réarrangements complexes du génome. Dans la fourche de réplication, le brin retardé se désengage de la matrice d'origine et va chercher une séquence de microhomologie complémentaire avec son extrémité 3'. Ce brin retardé va ensuite s'hybrider avec la séquence de microhomologie complémentaire dans une autre fourche de réplication et la synthèse d'ADN va commencer. Cette deuxième de fourche de réplication peut ne pas siéger proche de la première fourche mais plus éloigné dans le génome. C'est pourquoi, ce phénomène d'appariement d'ADN anormal peut conduire à des rémanement complexes (**Figure 6**).

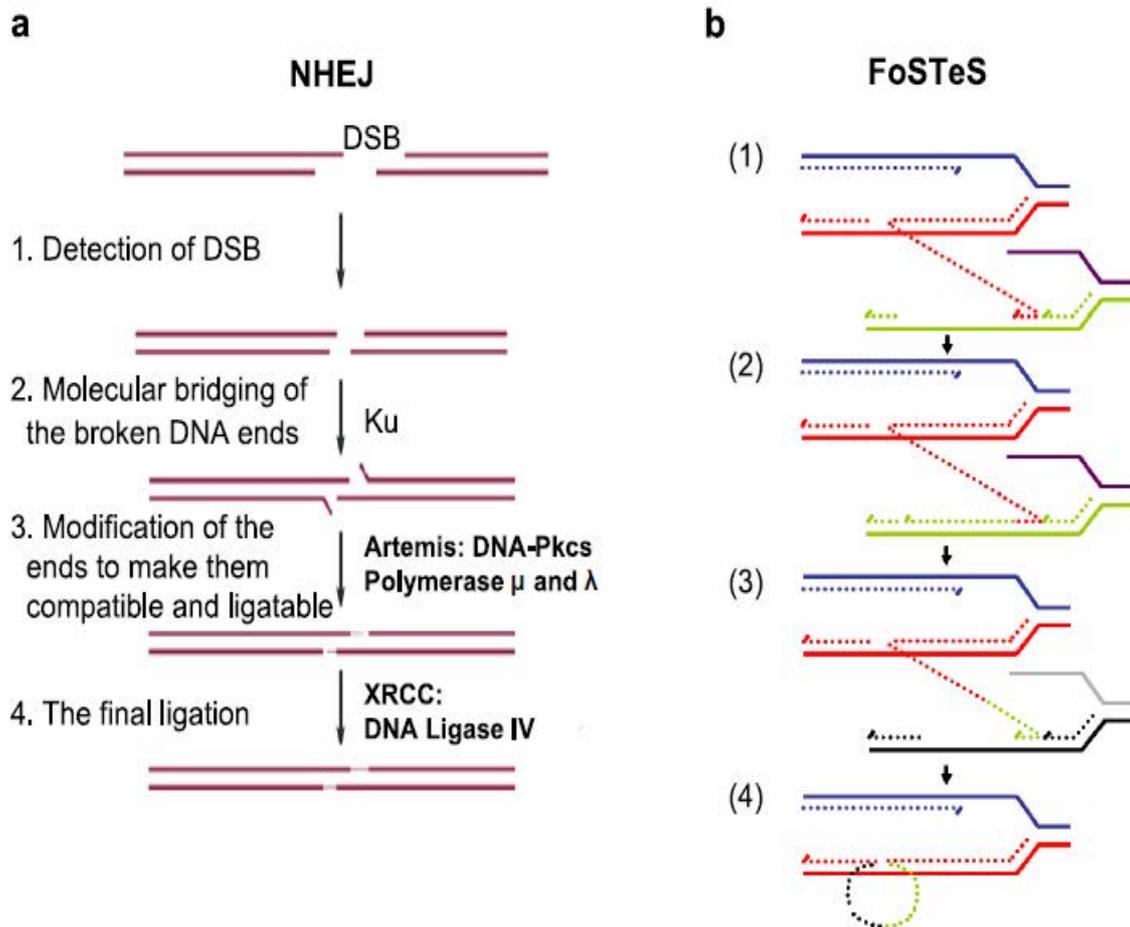


Figure 6 : Mécanismes NHEJ et FoSTeS **a.** Mécanisme NHEJ avec la réparation des cassures double brin de l'ADN: 1. Détection des cassures, 2. Phénomène "molecular bridging" des cassures double-brin des extrémités de l'ADN. 3. Modification des extrémités afin de leur donner une structure compatible et ligaturable. 4. La ligation par la ligase IV. **b.** Mécanisme FoSTeS: 1. Après l'installation de la fourche de réplication, le brin retardé (lagging strand) (rouge, ligne solide) se désengage et s'hybride à la seconde fourche de réplication (violet et vert, solide ligne) via homologie. 2. Extension de la synthèse de l'ADN dans la seconde fourche. 3. Après la fourche se désengage, ce brin va envahir la troisième fourche de réplication (gris et noir). Une série des fourches de réplication qui se désengagent et l'envahissement du brin retardé peuvent se produire plusieurs fois (e.g. FoSTeS x2, FoSTeS x 3,...etc) 4. avant la reprise de la réplication sur la matrice d'origine (Gu et al., 2008).

MATERIEL ET METHODES

I- Patients

L'inclusion de patients ayant une DI repose sur l'expertise du Centre de référence Maladies Rares « anomalies du développement » au CHU de Nancy. S'agissant de l'Analyse Chromosomique sur microréseau d'ADN de haute résolution 1M ciblée sur les gènes de la DI, 46 patients ont été inclus pour lesquels l'ensemble des données cliniques, et paracliniques (imagerie, examen génétique, métabolique) n'a pas conduit à retenir un diagnostic étiologique. Les principales caractéristiques cliniques de ces patients sont résumées dans le tableau de l'**annexe 1**. La DI est modérée à sévère le plus souvent isolée sans signes spécifiques associés parfois il existe des signes de type épilepsie, troubles envahissant du développement, une dysmorphie cranio-faciale non spécifique à ce jour. Ces 46 patients ont tous bénéficié, d'un caryotype lymphocytaire (550 bandes) et d'une ACM avec une puce 180K Agilent[®] sans révéler de CNV pathogènes au seuil de résolution de cette puce. L'ADN de ces 46 patients ainsi que de leurs parents est disponible compte tenu de la réalisation préalable d'une première analyse en ACM. Les parents ont donné leur consentement pour cette analyse génétique qui rentre dans le cadre de la poursuite de l'identification diagnostique de la cause de la DI.

A l'occasion de l'identification d'un gène candidat, nous avons été amenés à solliciter une collaboration nationale pour recruter une cohorte de patients présentant un phénotype clinique et neuroradiologique proche du patient ayant un CNV interrompant le gène *KIAA1468*. Nous sommes très reconnaissants aux médecins généticiens et neuropédiatres des CHU d'Angers, de Dijon et de Lille qui ont contribué à ce travail.

II- Méthodes

1. Prélèvement du sang et extraction de l'ADN à partir des lymphocytes sanguins

Le sang est prélevé dans des tubes EDTA et conservé rapidement à 4°C en attendant les extractions. En général, 2 ml de sang sont extraits avec des kits Qiagen[®] en respectant les instructions fournies par le fournisseur. D'abord, 200 µl de protéase sont ajoutées dans un tube de 1,5 ml contenant de 1-2 ml de sang puis 2,4 ml de tampon AL sont ensuite ajoutés et bien mélangés par retournement et par vortex. Les tubes sont incubés 10 minutes à 70°C. Après incubation, le tube est rempli avec 2 ml d'éthanol. Une centrifugation 3000 rpm de 3 minutes est

réalisée. Le mélange est traité avec le tampon AW1 et AW2. À la suite, 350 µl de tampon AE sont ajoutés à la membrane suivie d'une incubation de 5 minutes afin de récupérer l'ADN. Finalement, la concentration des ADN extraits est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop (ND-1000 UV-VIS Spectrophotometre, Labtech) afin de déterminer la quantité et la qualité d'ADN extrait (**Tableau 2**).

Paramètres	Ratio	Qualité d'ADN extrait
A260/A280	1.8 - 2.0	Absence de contamination par des protéines.
A260/A230	> 2.0	Pureté d'ADN génomique extrait (absence de contamination par des composés organiques tel que les carbohydrates, le guanidinium isothiocyanate, l'alcool et le phénol...)
Quantité d'ADN extrait	Concentration d'ADN	Quantité d'ADN nécessaire pour l'analyse cytogénétique en microréseau
	> 150 ng/µl	1 - 3µg d'ADN

Tableau 2 : Paramètres importants pour évaluer la qualité et la quantité de l'ADN extrait.

2. Analyse chromosomique sur microréseau d'ADN

Cette technique permet de mettre en évidence des microremaniements chromosomiques cryptiques (microdélétions et/ou microduplications). La technique consiste en plusieurs étapes : le contrôle de la qualité de l'ADN du patient, la digestion enzymatique, le marquage de l'ADN du patient et du témoin avec la Cyanine 5 et la Cyanine 3 respectivement, la purification des produits de marquage, l'hybridation des échantillons, le lavage des lames, l'analyse sur scanner et l'acquisition des données par le logiciel Agilent Scan Control v.2.0 et l'analyse des données par le logiciel Agilent Cytogenomics v.2.0.

2.1. Contrôle de la qualité d'ADN : deux cents ng d'ADN sont utilisés pour le contrôle de la qualité. Les 5µl d'échantillon sont déposés sur un gel d'agarose à 0,8% dans tampon TBE 1x (tampon Tris-Acétate-EDTA ou Tris-borate-EDTA), la migration des échantillons s'effectue à 130 volts pendant 30 minutes avec le marqueur de taille λ *Hind III* (ADN de phage *lambda* digéré

par *EcoRI* et *HindIII* : Promega®). L'ADN est de bonne qualité lorsqu'il existe une seule bande intacte et spécifique sur le gel (**Figure 7**).

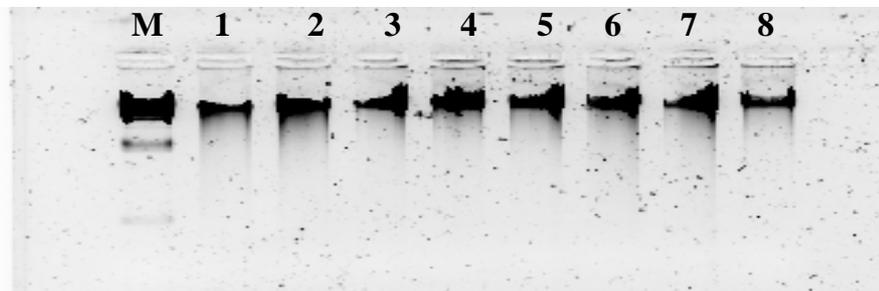


Figure 7 : Contrôle de la qualité d'ADN sur gel d'agarose à 0,8%. M : Marqueur de taille λ *Hind III*, 1-8 : Patient 1 à 8

2.2. Digestion de l'ADN par l'enzyme de restriction *AluI* et *RsaI*

Trois μg d'ADN sont digérés par les enzymes de restriction *AluI* et *RsaI* afin de générer des fragments dont la taille est entre 200-500 pb. D'abord, il faut préparer un mélange de réactifs comprenant l'eau nucléase free, le tampon C 10X, la BSA acétylée (Albumine de sérum bovin) (10 mg/ml) et les enzymes de digestion *AluI* et *RsaI*. Le mix réactionnel est incubé à 37°C pendant 2h. Ensuite, 2 μl des produits digérés sont contrôlés sur un gel d'agarose à 2% avec le marqueur de taille de 100 pb DNA Ladders afin de vérifier l'efficacité de la digestion avant de commencer l'étape de marquage (**Figure 8**).

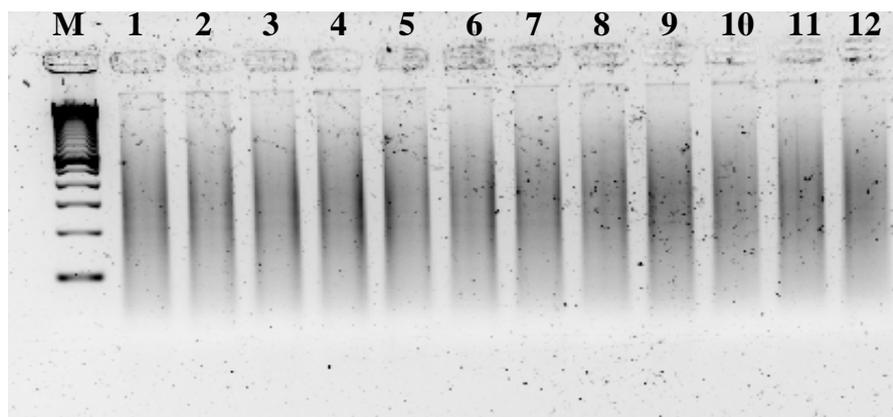


Figure 8 : Contrôle de l'ADN après l'étape de digestion avec *AluI* et *RsaI*. M : Marqueur de taille 100 bp, 1-3-5-7-9-11 : ADN des patients après digestion. 2-4-6-8-10-12 : ADN des témoins après digestion.

2.3. Marquage des produits digérés

Les produits digérés sont rapidement marqués avec les Cyanine 5 et Cyanine 3. En principe, l'ADN du patient est marqué avec la Cyanine 5 qui émet un signal fluorescent en couleur rouge et l'ADN du témoin de même sexe marqué avec la Cyanine 3, la Cyanine 3 va donner le signal vert après excitation photonique à une longueur d'onde appropriée. Pour le marquage, le mélange réactionnel est préparé tout d'abord selon le protocole du fournisseur. Le mélange réactionnel se compose de Cyanine (Cyanine 5 ou Cyanine 3) et la polymérase (fragment de Klenow). Finalement, les produits sont incubés à 37°C pendant 4 heures au bain marie. A la fin de cette étape, la solution de Stop Buffer est rajoutée pour arrêter la réaction.

2.4. Purification des produits marqués

Les produits marqués sont rapidement purifiés selon les instructions du fournisseur. Brièvement, les produits marqués sont déposés sur les colonnes de purification et ces colonnes sont ensuite mises sur les tubes de collection. Ensuite, les produits marqués sont lavés par 181 µl de la solution de Buffer PB puis 495,5 µl de la solution de Buffer PE ou washing Buffer (tampon de lavage). Finalement les produits sont traités par 80 µl de la solution de Buffer EB (tampon d'élution). Les produits purifiés sont dosés à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop (ND-1000 UV-VIS spectrophotometre) pour vérifier la quantité des produits marqués avant de commencer l'étape d'hybridation (**Tableau 3**).

Quantité d'ADN génomique au départ (µg)	Rendement (µg)	Activité spécifique d'échantillon marqué à la cyanine 3 (pmol/µg)	Activité spécifique d'échantillon marqué à la cyanine 5 (pmol/µg)
0.5	5 à 7	25 à 40	20 à 35
3.0	7 à 10	35 à 55	25 à 40

Tableau 3 : Rendement attendu et activité spécifique après marquage et purification

2.5. Hybridation des produits purifiés

Les produits purifiés sont cohybridés sur la lame de l'analyse chromosomique sur microréseau d'ADN. D'abord, les produits marqués sont mélangés dans un même tube d'ependorf. Ensuite, la préparation de la solution d'hybridation est constituée d'ADN cot-1, d'agent bloquant et du tampon d'hybridation. À la fin, ce mélange est bien distribué dans chaque tube. Les tubes sont incubés à 95°C pendant 3 minutes et à 37°C pendant 30 minutes. Après 30 minutes d'incubation, nous préparons une chambre d'hybridation et les ADN patient et témoin sont rapidement cohybridés sur la lame. Les lames sont hybridées à 65°C pendant 40 heures dans le four.

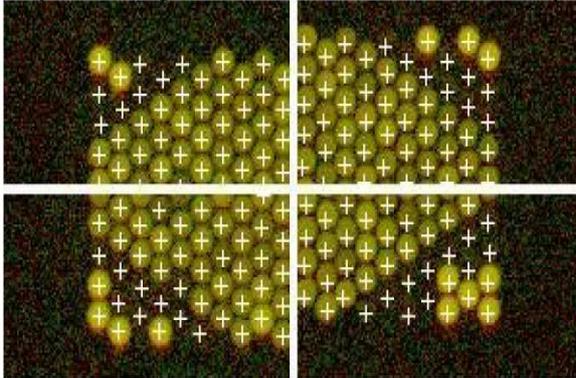
2.6. Lavage des lames

Les lames hybridées sont lavées pendant 5 minutes dans le tampon de lavage WS1 (Washing buffer 1) et pendant 1 minute dans le tampon de lavage WS2 (Washing buffer 2). Les lames sont ensuite laissées sécher à la température ambiante puis elles sont placées sur les slide-holders et transférées rapidement dans le scanner. Finalement, les lames sont scanées au logiciel Agilent Scan Control, la résolution du scanner est de 3 micron-double passage, le scanner va lire les codes barres des lames et il va scanner toutes les lames contenues dans le carrousel.

2.7. Analyse des données

Les données de l'analyse chromosomique sur microréseau d'ADN sont analysées par le logiciel cytogenomics v.2.0. A la fin du processus d'analyse avec le logiciel Agilent Cytogenomics v.2.0, nous obtenons un rapport de qualité des lames (QC-report) (**Figure 9**) et des intervalles génomiques en déséquilibre. Le QC report permet d'analyser les différents paramètres de l'ACM : le rapport signal sur le bruit de fond, l'intensité des signaux fluorescents vert et rouge, la DLRSpread, le rapport bruit de fond/signal vert et le rapport bruit de fond/signal rouge et la reproductibilité. En principe, chaque signal correspond à une sonde sur la lame, les spots ayant une déviation de $\log_2\text{ratio}$ à -1 correspondent à une délétion et ceux avec un $\log_2\text{ratio}$ à +0.58 correspondent à un gain. Le $\log_2\text{ratio}$ est calculé à partir de l'équation : $\log_2\text{ratio} = \text{nombre de copies chez le patient} / \text{nombre de copies chez le témoin} = \text{intensité de la Cya5} / \text{intensité de la Cya3}$.

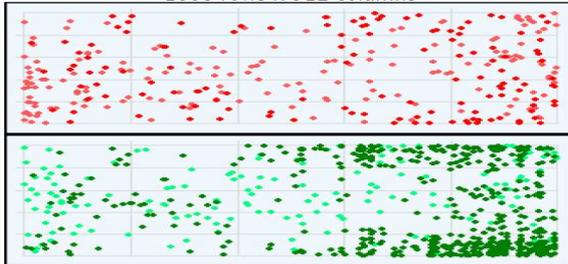
Spot Finding of the Four Corners of the Array



Grid Normal

Outlier Numbers with Spatial Distribution

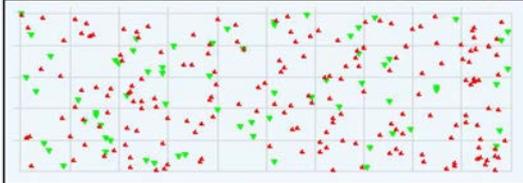
1068 rows x 912 columns



● Red FeaturePopulation ● Red Feature NonUniform
● Green FeaturePopulation ● Green Feature NonUniform

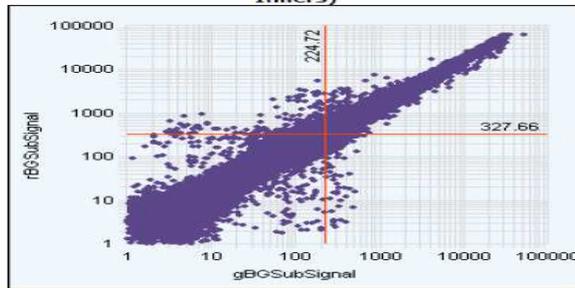
Feature	Red	Green	Any	% Outlier
Non Uniform	136	641	668	0.07
Population	175	167	290	0.03

Spatial Distribution of the Positive and Negative LogRatios



#Positive:9097 (Red) #Negative:3200 (Green)

Red and Green Background Corrected Signals (Non-Cont Inliers)



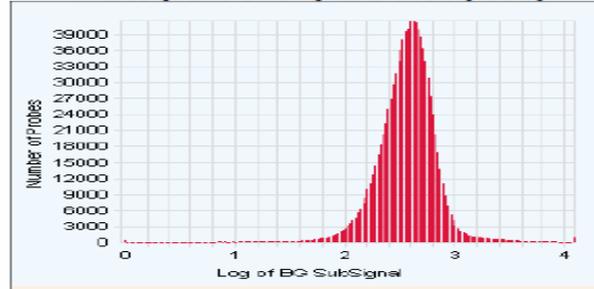
Features (NonCtrl) with BGSubSignals < 0: 1539 (Red); 898 (Green)

Evaluation Metrics for CGH_QCMT_Sep09 :

Excellent (7) ; Good (4)

Metric Name	Value	Excellent	Good	Evaluate
IsGoodGrid	1.00	>1	NA	<1
AnyColorPrntFeatNonUn...	0.07	<1	1 to 5	>5
DerivativeLR_Spread	0.18	<0.20	0.20 to 0.30	>0.30
gRepro	0.14	0 to 0.05	0.05 to 0.20	<0 or >0.20
g_BGNoise	2.60	<5	5 to 10	>10
g_Signal2Noise	86.39	>100	30 to 100	<30
g_SignalIntensity	224.72	>150	50 to 150	<50
rRepro	0.13	0 to 0.05	0.05 to 0.20	<0 or >0.20
r_BGNoise	3.96	<5	5 to 10	>10
r_Signal2Noise	82.85	>100	30 to 100	<30
r_SignalIntensity	327.66	>150	50 to 150	<50

Histogram of Signals Plot (Red)



Histogram of Signals Plot (Green)

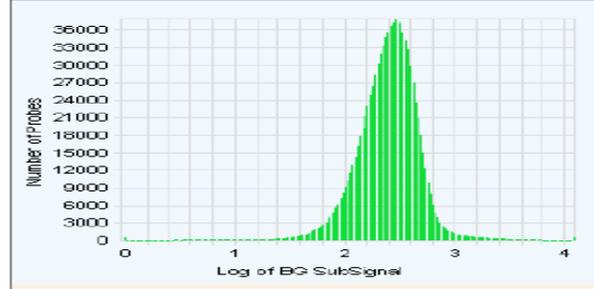


Figure 9 : Rapport de contrôle qualité avec les différents paramètres permettant d'analyser la qualité de la lame d'ACM-1M-DIS

2.8. Différents types de microréseau d'ADN utilisés

2.8.1 Analyse chromosomique sur microréseau d'ADN 180K (Agilent®): l'intervalle génomique moyen entre les sondes est de 5,3 kb et l'intervalle moyen est de 4.6 kb dans les séquences de référence du gène.

2.8.2 Analyse chromosomique sur microréseau d'ADN 1M (Agilent®): il s'agit d'un microréseau d'ADN fait à façon par la compagnie Agilent® et constitué de 1 million d'oligonucléotides. Deux versions comprenant pour l'une 322 gènes candidats de déficience intellectuelle (**version 1 : annexe 2**) et pour l'autre 435 gènes candidats de déficience intellectuelle (**version 2 : annexe 3**). Les gènes de la DI étudiés correspondent aux données de la littérature au moment de la conception de la puce : gènes de DI liée au chromosome X, gènes de DI de transmission autosomique dominante ou récessive, gènes candidats identifiés récemment par la technologie de séquençage haut-débit, gènes candidats identifiés par l'analyse de point de cassure chromosomique (inversion, translocation) pour lesquels souvent une récurrence d'altération n'a pu être obtenue, gènes candidats situés dans la région critique de troubles génomiques (Genomic disorders), gènes appartenant à des familles de gènes impliquée dans la DI (exemple : récepteurs au glutamate).

Nous avons choisi au total **974.016** oligonucléotides pour le design de l'analyse chromosomique sur microréseau d'ADN 1M v.1.0. D'abord, **401.060** oligonucléotides couvrent en pangénomique avec un intervalle moyen de **5.3 kb** entre les oligonucléotides, l'intervalle génomique moyen est de 4.6 kb dans les séquences de référence du gène. En plus, les 322 gènes candidats de DI sont inclus dans les régions génomiques de haute densité d'oligonucléotides dont **82.717 oligonucléotides** sont répartis dans *les exons* de 322 gènes candidats et **195.475 oligonucléotides** sont distribués dans *les régions introniques* (**Figure 10**). En outre, **271.591 sondes oligonucléotidiques** sont dispersées dans les *régions intergénomiques* d'une taille moyenne de 120 Mb (*soit 1 oligo/445 pb*).

La qualité de l'analyse chromosomique sur microréseau d'ADN 1M v.1.0 est assurée par **6.685 oligonucléotides de contrôle**, la normalisation s'effectue avec **11.488 oligonucléotides**. Finalement, **5000 oligonucléotides** sont utilisés pour les répliqués.

Le design d'ACM-1M-DIS v.2.0 s'est fait avec **974.016** oligonucléotides. Nous avons utilisé **398.152 oligonucléotides** pour la région **400K pangénomique**. En plus, les 435 gènes candidats

sont recouverts dans les régions de très haute densité des oligonucléotides avec **115.420 oligonucléotides** dans *les exons* et **252.153 oligonucléotides** dans *les introns* des 435 gènes candidats. Par ailleurs, **185.118 oligonucléotides** sont utilisés pour *les régions en amont et en aval* des 435 gènes candidats. Finalement, la qualité d'ACM-1M-DIS v.2.0 est assurée par **6.685 oligonucléotides de contrôle**, la normalisation avec **11.488 oligonucléotides** et les répliquats avec **5.000 oligonucléotides**.

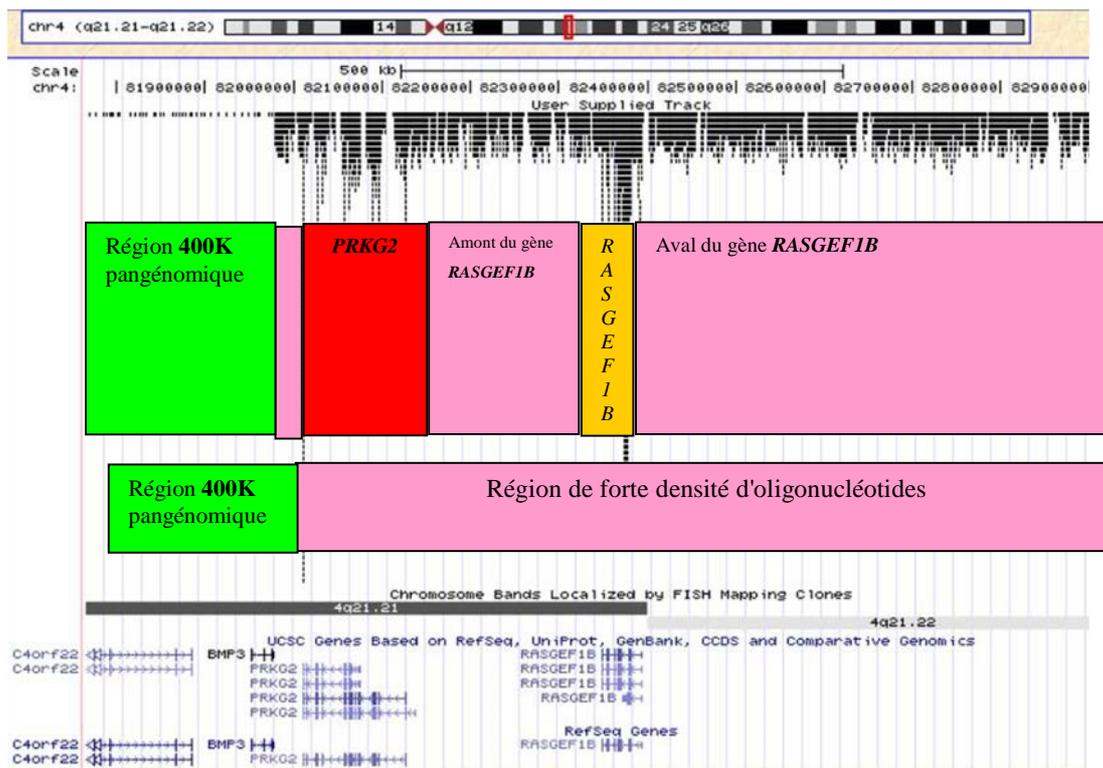


Figure 10 : Exemple du Design de la puce 1M sur une région génomique : En vert, la région de 400K pangénomique avec d'une faible densité d'oligonucléotides en vert, les 2 gènes *PRKG2* et *RASGEF1B* sont localisés dans les régions de haute densité d'oligonucléotides (le gène *PRKG2* est en rouge et le gène *RASGEF1B* est en orange). Les régions en amont et en aval des gènes candidats sont inclus dans les régions de forte densité d'oligonucléotides (en couleur rose)

3. PCR quantitative (Real-Time PCR ou PCR en temps réel)

La technique de PCR en temps réel permet de mesurer le nombre de copies à un locus donné. Il y a deux types de quantification : quantification absolue (nombre de copies ou quantité d'ADN µg/µl) ou quantification relative (unités arbitraires). La technique de PCR en temps réel se

compose de plusieurs étapes : le choix des amorces, le test de l'efficacité des amorces et l'utilisation des amorces spécifiques pour confirmer l'anomalie identifiée par l'ACM et connaître le mécanisme de survenue, *de novo* ou hérité.

3.1. Choix des amorces

Les amorces sont désignées par le logiciel Primer Express v.2.0 (Applied Biosystem) en fonction de plusieurs paramètres : la longueur, la température de fusion, le pourcentage en GC, la stabilité de l'extrémité 3' prime des amorces, le nombre de nucléotides répétés en 3' prime, la structure secondaire. La spécificité des amorces est vérifiée sur le site UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?command=start>). En plus, la vérification des SNP au niveau de leurs sites de fixation est faite sur le site SNP Check v.3.0 (<https://ngri.manchester.ac.uk/SNPCheckV3/snpcheck.htm>).

3.2. Tester l'efficacité des amorces

Les amorces choisies sont testées avec les différentes concentrations décroissantes d'ADN : 20ng/μl, 10ng/μl, 2ng/μl, 0,2ng/μl et 0,02ng/μl afin d'assurer l'efficacité pour la réaction de PCR. La performance des amorces est sélectionnée en fonction de trois facteurs principaux :

Tableau 4 : Evaluation de la performance de la PCR en temps réel (guide manuel Applied Biosystem®)		
Facteurs	Recommandations	Critères
Efficacité	La dilution de la série avec 5 log	La pente < -3,3
		$R^2 > 0,99$
Précision	3 réplicats au minimum	Déviations standard < 0,167
Sensibilité	Grand nombre de réplicats des réactions ayant un faible nombre de copies au départ dus à la distribution de Poisson	Analyse par des tests statistiques

La PCR en temps réel est réalisée avec le SYBR Green® et l'intensité du signal fluorescent correspond à la quantité de produit de PCR chaque cycle. Le SYBR® Green est une molécule fluorescente qui se lie à l'ADN double brin et émet alors un signal fluorescent lorsqu'il est excité

par des UV, ce qui permet la détection et la quantification des produits amplifiés. Chaque réaction de PCR contient un contrôle négatif (l'eau stérile) et la PCR est effectuée dans les mêmes conditions de température : une étape initiale 2 minutes à 50°C, une dénaturation 10 minutes à 95°C et ensuite 40 cycles 15 secondes à 95°C, une étape d'extension 60 secondes à 60°C. Finalement, les résultats sont analysés en utilisant le logiciel ABI 7500 Fast real-time PCR Software v.1.3.1 (Applied Biosystems). Chaque amorce est testée en triple. Les résultats de chaque membre de la famille sont donc normalisés et comparés avec un témoin.

La PCR en temps réel nécessite toujours un contrôle endogène. Nous utilisons le gène *RPPHI* (ribonuclease P RNA component H1) dont les amorces sélectionnées sont:

Amorce sens de *RPPHI*: GCC-GGA-RCT-TGG-AAC-AGA

Amorce anti-sens de *RPPHI*: ACC-TCA-CCT-CAG-CCA-TTG-AAC-T

Les termes et les paramètres sont utilisés en PCR en temps réel

- La ligne de base (Baseline): les cycles initiaux où il y a de petit changement dans l'intensité du signal fluorescent.
- La seuil : le paramètre est réglé de façon automatique ou manuelle et ce paramètre est utilisé pour déterminer le cycle de seuil (Ct : Threshold Cycle).
- Le cycle de seuil : le nombre de cycles à partir duquel le signal fluorescent devient significatif.
- Référence passif : c'est la molécule fluorescente qui donne la fluorescence de référence interne en comparaison avec le signal fluorescent du reporter. Ce signal peut être normalisé lors de l'analyse des résultats. La normalisation est nécessaire afin de corriger les fluctuations causées par le changement de la concentration ou du volume. Un Rox colorant passif est inclus dans tous les kits de la PCR quantitative.
- Le blanc : l'échantillon ne contient pas d'ADN afin de vérifier la qualité d'amplification.

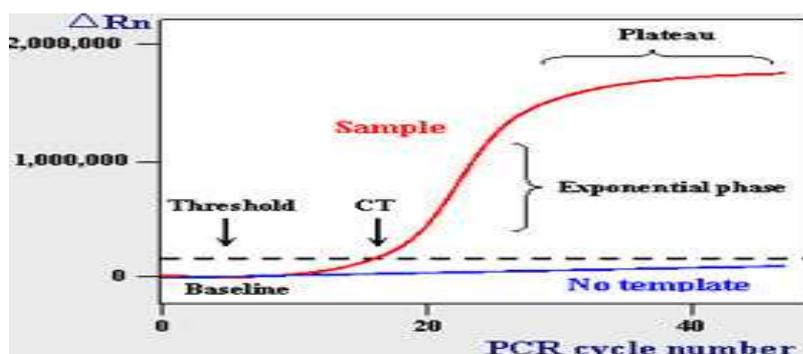


Figure 11 : Principe de la PCR en temps réel

Réactifs	Concentration initiale (Ci)	Concentration finale (Cf)
Master Mix	2X	1X
Amorces	10 μ M	0,4 μ M

Le volume final de la réaction est de 15 μ l de volume de Master Mix et 5 μ l d'ADN à concentration 2ng/ μ l.

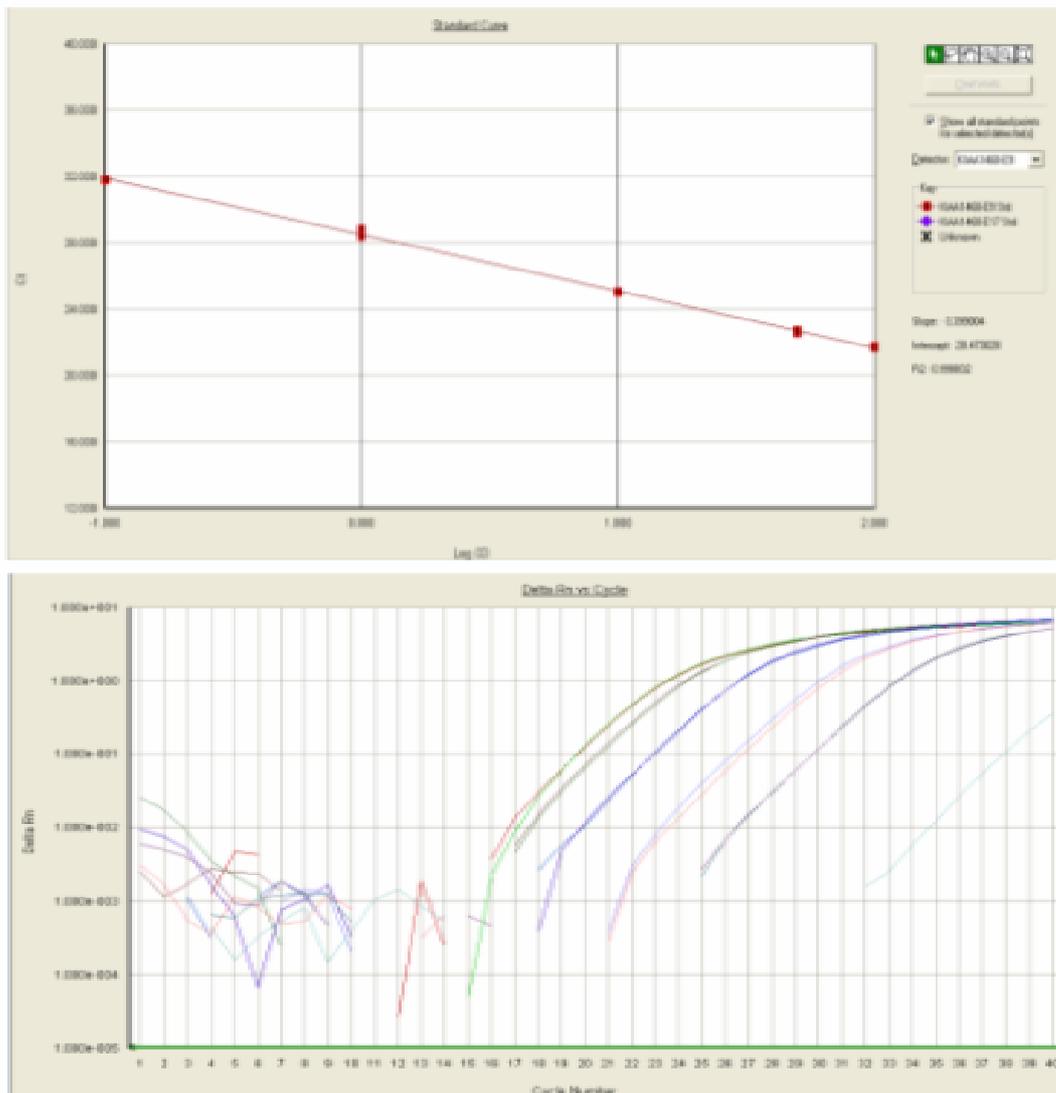


Figure 12 : Exemple de contrôle de l'efficacité des amorces pour la PCR en temps réel avec la dilution de la série avec 5 log, la pente est de -3,4 correspondant à une efficacité de 95% selon le formule de calcul $E = 10^{[-1/la\ pente]}$ (Pfaffl, 2001).

3.3 Analyse des résultats de la PCR quantitative par la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak Méthode) (Livak et al., 2001)

L'équation décrit une amplification exponentielle de la réaction PCR :

$$X_n = X_0 \times (1+Ex)^n$$

X_n : Nombre de molécules cibles à cycle n

X_0 : Nombre de molécules cibles initiales

Ex: Efficacité d'amplification

n: Nombre de cycles

Le Ct (threshold cycle): le nombre de cycles à partir du quel le signal fluorescent devient significatif

$$Ct \text{ du gène cible} = X_0 \times (1+E_X)^{Ct,x} = K_X$$

Ct,x est le Ct pour l'amplification du gène cible

K_X est un constant

Nous avons la même équation pour le contrôle endogène

$$Ct \text{ de l'endogène} = R_0 \times (1+E_R)^{Ct,R} = K_R$$

La normalisation entre le Ct du gène cible et le Ct du contrôle endogène

$\frac{Ct \text{ du gène cible}}{Ct \text{ de l'endogène}} = \frac{X_0 \times (1+E_X)^{Ct,x}}{R_0 \times (1+E_0)^{Ct,R}} = \frac{K_X}{K_R}$

Si l'efficacité de la réaction est similaire entre le gène cible et l'endogène, nous avons donc $E = E_X = E_R$, et l'équation devient:

$\frac{X_0}{R_0} \times (1+E)^{CtX - CtR} = K$
--

La normalisation de la quantité d'ADN au début entre le gène cible et l'endogène X_N et ΔCt est la différence entre Ct du gène cible et Ct de l'endogène, nous avons l'équation suivante :

$$X_N \times (1+E)^{\Delta Ct} = K \text{ ou } X_N = K \times (1+E)^{-\Delta Ct}$$

La dernière étape, c'est la normalisation de l'échantillon de référence et du témoin

$$\frac{X_N \text{ référence}}{X_N \text{ témoin}} = \frac{K \times (1+E)^{-\Delta Ct, \text{ référence}}}{K \times (1+E)^{-\Delta Ct, \text{ témoin}}} = (1+E)^{-\Delta \Delta Ct}$$

Si l'efficacité de la réaction de PCR est 100%, nous avons $E = 1$, et $1+E = 2^{-\Delta \Delta Ct}$

3.4. Amorces spécifiques des gènes utilisées pour la PCR en temps réel

3.4.1. PCR en temps réel du gène *RUNX1T1*

L'ADN est extrait à partir des prélèvements sanguins effectués sur des membres de la famille de la patiente avec consentement éclairé. Tous les échantillons ont été analysés en triple, le dosage de chaque amplicon par rapport au contrôle endogène *RPPH1* et la normalisation avec l'ADN contrôle sont déterminés par la méthode $2^{-\Delta \Delta Ct}$ [Yuan et al., 2008].

Amorce des exons du gène <i>RUNX1T1</i> NM_175634.2	Séquence d'amorce sens	Séquence d'amorce anti-sens
2	CTGGGCTGGTGAACA TAATCTCT	CCAATCGCTCTGCTAATTTCT
3	CGTACTGAGAAGCA CTCCACAATG	GGAGTCAGCCTAGATTGCGT CTT
7	CCTTTGCACTCAGAA CATCCAA	CGCTGGCCTGGGCTAAT

3.4.2. PCR en temps réel du gène *ZEB2*

Les amorces spécifiques du gène *ZEB2* sont utilisées pour étudier la délétion du gène *ZEB2* identifiée sur l'analyse chromosomique sur microréseau d'ADN 1M.

Amorce du gène <i>ZEB2</i> <i>NM_014795.3</i>	Séquence d'amorce sens	Séquence d'amorce anti-sens
Intron 04	GGAAGAAGGCCCGGA AAC	GCAATTTGCATTCTTCACTGA AA
Intron 09	CCTAGCCCATCTCCAA TTCTTCT	CCCGATCCAGGGCTAATAGA G

3.4.3. PCR en temps réel du gène *ANKRD11*

Les amorces spécifiques du gène *ANKRD11* sont utilisées pour étudier la délétion du gène *ANKRD11* identifiée sur l'analyse chromosomique sur microréseau d'ADN 180K.

Amorce du gène <i>ANKRD11</i> <i>NM_013275.5</i>	Séquence d'amorce sens	Séquence d'amorce anti-sens
Exon 2	GGACACACCTCCATTG GATTAA	ACCGATTCCATAGCTGAAAG TCA
Région 16q24	GCCTCGATTCAGTGAG TCTTTTTT	CAGAGCTGGAAACTGCTGGA A

3.4.4. PCR en temps réel du gène *FABP7*

Amorce du gène <i>FABP7</i> <i>NM_001446.3</i>	Séquence d'amorce sens	Séquence d'amorce anti-sens
Intron 5 <i>PKIB</i>	AAATTCCTGCTTTACA GCCTCACT	GCAGCACAGCCAAAACCTTTC T
Intron 7 <i>SMPDL3A</i>	AAGTTCTTTGGAGCAG CTTCATG	TAAATGGCCAGTCTTTTGTGC TAA

3.4.5. Recherche de grands réarrangements par la PCR quantitative

Deux couples d'amorces au niveau d'exon 9 et d'exon 17 ont été sélectionnés pour la recherche de grands réarrangements intragéniques du gène *KIAA1468*. Les échantillons ont été analysés en triple. Le dosage de chaque amplicon par rapport à *RPPHI* (Gène ID 85495) et la normalisation avec l'ADN contrôle selon la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Yuan et al, 2008).

4. Séquençage des gènes candidats de DI

4.1. Choix des amorces, contrôle de la spécificité et étapes de séquençage

Les amorces sont choisies sur le site de Primer3.0 v.4.0 (<http://primer3.wi.mit.edu>). Les paramètres des amorces sont bien vérifiées pour une amplification spécifique de la région d'intérêt. Les produits de PCR sont spécifiques s'il existe une seule bande intacte sur le gel à 2% d'agarose, le séquençage bidirectionnel est réalisé avec des amorces sens et antisens, la concentration des amorces pour la réaction de PCR est de 10 μ M et de 5 μ M pour la réaction de séquençage.

Les produits spécifiques sont purifiés par Exosap[®] et la PCR de séquence est ensuite réalisée suivie d'une purification des produits sur Séphadex G50.

La réaction de la PCR se compose de 2,5 μ l tampon Gold[®] ou Thermoprime[®], 1,5 μ l de MgCl₂, 2 μ l de nucléotides (dNTPs), 2 μ l d'amorces spécifiques (sens et anti-sens) 0,3 μ l de Taq polymérase, 11,7 μ l de l'eau ppi (eau pour préparations injectables) et 100ng d'ADN sont utilisés pour faire la réaction de PCR pour un volume final de 25 μ l.

Programme de PCR		
Cycles	Température	Temps
1	95°C	7 minutes
30	95°C	30 secondes
	60°C	40 secondes
	72°C	40 secondes
1	72°C	7 minutes
	4°C	∞

- La purification par Exosap : 5µl de produit de PCR et 1µl Exosap.

Programme Exosap	
37°C	15 minutes
80°C	15 minutes
4°C	∞

- La réaction de séquence : 1µl de Big dye® (terminateur ddNTPs), 0,5µl de tampon de séquençage 5X, 1µl d'amorce spécifique (sens ou anti-sens), 2,5µl de produits purifiés.

Programme PCR de séquence i-cycler /PE2700		
Cycles	Température	Temps
1	96°C	1 minute
25	96°C	10 secondes
	50°C	5 secondes
	60°C	4 minutes
1	4°C	∞

- La purification de produits séquencés : 5µl de produits séquencés et 15µl de l'eau ppi (eau pour préparations injectables) sont purifiés en utilisant les puits de Séphadex G50 préalablement préparées et conservées à + 4°C.
- L'électrophorèse capillaire sur ABI 3130XL : les produits purifiés sur Séphadex G50 sont passés au séquenceur ABI Prisme 7500.

4.2. Amorces spécifiques flanquantes utilisées pour le séquençage des gènes candidats

4.2.1. Amorces pour le séquençage de l'ADNc du gène *RUNX1T1*

Un couple d'amorces spécifiques est utilisé afin d'amplifier des exons 2 à 8 du transcrit aberrant. Le produit de la RT-PCR est ensuite séquencé en utilisant le kit de BigDye Terminator (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Amorce du transcrit aberrant du gène <i>RUNX1T1</i>	Séquence d'amorce sens	Séquence d'amorce anti-sens
Exon 2-8	CAAAAGAAACACTTGG AGAGCA	TTCCACTCTTCTGCCCATTC

4.2.2. Amorces spécifiques pour le séquençage des exons du gène *RUNX1T1*

La recherche de mutations ponctuelles du gène *RUNX1T1* est réalisée chez le cas-index par amplification spécifique des exons du gène *RUNX1T1* en utilisant des amorces spécifiques des régions introniques flanquant chacun des exons du gène *RUNX1T1*. Finalement, les produits de PCR sont séquencés en utilisant les fluorophores BigDye Terminator v.3.1.

Amorces des exons du gène <i>RUNX1T1</i> <i>NM_175634.2</i>	Séquence d'amorce sens	Séquence d'amorce anti-sens
1	ATTGATCTCTGGGCTG GTGA	TTTCTTCCTTCTTCTAGTGCC TG
2	TTGAATTTCTTCTGTTC ACTTGC	GGGAAAATAAAATTCAGCAT CAA
3	GCAATTCCTCATGCAT GTTC	GGGATAGTGTGGGTGGGAG
4	TGTTTGCTTGTTATTAC ACTGTGTTG	CATTTAGGGGCTCTTTGATTT
5	TGCATTGCATACTCTTC TCCA	ACAATTAACCGCTG GCCTA
6	TGAGTGACTIONACTGT GCTGG	GGGTGCTTGAAGACTTGAC
7	TTACATCGAGTTTGCCC ACA	GAAGGCATTGTTTTTCTGC
8	TTGCTTCCTTCATTGTC CTG	GATATGCAAGGAATTTTAAG ACAAT

9	TGCTTACTTTCACCTCTG TGCG	GGCAGCTGTGTGCAGTTGT
10	TCCAATGACTTCGGCT AACTG	GCTCATTCTTCATTCAAGGT GA
11	TTGAAAATAAGGCTAC AGTGATGC	CGAAACCAATTCCTCATCCT

4.2.3. Amorces spécifiques pour le séquençage du gène *ZEB2*

Les amorces spécifiques sont utilisées pour déterminer le point de cassure distal dans l'exon 10 du gène *ZEB2* observé sur ACM-1M-DIS, les produits de PCR obtenus sont contrôlés sur l'électrophorèse sur gel d'agarose, purifiés sur Séphadex G50 et séquencés en utilisant le kit de BigDye Terminator (Applied Biosystem).

Amorce du gène <i>ZEB2</i> <i>NM_014795.3</i>	Séquence d'amorce sens	Séquence d'amorce anti-sens
Intron 04 - Exon 10	TGGAGTCTCGCTCTTTT TGC	GGTTCCAAGTGCCCTTTCTC

4.2.4. Séquençage du gène candidat *KIAA1468*

- Toutes les parties codantes et les jonctions intron/exon du gène *KIAA1468* ont été séquencées à partir des amorces spécifiques des régions flanquantes.

Amorces du gène <i>KIAA1468</i> <i>ENST00000398130</i>	Séquence d'amorce sens	Séquence d'amorce anti-sens
1A	CTGAGGCCTAGAGGATT CG	GCGATCAATACTTGCTGACC
1B	GCCTAGATCCTGGCTCT GC	ACTGTAGGGGAGAGGGGGTA
2	TTTTAAAAGAATTCCTG GATCTTAG	CTACAGTTTGGTATGTGACTA TAACAT

3_4	TTCATACCCATCCTTGC TTTTT	AAATGGTAACATAAATATTG AAGGAGG
5	TGAAATTCAGGTGGGTG ACA	TTTTACAGTGATTTTTTTCTAC ACTTATAATTCA
6	CCTCGAAGATTTTTTAT GTTTTTTTTTT	AAAAGCGTACAGTGAGATCT TGAG
7	AGCCTGCAGAGGTGAG AGAT	TTGCTTCACATTTTAATACTT CTGAAA
8	TGCTTCATTCTTGAGTTT ATAGC	CAAACGGGAAGAGCTACTGT
9	GGTGGCTCAGAAATCTG GTT	TAAGTTTCTCTTCTACAGAAG CATCTG
10	GGAATGTGTGTTTAGGG CAG	CTCTGCTCCTAGAGAATGGTT T
11	AAATGTCCATTTAAGAA TATTGTGG	GGCATCAGGATTAGCATTG
12	TTTTAACCCCTTAGTCCT AGTTGTGC	TTCTGTAGCCCAGCACAGTG
13	AATTCTCTTTTGAAGGA AGGG	CACTGGCACCTTACCTTCCTG
14	TTTTGACCACACTGATG TTTG	CATAAGGATGGCAGGTATGT C
15	ATGGATGGCCTTCTTTC TTG	CCTAAGCCATCTTGGAACAA
16	TTTGCCACAGTAAGGAA GAAC	GCTTCCCAAAGAATTGTTTT
17	AATTAAATATGAGGAG AAAGGACC	CCTTGGCCCTAAGAACAAA
18	TCAGAAATTGGCAAGG AAAC	GGTAAATAAAAGCATGAACC ATTC
19	AGTAAACATTTCAATTA	AGCAACTACAATTGAAAAGG

	ATCAATTTGC	AAAA
20	TTATGCTAGTGGCTCTT CAGG	GCCTGAGTAAAACCTCAGTT G
21	GGATATTTTCCCCTTAT TTGG	GCACACCAATTCTCTTGGTT
22	CAAACCCAGCCTACCAT GAGTTATGAGTT	ACATGCCTCTGTTGGTTTCAA TT
23_24	CTCAGTCACAGCTAACC CAG	GTATCTGGTGGTAGGCTGCA
25	TCATGTTTAATGTGTGT CTTTCAC	GCTAGACACTCCTCTGAGGC
26	TTAAAGTGTGTCAGGGT TTTG	GAAGATTTGATTTGTCTCACT CC
27	CTGCAAATGAGGATTCA TGC	GCAGTCTTCTCTATGTGAGGC TT
28	TTAACAAAGTAACTGC CAAAAC	GTCCTTTGTTTGAAGACAAG A
29	AGAGTGTGTTTCGTTAAT GATATGC	CGACTGGTTCCTTGACTTGA

4.2.5. Séquençage du gène candidat *FABP7*

Les couples d'amorces dans le tableau ci-dessous sont utilisés pour le séquençage du gène *FABP7*.

Amorces du gène <i>FABP7</i> <i>NM_001446.3</i>	Séquence de l'amorce sens	Séquence de l'amorce antisens
<i>FABP7</i> -5'UTR	TTCTCTCATTTTCCCGTTCC	GGTAGCACAGAAAGCCTCCA
<i>FABP7</i> -E1-F	GGGTCTTCTGAGCTGCAGT G	GTCTTTGCCTCTTGCTGACC

<i>FABP7-E2-F</i>	GGATTCCAGAATCAGAAAG CA	TGGTGTATTTCTCCTTGGATTG
<i>FABP7-E3-F</i>	CGACTAGCTGCAAAGCACT G	ATGGAAGGAGGAGGGGAAGAA
<i>FABP7-E4-F</i>	TGTTTGTAATGTCATTCTT TTGC	AGGATAGCACTGAGACTTGAGG

5. Transcription inverse PCR

Un µg d'ARN est utilisé pour la réaction de PCR transcription inverse (RT-PCR). La reverse transcriptase utilise des amorces d'hexamères pour amplifier tous les ARN totaux. D'abord, 1µl d'amorce d'hexamères est mélangé avec 1µg d'ARN totaux dans un tube d'ependorf puis ce mélange est suivi d'une dénaturation 10 minutes à 70°C. Ensuite, la préparation de deuxième mélange qui se compose de tampon, dNTPs, Superscript®, inhibiteur de la RNase... Le deuxième mélange est rajouté dans le tube contenant l'ARN dénaturé. Finalement, tous les mélanges sont incubés selon le programme suivant :

Programme de Reverse Transcriptase (Thermocycleur Perkin Elmer DNA 480)	
Température	Temps
25°C	10 minutes
42°C	50 minutes
70°C	12 minutes
4°C	∞

6. Transcription inverse suivie d'une PCR quantitative (RT-qPCR)

6.1. La RT-qPCR du gène *KIAA1468*

L'extraction d'ARN est réalisée selon la méthode de Paxgene®. Quatre couples d'amorces au niveau des exons 2-3, 7-8, 23-24 et 28-29 du gène *KIAA1468* ont été utilisés pour la PCR quantitative. Les échantillons ont été analysés en triplicat. Le dosage de chaque amplicon relative par rapport à ESD (Esterase D) et ABL (Abelson) et la normalisation avec l'ADN contrôle selon la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Yuan et al, 2008).

6.2. La RT-qPCR du gène *FABP7*

Les deux couples d'amorces au niveau des exons 1-2 et 2-3 ont été utilisés pour la RT-qPCR du gène *FABP7*. Le dosage de chaque amplicon relative par rapport à *ESD* et *ABL* et la normalisation selon la méthode $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

7. PCR semi-quantitative avec marqueurs microsatellites

Trois marqueurs microsatellites (22xTG, 18xGT et 17xTG) sont sélectionnés pour l'étude parentale. Les produits de PCR spécifiques sont analysés par électrophorèse capillaire sur 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®).

RESULTATS

I. Déficience intellectuelle légère liée au gène *RUNX1T1*

1. Observation clinique

Il s'agit d'une femme de 38 ans, première née à terme de parents non consanguins. Sa fratrie est en bonne santé, sans difficultés d'apprentissage. Les mensurations sont normales à la naissance. Il n'y a pas été relevé de retard des acquisitions motrices. Son développement du langage a été considéré dans les limites de la normale mais des difficultés scolaires ont été clairement notées dès l'âge de 6 ans. Un diagnostic de déficience intellectuelle légère a été porté mais les tests de QI n'ont pas été réalisés. Un soutien scolaire spécialisé a été nécessaire. Les communications sociales non verbales sont dans les limites de la normale. A la consultation de génétique, à 38 ans, sa taille est de 158 cm (-1 SD), son poids 69.8 kilos (+2 SD), et son périmètre crânien de 52.5 cm. Les traits du visage révèlent un front large, un prognathisme, des sourcils épais avec un léger synophrys, une oreille droite saillante et une implantation basse des cheveux (Figure 13). Elle est d'un caractère agréable et coopérative avec une participation aux activités de la vie quotidienne mais la guidance parentale était indispensable dans sa vie pratique.



Figure 13 : Photographie de la patiente de face et de profil droit montrant un front large, des sourcils épais, une oreille droite saillante, un prognathisme et une implantation basse des cheveux.

2. Délétion du gène *RUNX1T1* par ACM 180K

L'ACM 180K a identifié une délétion interstitielle en 8q21.3 chez le probant qui interrompt le gène *RUNX1T1* (*Runt-related transcription factor 1, translocated to, 1*) : 46,XX.arr8q21.3(93,079,398-93,117,255)x1 avec le $\log_2\text{ratio} = -0.95$ (**Figure 14**). Cette délétion d'une taille minimale de 37.85 kb se compose des exons 3 à 6 du gène *RUNX1T1* (**Figure 15**), la délétion d'une taille maximale de 61.87 kb : 46,XX.arr8q21.3(93,068,393-93,130,270)x1, UCSC build 36/hg18 comporte des exons 3 à 7 du gène *RUNX1T1* ([NM_175634.2](#)).

Cette région n'a pas été décrite comme variation du nombre de copies dans la base de données des variants génomiques (<http://dgv.tcag.ca/>). A l'exception des régions polymorphes, aucune autre modification du nombre de copies n'a été observée dans le génome.

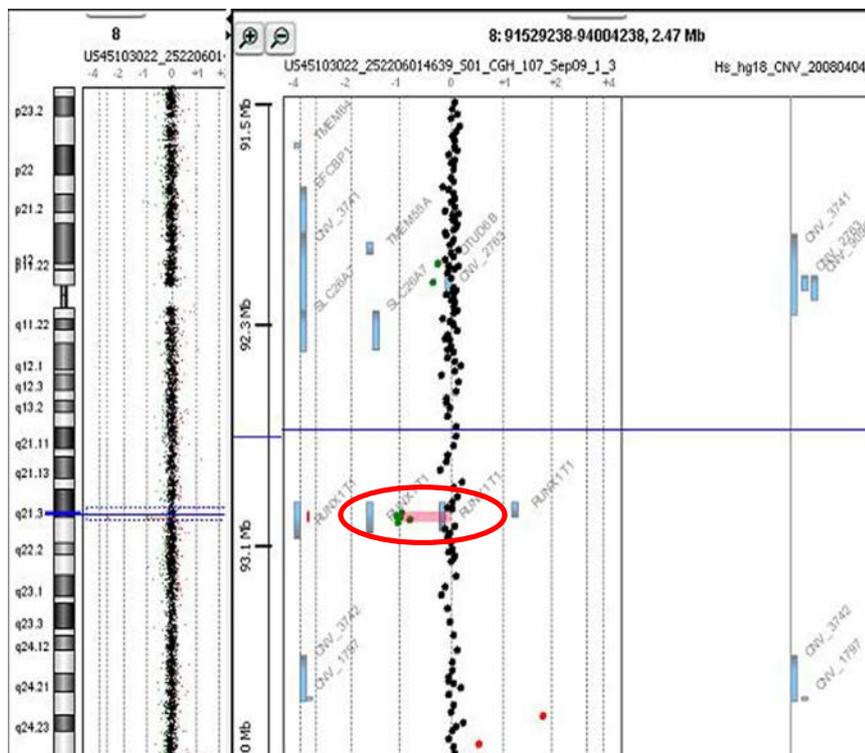


Figure 14 : Délétion interstitielle d'une taille minimale de 37,85 kb en 8q21.3 détectée par ACM 180K avec 5 sondes déviantes, $\log_2\text{ratio} = -0.95$ chez la patiente.

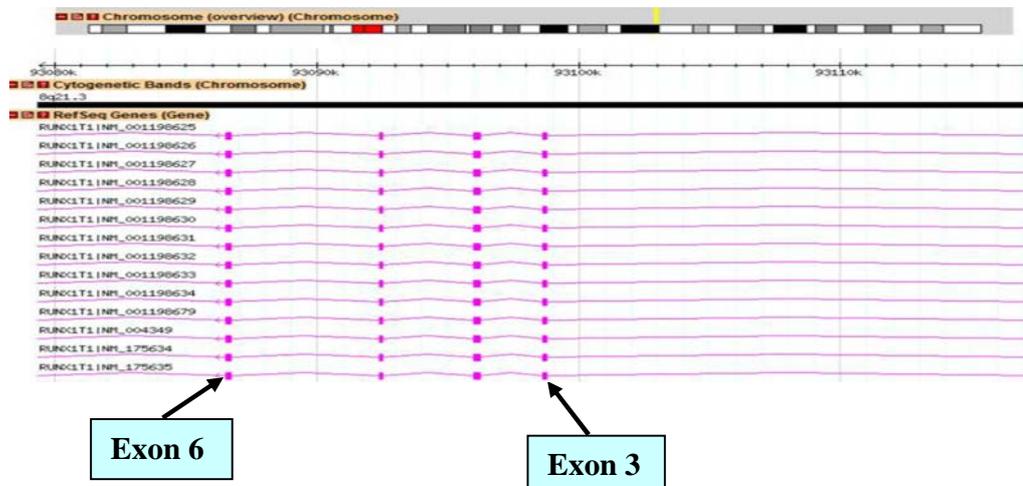


Figure 15 : La délétion d'une taille minimale de 37.85 kb emporte les exons 3 à 6 du gène *RUNX1T1* (Database des variants génomiques DGV).

3. Délétion *de novo* du gène *RUNX1T1* par PCR en temps réel

La PCR quantitative se réalise avec des couples d'amorces au niveau des exons 2, 3 et 7 afin de borner la délétion trouvée sur ACM 180K (**Figure 16**).

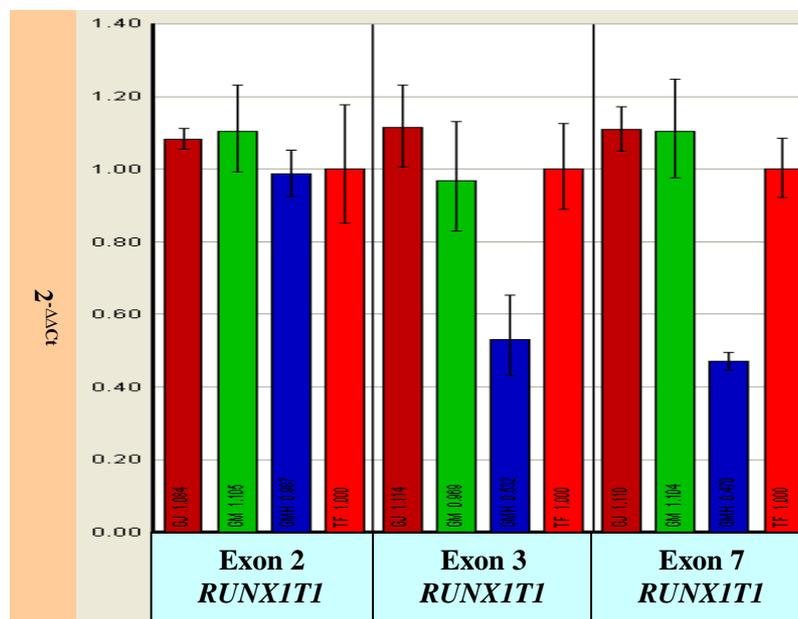


Figure 16 : Résultat de la PCR en temps réel confirmant la délétion *de novo* des exons 3 à 7 du gène *RUNX1T1* chez le cas-index, le probant est en bleu, la mère est en rouge foncé, le père est en couleur verte et le témoin femme est en couleur rouge claire.

4. Séquençage du point de jonction du transcrit aberrant *RUNX1T1*

La séquence codante de l'exon 2 du gène *RUNX1T1*

ATATCTGTCAAAGAAACACTTGGAGAGCACTGAGTTTAGTAATAGGTGACTGCCGG
AAAAAAGGGAACCTTGAATATTGTCAA[G]

La séquence codante de l'exon 8 du gène *RUNX1T1*

GGTTGCATGGCACACGTCAAGAAGAAATGATTGATCACAGACTAACAGACAGAGAA
GGGCAGAAGAGTGGAAACATCTTGACCAT

Le transcrit de fusion entre l'exon 2 et l'exon 8 avec le point de jonction marqué en rouge entre crochets correspondant au dernier nucléotide G de l'exon 2 du gène *RUNX1T1* (**Figure 17**).

ATATCTGTCAAAGAAACACTTGGAGAGCACTGAGTTTAGTAATAGGTGACTGCCGG
AAAAAAGGGAACCTTGAATATTGTCAA[G]GGTTGCATGGCACACGTCAAGAAGAAA
TGATTGATCACAGACTAACAGACAGAGAAGGGCAGAAGAGTGGAAACATCTTGACC
AT.

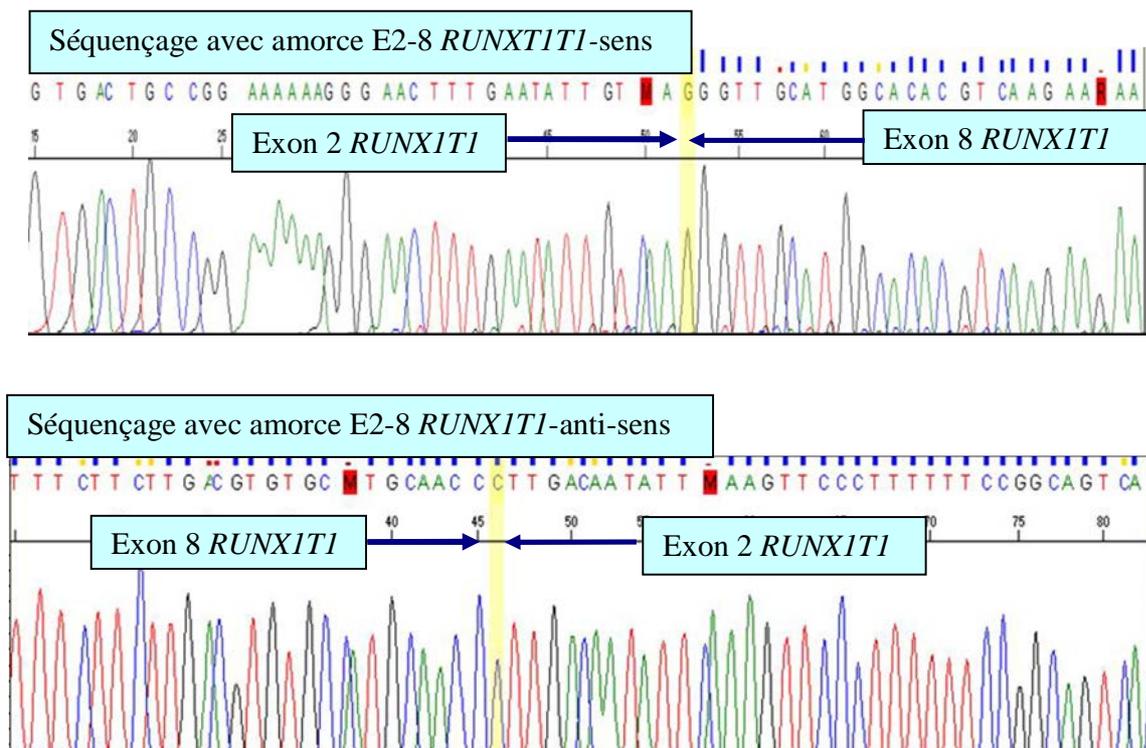


Figure 17 : Analyse de séquences du gène *RUNX1T1* sur l'ADNc avec des amorces sens (en haut) et anti-sens (en bas). Le dernier nucléotide G de l'exon 2 en jaune correspond au point de jonction entre exon 2 et exon 8 (amorce sens).

5. Exclusion de la mutation sur l'allèle normal du gène *RUNX1T1*

Nous avons séquencé tous les exons et les bornes exon/intron du gène *RUNX1T1* par l'utilisation des 11 couples d'amorces et nous n'avons pas trouvé de variation dans la séquence de l'allèle normal du gène *RUNX1T1*.

II. Déficience Intellectuelle légère à modérée liée au gène *ANKRD11*

1. Observation clinique

Il s'agit d'un homme de 40 ans vu à la consultation dans le cadre de l'évaluation génétique d'une déficience intellectuelle. Il est né de parents non apparentés en bon état de santé. Un hydramnios avait marqué la situation anténatale puis une hypotonie néonatale et des troubles alimentaires ont été rapportés. Il a présenté un retard de langage important avec les premiers mots à 3 ans, un retard des acquisitions motrices. La déficience intellectuelle est modérée avec un QI calculé de 56. L'examen clinique révèle des mensurations dans les limites de la normale. L'examen crânio-facial permet de noter une implantation capillaire basse sur le front, des fentes palpébrales courtes, des oreilles avec conque décollée et l'absence d'anthélix, une lèvre inférieure éversée, un palais haut et large. Des troubles du spectre autistique sont également présents chez le patient. Les résultats de l'étude moléculaire pour la dystrophie myotonique de Steinert (DM1) et le syndrome de l'X fragile (FMR1) ne montrent pas d'anomalies.

2. Délétion du gène *ANKRD11* par l'ACM 180K

L'ACM 180K a identifié une délétion interstitielle d'une taille minimale de 214 kb qui interrompt le gène *ANKRD11* ([NM_013275.5](#)) : 46,XY.arr16q24.3(87,852,888-88,067,238)x1, log₂ratio= -0.958 (**Figure 18**). Cette délétion minimale se compose des 11 exons, à partir de l'exon 3 jusqu'à la fin du gène *ANKRD11*, la taille maximale de la délétion est de 232 kb : 46,XY.arr16q24.3(87,843,199-88,075,534)x1 avec la délétion à partir de l'exon 2 du gène *ANKRD11*, UCSC genome build (hg18) (**Figure 19**).

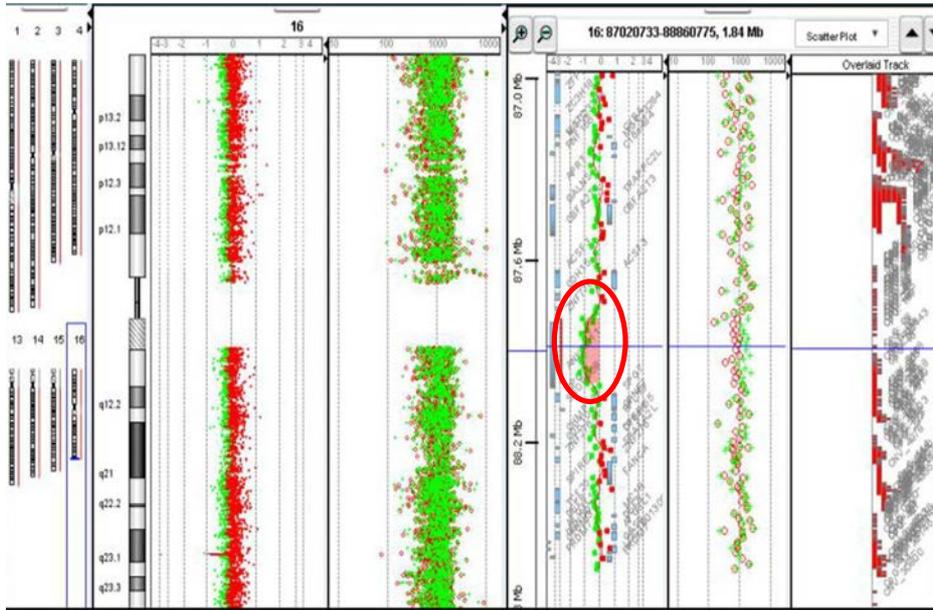


Figure 18 : ACM 180K avec la délétion interstitielle d'une taille minimale de 214 kb en 16q24.3 a été détectée avec 17 sondes déviantes.

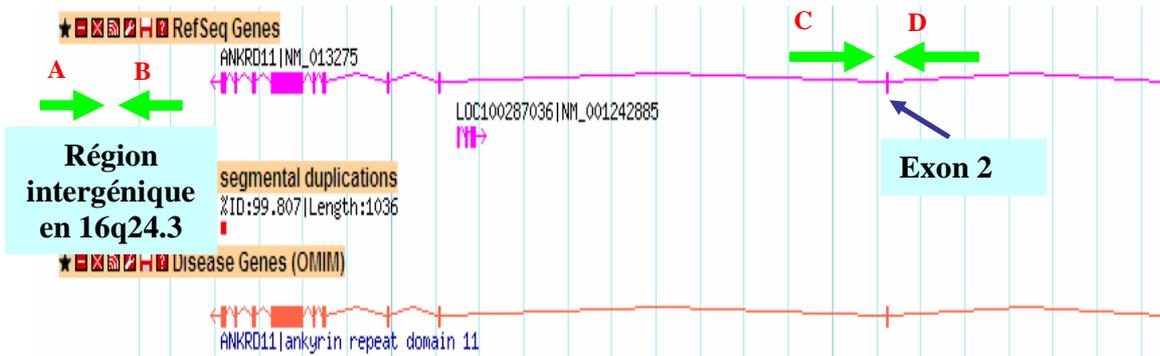


Figure 19 : Délétion d'une taille maximale de 232 kb à partir de l'exon 2 du gène *ANKRD11* chez le probant identifiée par l'ACM 180K. La position génomique du couple d'amorces dans la région intergénique en 16q24.3 (chr16:87,855,645-87,855,706) [couple d'amorces « AB » dans la région intergénique en 16q24.3 (flèches vertes) et un couple d'amorces « CD » au niveau de l'exon 2 du gène *ANKRD11*] (flèches verts) (Database DGV).

3. PCR quantitative du gène *ANKRD11*

La PCR quantitative a utilisé un couple d'amorces au niveau de l'exon 2 du gène *ANKRD11* et un autre couple d'amorces au niveau de la région intergénique en 16q24.3 avant l'exon 13 du gène *ANKRD11* (Figure 20).

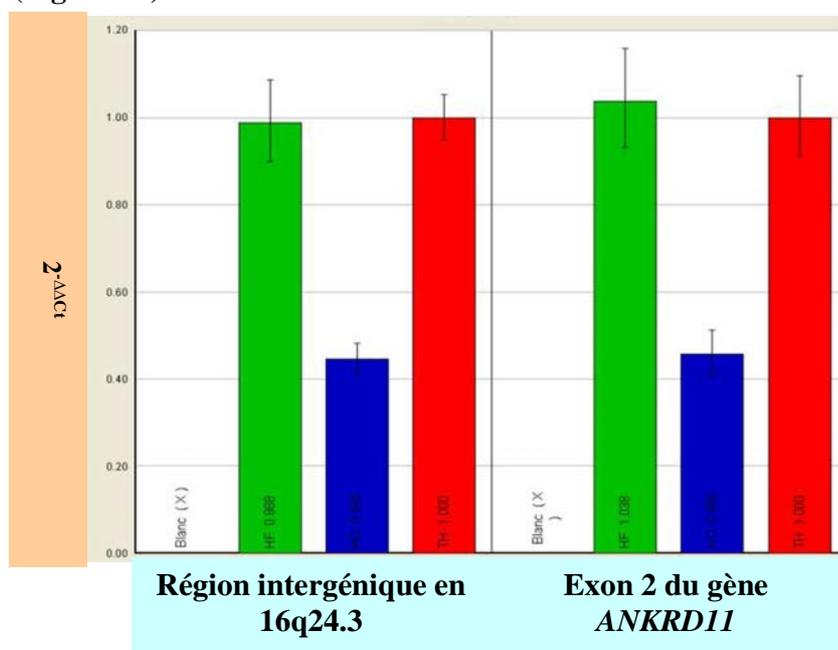


Figure 20 : Analyse en PCR quantitative confirme la délétion du gène *ANKRD11* chez le probant (bleu), *non héritée* de sa mère (vert). En rouge le témoin homme. Il n'y a pas de comparaison possible avec le père, décédé.

III. Déficience Intellectuelle sévère, spasmes infantiles et délétion du gène *KIAA1468*

1. Observation clinique

Il s'agit d'un garçon de 3 ans et demi issu d'une union non consanguine, les parents étant en bonne santé. L'enfant est né à 36 semaines d'âge gestationnel suite à la rupture prématurée des membranes. Le score d'Apgar était de 9 et 10 respectivement. A la naissance, son poids était à 2400 g, sa taille 47 cm et son périmètre crânien 33 cm. Le diagnostic de syndrome de West a été porté à 6 mois, résistant au traitement corticoïde. L'échographie transfontanellaire et la tomodensitométrie ont révélé une hypoplasie du corps calleux et une légère dilatation ventriculaire. Le bilan métabolique et l'analyse du LCR sont normaux. Il a un cousin paternel ayant une leucodystrophie métachromatique. Après une période de développement normal, il est noté une régression avec retard psychomoteur et retard du langage. Des mouvements stéréotypés

des mains sont observés. A 3 ans et demi, son poids est de 10.2 kg (-2DS), sa taille 83 cm (-4DS) et son périmètre crânien de 47 cm (-2 DS). L'examen clinique crânio-facial relève une enophtalmie et des oreilles allongées. L'EEG identifie un fond désorganisé, des ondes lentes et pointues focalisées dans la région bi-temporale. L'IRM cérébrale montre une hypoplasie du corps calleux, de rares hétérotopies nodulaires périventriculaires, une atrophie corticale et un retard de myélinisation. Le caryotype est 46,XY (résolution 550 bandes). Dans le cadre des spasmes infantiles, l'analyse moléculaire des gènes *ARX*, *CDKL5*, *MECP2*, *TSC1* est normale. Le séquençage du gène *TSC2* a identifié la mutation 1839+18G dans l'intron 16, mutation héritée du père cliniquement indemne de tout signe évocateur d'une Sclérose Tubéreuse de Bourneville.

2. Délétion du gène *KIAA1468* sur ACM 180K

L'analyse chromosomique sur microréseau 180K (Agilent, Santa Clara, CA) a identifié une délétion d'une taille minimale de 92.12 kb en 18q21.3, $\log_2\text{ratio} = -1.10$, à partir de l'exon 9 du gène *KIAA1468* ([NM_020854.3](#)) (**Figure 21 et 22**) et une duplication d'une taille minimale de 388.54 kb en 22q11.21, cette microduplication est incluse dans la région amplifiée du syndrome de duplication 22q11 connu. Elle est héritée du père, cliniquement asymptomatique et donc ne peut, à ce jour, être reliée aux troubles cliniques de l'enfant : 46,XY.arr18q21.33(58,049,445-58,141,570)x1dn,22q11.21(19,405,575-19,794,119)x3 pat, UCSC genome build (hg18).

La taille maximale de la délétion est de 126 kb à partir de l'exon 3 du gène *KIAA1468* jusqu'à l'exon 1 du gène *TNFRSF11A* : 46,XY.arr18q21.3(58,029,515-58,155,553)x1dn, 22q11.21(19,405,575-19,794,119)x3 pat. Le gène *TNFRSF11A* ou *RANK* (MIM 603499) ou Tumor Necrosis Factor Superfamily, Member 11a, Nfkb Activator, joue un rôle dans la modulation de l'ostéoclastogenèse. Des mutations à ce locus ont été associées à l'ostéolyse expansive familiale autosomique dominante (MIM : 174810), à la maladie de Paget (MIM 602080) et l'ostéopétrose familiale de type 7 récessive autosomique (MIM 612301). Il est moins probable que le gène *TNFRSF11A* soit associé au phénotype d'encéphalopathie infantile précoce chez l'enfant.

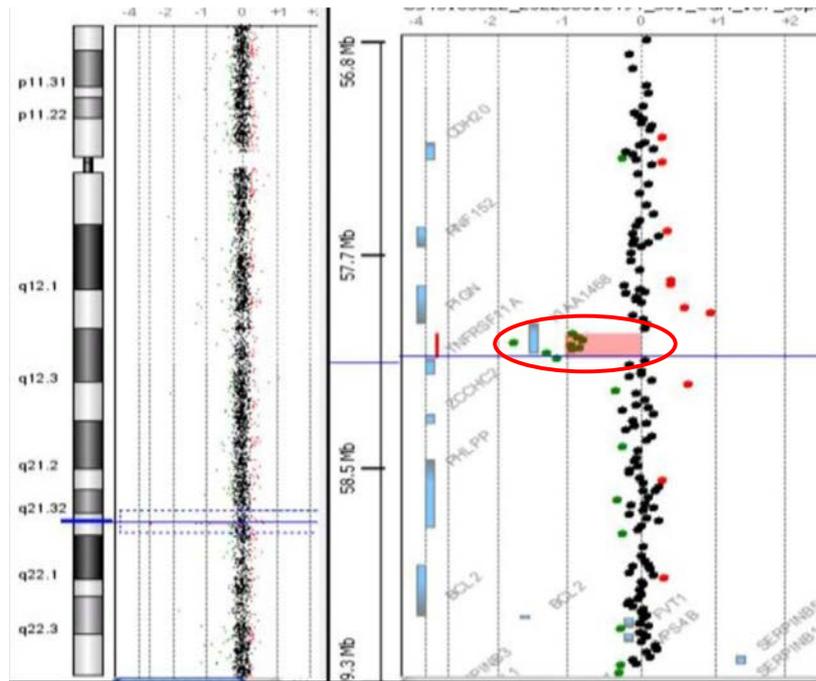
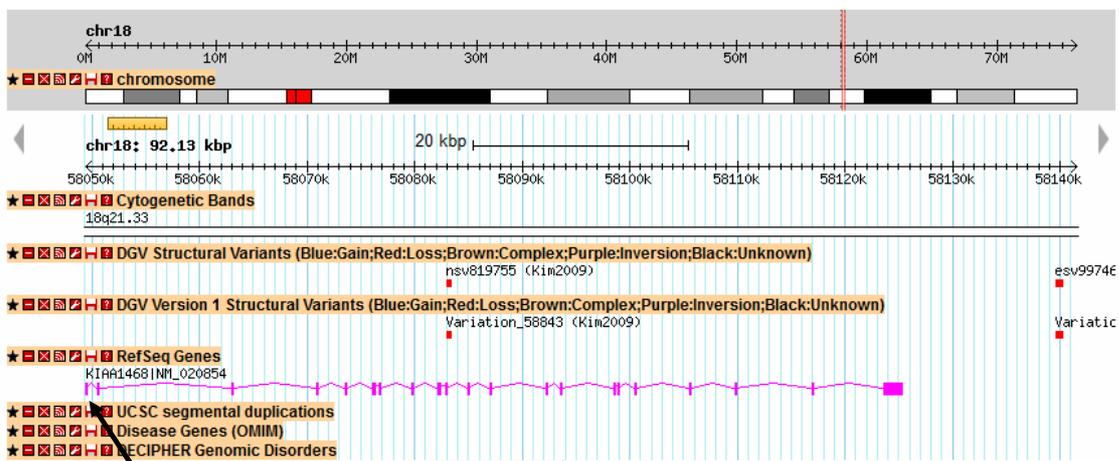


Figure 21 : ACM 180K montrant une délétion interstitielle en 18q21.33, 9 sondes déviantes, log₂ratio = -1.10 chez le cas-index.



Exon 9 du gène *KIAA1468*

Figure 22 : Délétion du gène *KIAA1468* à partir de l'exon 9 sur ACM 180K avec d'une taille minimale de 92.12 kb (Database DGV).

3. Délétion *de novo* du gène *KIAA1468* sur la PCR quantitative (Figure 23)

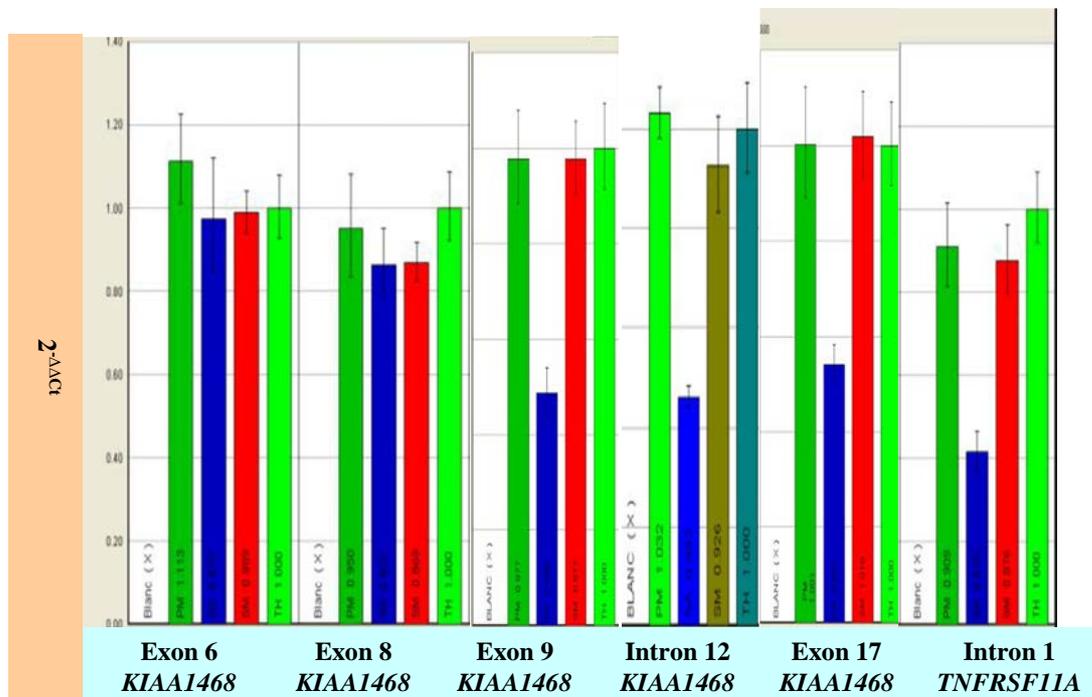


Figure 23 : La PCR quantitative avec des couples d'amorces spécifiques des exons 6, 8, 9 et 17 du gène *KIAA1468* et un couple d'amorces au niveau de l'intron 1 du gène *TNFRSF11A* a montré **une délétion *de novo*** à partir de l'exon 9 du gène *KIAA1468* jusqu'au exon 1 du gène *TNFRSF11A*. Pour les couples d'amorces au niveau des exons 6, 8, 9, 17 du gène *KIAA1468* et de l'intron 01 du gène *TNFRSF11A*, le probant est en bleu foncé, la mère est en vert foncé, le père est en rouge et le témoin homme est en vert clair. Pour le couple d'amorces de l'intron 12 du gène *KIAA1468*, le cas-index est en bleu, la mère est en vert clair, le père est en brun et le témoin homme est en azur foncé.

4. Etude de l'expression du gène *KIAA1468* par PCR quantitative

La transcription inverse à partir de l'ARN d'un prélèvement sanguin suivi d'une PCR quantitative (RT-qPCR) est réalisée avec des couples d'amorces des exons 2-3, 7-8, 23-24, et 28-29 du gène a montré une **diminution d'expression du transcrit *KIAA1468*** (Figure 24).

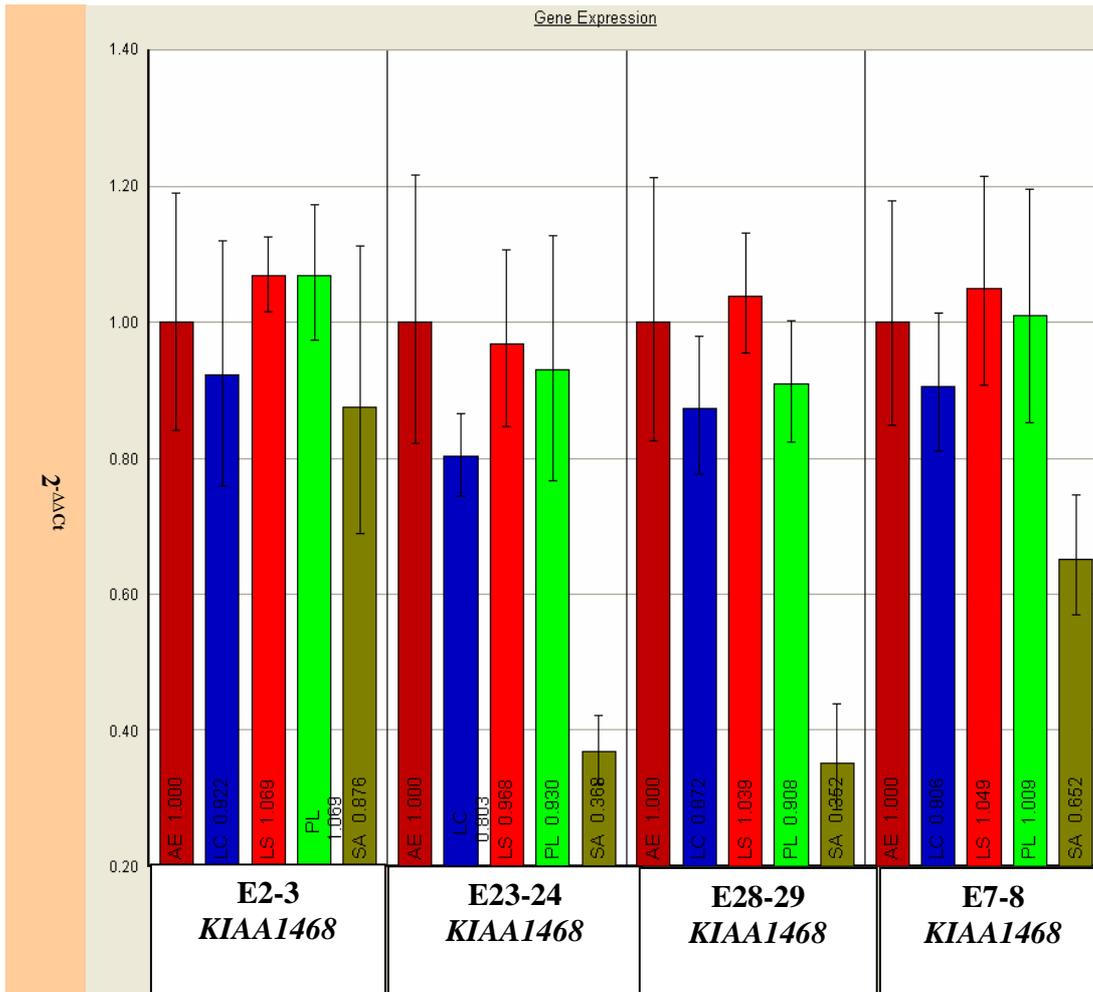


Figure 24 : RT-qPCR révélant une diminution de l'expression du gène *KIAA1468* au niveau des couples d'amorces 23-24 et 28-29 chez le patient par rapport aux 4 témoins. Le probant est en couleur brune et les témoins sont en vert, rouge clair, bleu et rouge foncé.

5. Origine parentale de la délétion du gène *KIAA1468*

La technique de PCR semi-quantitative avec des marqueurs microsatellites informatifs intragéniques a conduit à démontrer, à l'aide du marqueur 18xGT, la présence d'une seule copie maternelle chez le cas-index tandis que les deux autres marqueurs 22xTG et 17xTG sont non-informatifs. Ce résultat confirme que la délétion s'est produite sur l'allèle d'origine paternelle (**Figure 25**).

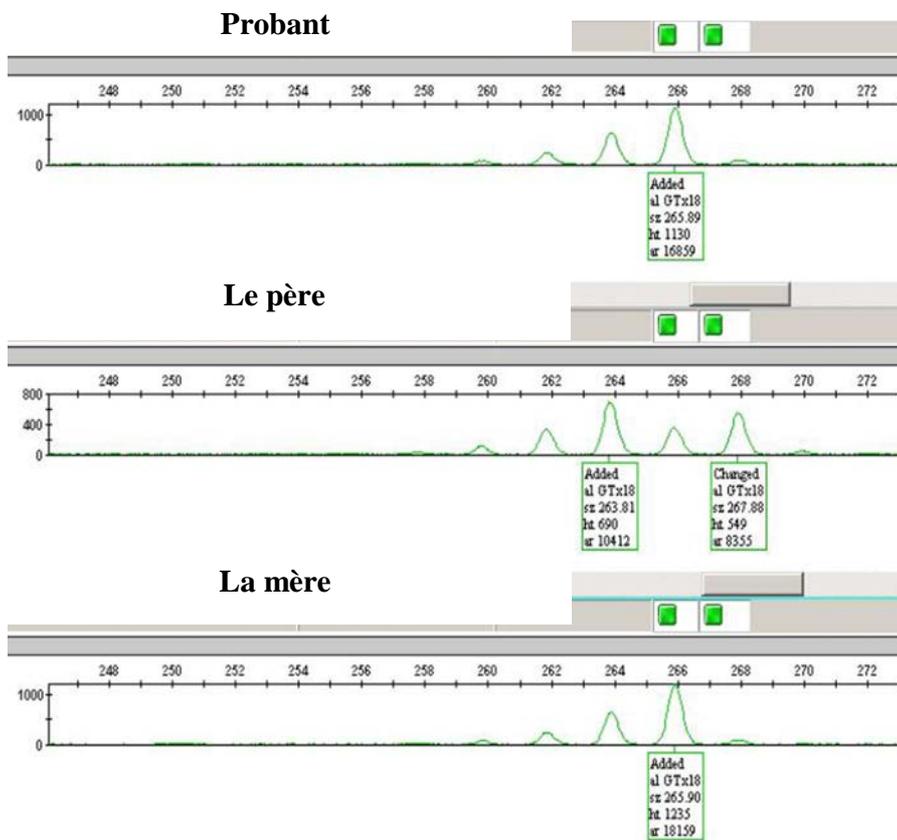


Figure 25: Analyse du marqueur microsatellite 18xGT dans la famille du probant : le probant n'a qu'un seul allèle maternel sans contribution paternelle

6. Séquençage du gène candidat *KIAA1468*

a- Exclusion d'une mutation ponctuelle sur l'allèle maternel

Le séquençage du gène *KIAA1468* avec les 29 exons et bornes intron-exon chez le probant n'a pas identifié de variant pouvant faire évoquer un mécanisme mutationnel autosomique récessif à l'origine de cette encéphalopathie (résultats non montrés)

b- Recherche d'autres mutations du gène dans une population cible

Afin de contribuer à valider l'implication du gène dans la survenue d'une telle encéphalopathie convulsivante, une collaboration nationale a été mise en place et une série de 35 individus a été sélectionnée ayant des caractéristiques proches, cliniques (syndrome de West) et paracliniques (imagerie IRM) .

Le tableau 5 rassemble les résultats du séquençage dans cette population révélant les SNPs identifiés.

SNP (Polymorphisme d'un seul nucléotide)	Fréquence observée	Changement nucléotidique
rs17644012	11 (9,24%)	C/T
rs17717783	11 (9,24%)	C/T
rs55806215	9 (7,56%)	A/T
rs17645999	11 (9,24%)	C/T
rs78241142	2 (1,68%)	A/G
rs1567038	15 (12,61%)	A/C
rs17645135	6 (5,04%)	G/T
rs1516325	8 (6,72%)	A/G
rs2980983	13 (10,92%)	A/G
rs201852747	4 (3,36%)	c.2681-97insACCTA
rs3842400	5 (4,2%)	c.3114+32delGT
rs17719830	6 (5,04%)	A/G
rs146488728	1 (0,84%)	G/A
rs140959449	1 (0,84%)	C/T

rs12969851	3 (2,52%)	A/G
rs74443547	2 (1,68%)	C/T
rs74462707	2 (1,68%)	G/T
rs17069628	2 (1,68%)	C/T
rs151143967	1 (0,84%)	C/T
rs3752093	2 (1,68%)	G/A
rs17069686	2 (1,68%)	A/C
rs148383213	1 (0,84%)	c.2681-104 insTAACC
rs181075651	2 (1,68%)	T/A
Total	119	

Tableau 5 : Récapitulatif des polymorphismes d'un seul nucléotide détectés par le séquençage du gène *KIAA1468* (NM_020854.3) chez 35 patients atteints de syndrome de West avec anomalies IRM.

Outre les SNPs précédemment identifiés, deux variants jusqu'alors non décrits dans les bases de données ont été retrouvés : un variant intronique et un variant exonique du gène *KIAA1468*.

b.1. Variation retrouvée dans la séquence de l'intron 20 du gène *KIAA1468* (voir figure 26)

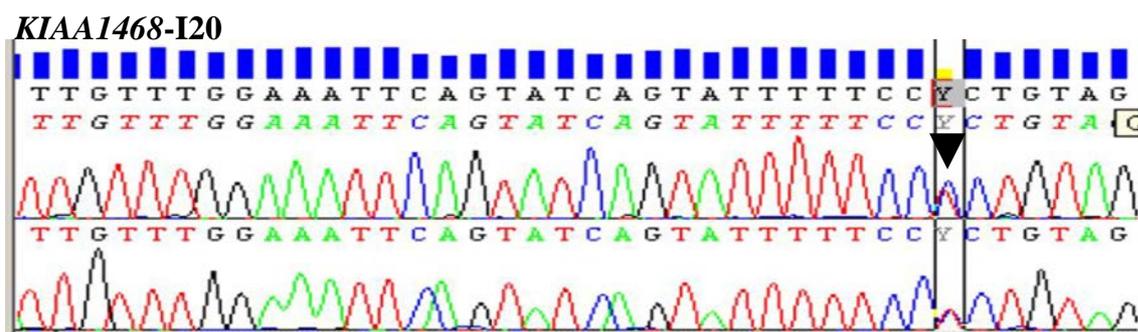


Figure 26 : Le séquençage bidirectionnel a identifié un variant au niveau de l'intron 20, c.2761-7 T>C chez l'individu (patient 5) (flèche noir). Ce variant est testé avec au moins 3 programmes de prédiction de l'épissage alternatif qui n'a montré aucun effet significatif sur épissage du gène *KIAA1468*.

b.2. Variation de la séquence codante du gène *KIAA1468* dans l'exon 29 (voir figure 27)

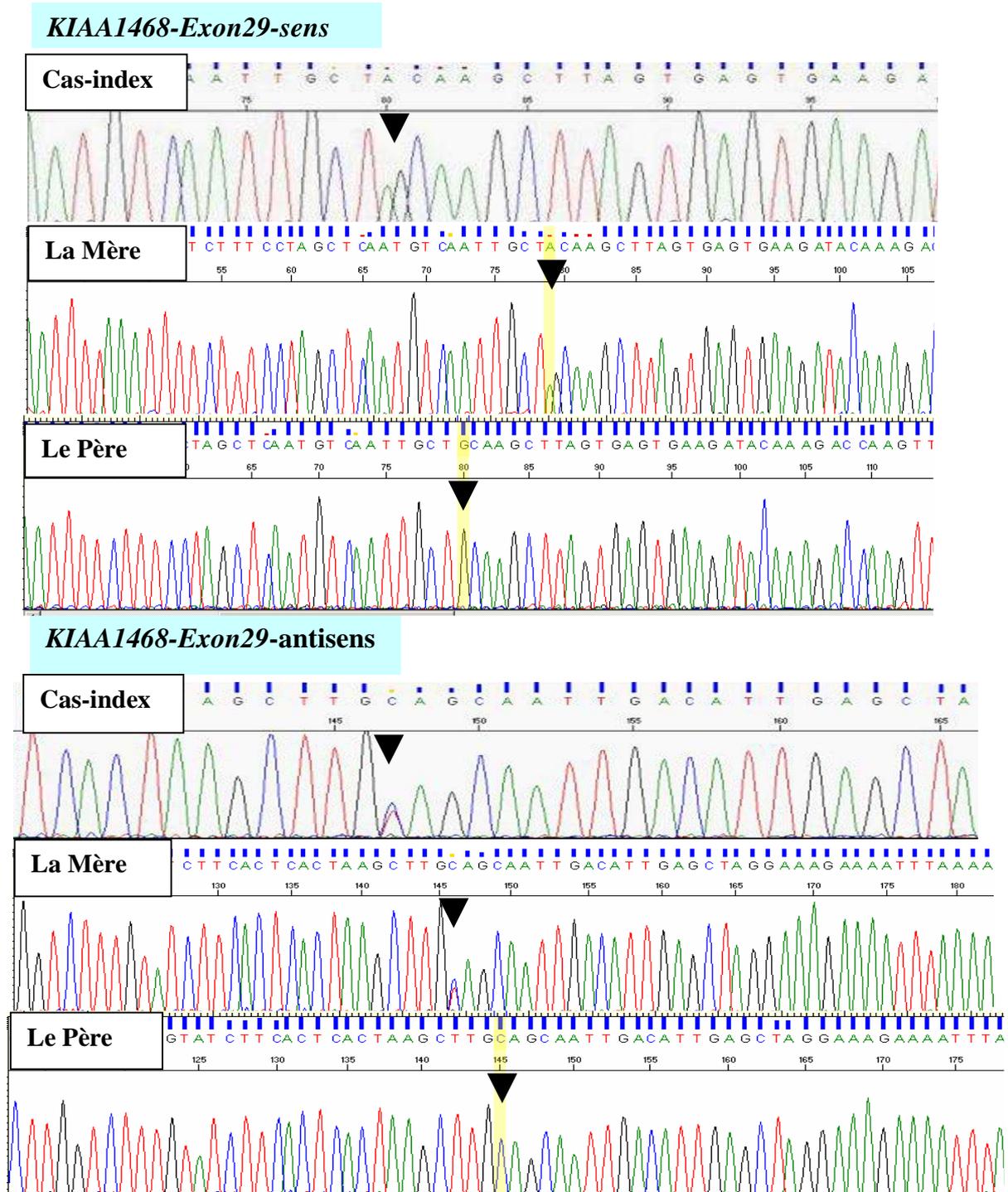


Figure 27 : Le séquençage bidirectionnel a identifié un variant faux sens au niveau de l'exon 29, c.3547 G>A du gène *KIAA1468* chez l'individu 33. Ce variant est hérité de sa mère asymptomatique (*flèche noir*).

7. Recherche de grands réarrangements intragéniques du gène *KIAA1468*

Afin de rechercher la récurrence d'altérations du gène *KIAA1468* autre que des mutations ponctuelles, dans cette cohorte de patients partageant un phénotype neurologique proche de celui du probant, nous avons mis au point la technique de PCR quantitative. Deux couples d'amorces ont été utilisées, ciblés sur l'exon 9 et l'exon 17. Aucune anomalie intragénique de grande taille (exonique) n'a été identifiée dans la cohorte de patients étudiés (**Figure 28**).

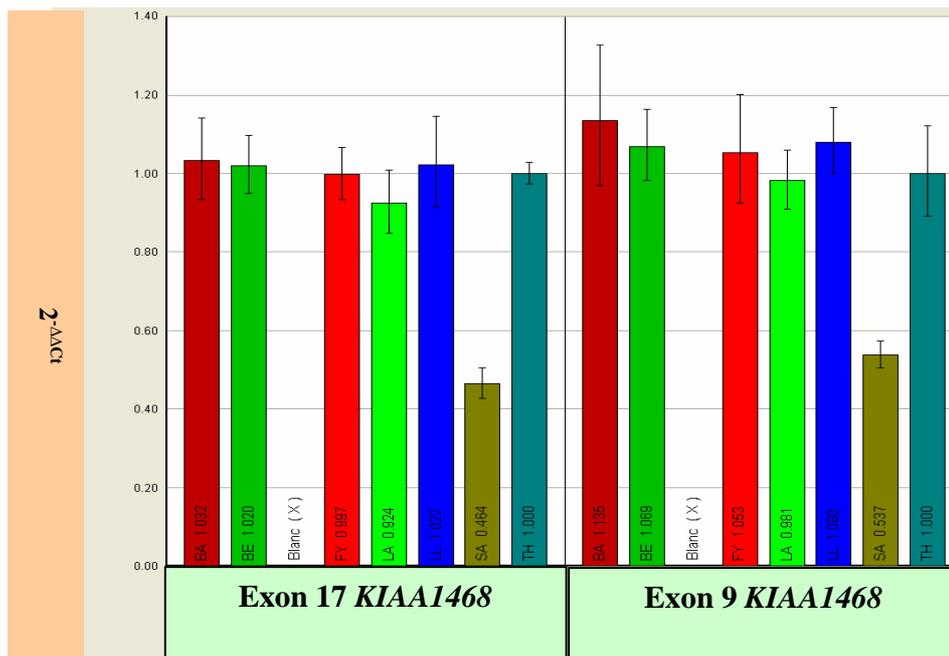


Figure 28 : Exemple de résultats de PCR quantitative (Panel Gauche : exon 17 ; panel droit : exon 9) à la recherche d'un éventuel réarrangement exonique de grande taille dans la cohorte de patients partageant un phénotype neurologique proche de celui du probant. Témoin positif est la probant (couleur vert olive), le témoin normal (couleur bleu de Prusse à l'extrême gauche de chaque panel). Aucun des 5 patients n'a d'anomalie exonique du gène.

IV. Déficience intellectuelle sévère, encéphalopathie infantile précoce et délétion du gène *FABP7*

1. Observation clinique

Il s'agit d'une fille de 14 ans née d'une union non consanguine. Il n'y a pas d'antécédent familial particulier. Elle est la seconde enfant d'une fratrie de deux. L'accouchement s'est fait à terme, par voie basse non instrumentée. L'Apgar était de 9 et 10. Le poids était de 3800g et le périmètre

crânien de 36,5cm. A deux de jours de vie sont apparues des crises convulsives hypertoniques unilatérales gauches, et au 3^{ème} jour des clonies oculaires. L'IRM cérébrale initiale est normale. Des crises hypertoniques unilatérales droites ou gauches surviennent sous traitement antiépileptique, un syndrome pyramidal est noté avec des réflexes ostéotendineux vifs. Il existe une hypotonie axiale intercritique sévère et une absence de contact. Le tracé EEG est de type « suppression bursts ». Le bilan métabolique est normal. Le caryotype sanguin est 46,XX (résolution 500 bandes). L'électrorétinogramme montre une atteinte maculaire et périphérique. Les potentiels évoqués visuels relèvent une nette atteinte rétro-rétinienne de type axonal, l'électromyogramme une latence distale motrice normale et une vitesse de conduction motrice diminuée. Les potentiels évoqués auditifs, des troubles de la conduction centrale. Un traitement par SABRIL et TEGRETOL est institué avec une amélioration relative de l'état clinique neurologique. Le suivi EEG révèle un tracé de sommeil hypersyrythmique conduisant à la mise sous hydrocortisone avec une disparition des crises entre 2 et 12 mois, puis réapparition du tracé hypersyrythmique nécessitant une adaptation du traitement. La tenue de tête n'est acquise qu'à l'âge de 6 ans, une hypertonie postérieure est notée avec des réflexes ostéotendineux vifs. Un contact visuel est présent avec des sourires, il n'y a pas de communication verbale. A 8 ans quelques spasmes apparaissent et des troubles de l'endormissement. A 13 ans il est noté des fausses routes chroniques. Le diagnostic d'encéphalopathie convulsivante sévère précoce ou syndrome d'Ohtahara est retenu responsable de la DI sévère.

2. ACM 180K

L'ACM 180K a identifié une délétion interstitielle d'une taille minimale de 142 kb en 6q22.31 : 46,XX.arr6q22.31(122,996,250-123,139,041)x1 et d'une taille maximale de 173 kb : 46,XX.arr6q22.31(122,982,027-123,155,143)x1, $\log_2\text{ratio} = -0.83$, 13 sondes déviantes, UCSC human genome build hg19 emportant 3 gènes *PKIB*, *FABP7* et *SMPDL3A* (**Figure 29** et **30**). Parmi ces 3 gènes, *PKIB* et *SMPDL3A* possèdent peu d'annotation et ont été décrits surexprimés dans le cancer de la prostate et de la vessie. En revanche, le gène *FABP7* s'exprime de façon abondante au niveau du système nerveux central et son rôle est important dans la neurogenèse précoce.

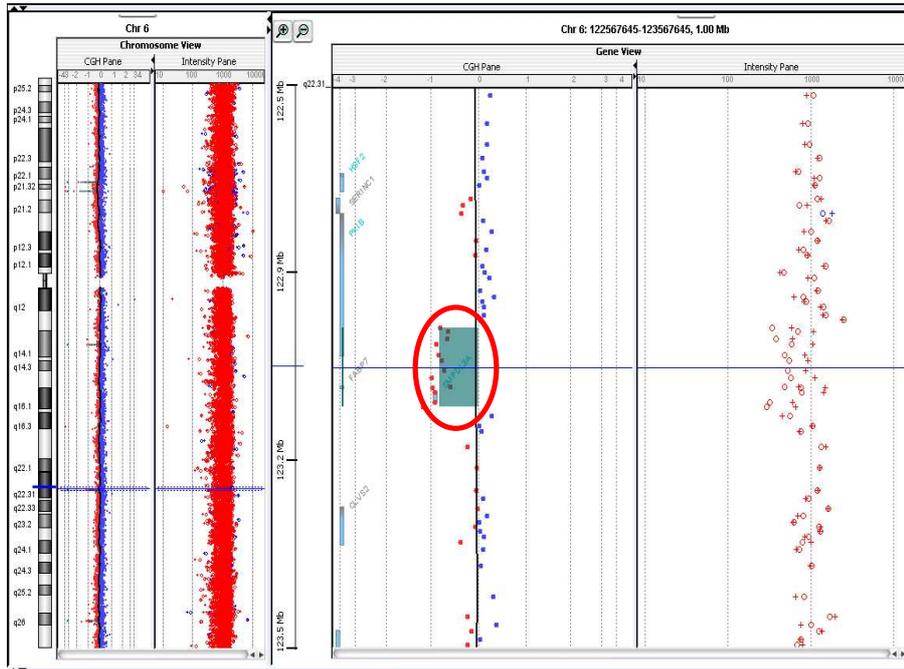


Figure 29 : ACM 180K a détecté une délétion d'une taille minimale de 142 kb en 6q22.31 avec 13 sondes déviantes, $\log_2\text{ratio} = -0.83$, cette délétion contient 3 gènes *PKIB*, *FABP7* et *SMPDL3A*.

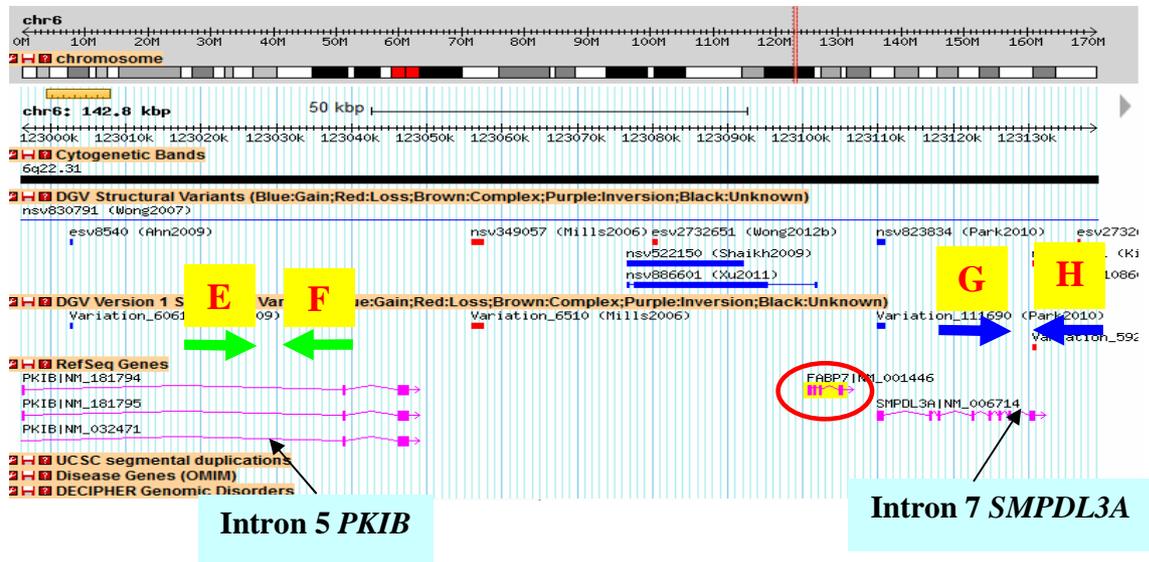


Figure 30 : Délétion sur ACM 180K d'une taille minimale de 142 kb emportant 3 gènes *PKIB*, *FABP7* et *SMPDL3A*. Le gène *FABP7* est surligné en couleur jaune (Database de DGV).

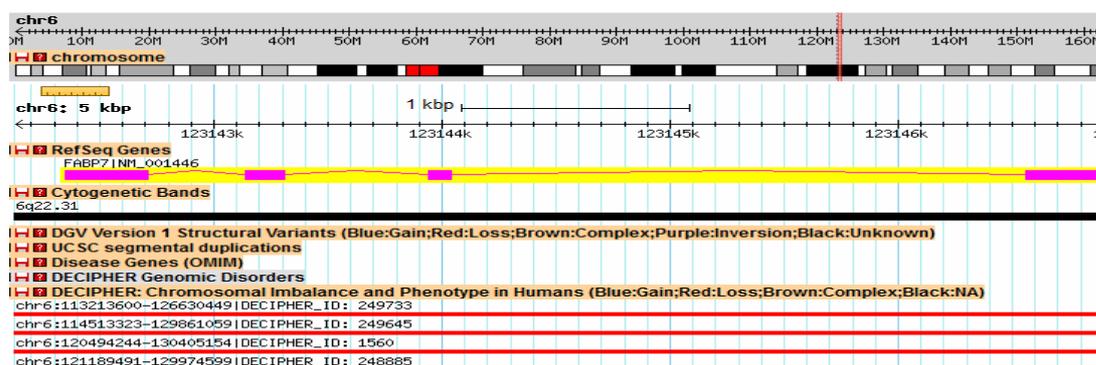


Figure 31 : Le gène *FABP7* possède 4 exons avec le cadre de lecture du gène de gauche à droite correspondant de l'exon 1 à l'exon 4. Les cas de délétion en 6q- emportant le gène *FABP7* dans la base de données Decipher (patient ID 249733, patient ID 249645, patient ID 1560 et patient ID 248885) (Databases DGV).

3. PCR quantitative

La PCR quantitative avec des couples d'amorces en 6q22.31 a montré une délétion *de novo* chez le probant (**Figure 32**). Nous avons utilisé un couple d'amorce dans l'intron 5 du gène *PKIB* (couple d'amorces E-F) (**Figure 30**) avec la position génomique (chr6:122,998,519-122,998,584) et un autre couple d'amorces au niveau de l'intron 7 du gène *SMPDL3A* avec la position génomique (chr6:123,128,694-123,128,760) (couple d'amorces G-H) (**Figure 30**).

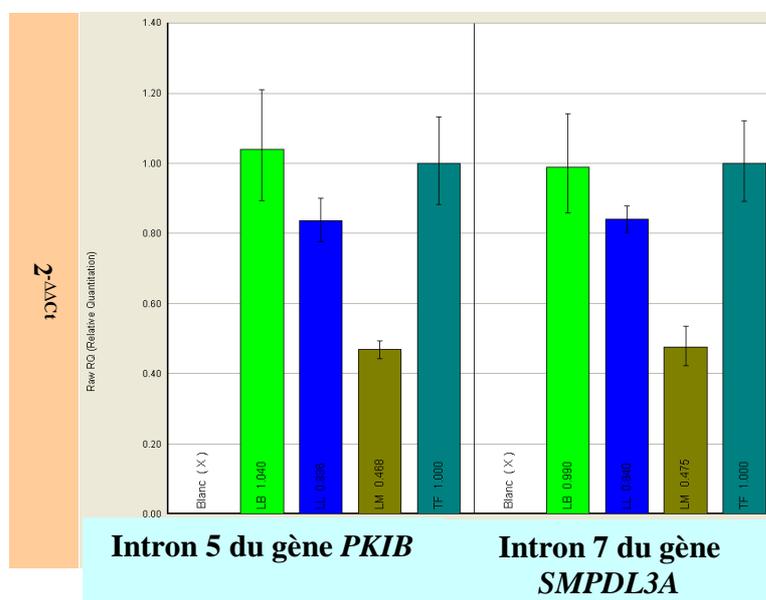


Figure 32 : Délétion *de novo* de la région 6q22.31 détectée par la PCR quantitative chez le probant. Cette délétion *de novo* est définie à partir de l'exon 6 du gène *PKIB* jusqu'au exon 7 du gène *SMPDL3A*. Le probant (brun), le père (bleu), la mère (vert) et le témoin femme (azure foncé).

4. Etude de l'expression du gène *FABP7*

Nous avons utilisé les 2 couples d'amorces au niveau des exons 1-2 et 2-3 pour étudier l'expression du gène *FABP7* sur des ARN extraits des lymphocytes. Le résultat n'est pas interprétable car le niveau d'expression dans le sang est insuffisant.

5. Séquençage de l'allèle normal du gène *FABP7*

L'allèle normal du gène *FABP7* est séquençé avec l'utilisation de 5 couples d'amorces au niveau des exons et des bornes exon/intron du gène *FABP7* ([NM_001446](#)). Nous n'avons pas trouvé de variation de la séquence du gène *FABP7*, résultat non en faveur d'une hypothèse d'un mécanisme mutationnel récessif.

V. Analyse chromosomique sur microréseau 1M spécifique des gènes de la déficience intellectuelle (ACM-1M-DIS)

Afin d'identifier des microremaniements de petite taille intragéniques, exoniques ou affectant des régions régulatrices des gènes reconnus ou candidats pour la DI, régions actuellement non couvertes correctement à l'aide des microréseaux utilisés, nous avons utilisé l'analyse chromosomique sur microréseau 1M spécifique des gènes de la déficience intellectuelle (ACM-1M-DIS). Nous avons analysé 46 patients atteints de DI sévère à modérée ayant au préalable tous bénéficié d'une expertise clinique et d'un bilan génétique exhaustif dont une analyse ACM 180K. Deux versions de la puce 1M ont été utilisées, la première version ciblant à très haute résolution 322 gènes et les régions intergéniques en amont et en aval et la deuxième, mise à jour à partir de données bibliographiques actualisées, ciblant 435 gènes et les régions intergéniques en amont et en aval. Nous avons testé 10 patients avec DI idiopathique avec la version 1 d'ACM-1M-DIS 322 gènes et 36 patients de DI idiopathique avec la version 2 d'ACM-1M-DIS 435 gènes, soit 46 patients au total. Le traitement des résultats obtenus se déroule en deux étapes principales : le contrôle de la qualité des hybridations sur microréseau d'ADN et ensuite si ces contrôles sont satisfaisants l'analyse et le filtrage des résultats et donc des régions génomiques en déséquilibre détectées.

1. Contrôle de la qualité des lame

Le logiciel Agilent Cytogenomics v.2.0 génère pour chaque lame ACM-1M-DIS analysée un fichier nommé « QC report » (QC pour Quality Control). Ce rapport indique plusieurs paramètres dont 7 sont présentés dans le **tableau 6** avec les valeurs limites attendues. **Le tableau 7** indique la valeur numérique des indicateurs qualité obtenus pour les 46 hybridations réalisées et **le tableau 8** récapitule pour les 46 patients les scores qualité obtenus classés en excellent, bon ou à évaluer.

Paramètres	Excellent	Bon	A évaluer
DLRS	<0.20	0.20 à 0.30	>0.30
Bruit du fond du signal vert	<5	5 à 15	>15
Intensité du signal vert/bruit du fond	>100	30 à 100	<30
Intensité du signal vert	>150	50 à 150	<50
Bruit du fond du signal rouge	<5	5 à 15	>15
Intensité du signal rouge/bruit du fond	>100	30 à 100	<30
Intensité du signal rouge	>150	50 à 150	<50

Tableau 6 : Critères et valeurs limites retenues pour l'évaluation de la qualité des lames 1M-DI.

Patient	DLRS	green_BG Noise	green_Signal 2 Noise	green_Signal Intensity	red_BG Noise	red_Signal 2 Noise	red_Signal Intensity
Patient 1	0,18	3,23	60,15	194,34	3,70	66,62	246,42
Patient 2	0,21	2,95	43,48	128,15	2,83	40,41	114,43
Patient 3	0,20	2,84	46,79	133,00	2,90	40,73	118,02
Patient 4	0,21	3,67	45,52	167,13	3,44	68,24	234,63
Patient 5	0,18	2,80	61,97	173,65	3,32	55,27	183,68
Patient 6	0,27	3,30	34,83	114,93	3,14	52,04	163,62
Patient 7	0,22	3,42	44,58	152,55	3,22	46,78	150,75
Patient 8	0,24	3,46	40,77	141,04	6,52	28,02	182,78
Patient 9	0,23	3,35	30,27	101,46	3,20	36,08	115,54
Patient 10	0,20	3,43	42,55	146,02	3,41	51,00	174,11
Patient 11	0,15	3,82	78,51	299,83	4,05	96,80	392,09
Patient 12	0,29	2,63	27,07	71,16	3,13	29,05	91,03
Patient 13	0,24	4,46	36,43	162,39	3,72	31,35	116,48
Patient 14	0,25	2,69	38,64	103,99	4,07	42,06	171,19
Patient 15	0,22	3,43	37,17	127,61	3,20	47,30	151,13
Patient 16	0,28	2,30	33,86	77,90	3,38	42,86	145,02
Patient 17	0,24	3,15	40,99	129,14	3,47	45,76	158,78
Patient 18	0,16	2,80	129,79	362,83	4,55	121,16	550,83
Patient 19	0,21	2,93	80,19	235,12	3,85	92,12	354,74
Patient 20	0,21	3,39	44,81	151,83	3,49	54,42	190,19
Patient 21	0,22	3,59	41,94	150,46	3,58	56,92	203,66
Patient 22	0,26	3,60	27,25	98,17	6,44	19,32	124,47
Patient 23	0,16	3,95	78,24	309,41	3,51	101,27	355,74
Patient 24	0,23	3,33	32,18	107,05	3,09	36,97	114,21
Patient 25	0,18	2,60	86,39	224,72	3,96	82,85	327,66
Patient 26	0,18	3,42	53,56	183,11	3,44	67,71	232,60
Patient 27	0,29	3,68	27,64	101,65	10,13	13,30	134,78
Patient 28	0,33	2,47	31,05	76,58	7,04	13,40	94,40
Patient 29	0,20	3,52	44,25	155,61	3,49	55,69	194,51

Patient 30	0,19	2,91	63,13	183,58	3,46	62,30	215,86
Patient 31	0,39	4,33	19,04	82,43	3,69	16,61	61,37
Patient 32	0,29	2,69	39,70	106,64	2,70	31,37	84,63
Patient 33	0,22	2,35	41,98	98,74	3,71	31,81	117,91
Patient 34	0,31	2,78	41,37	115,14	2,76	38,83	107,30
Patient 35	0,24	2,79	42,27	117,78	3,09	34,02	105,09
Patient 36	0,25	2,43	37,66	91,69	3,23	43,01	139,08
Patient 37	0,21	3,47	44,52	154,31	3,12	59,27	185,22
Patient 38	0,33	2,74	27,24	74,61	6,26	10,54	65,97
Patient 39	0,26	3,57	28,64	102,23	6,24	22,80	142,24
Patient 40	0,22	3,71	42,26	156,73	7,75	28,70	222,55
Patient 41	0,23	2,58	46,78	120,53	3,13	46,00	143,89
Patient 42	0,18	3,50	42,52	148,97	3,78	51,32	193,75
Patient 43	0,22	3,46	54,90	189,68	3,24	79,06	256,30
Patient 44	0,17	3,08	68,69	211,28	3,45	67,02	230,89
Patient 45	0,22	2,72	43,97	119,44	3,35	37,15	124,62
Patient 46	0,21	3,33	42,96	142,91	3,12	43,59	136,13
Moyenne	0,23	3,19	46,71	147,77	3,99	48,67	180,88
Maximum	0,39	4,46	129,79	362,83	10,13	121,16	550,83
Minimum	0,15	2,30	19,04	71,16	2,70	10,54	61,37
	<0,2 excellent	<5 excellent	>100 excellent	>150 excellent	<5 excellent	>100 excellent	>150 excellent
	0,2-0,3 good	5-15 good	30-100 good	50-150 good	5-15 good	30-100 good	50-150 good
	>0,3 evaluate	>15 evaluate	<30 evaluate	<3-50 evaluate	>15 evaluate	<30 evaluate	<3-50 evaluate

Tableau 7 : Valeurs des indicateurs qualité obtenus pour les 46 hybridations (scores excellents en vert, bons en bleu et à évaluer en rouge)

Paramètres	Excellent	Bon	A Evaluer
DLRS	13/46	29/46	4/46
Bruit du fond du signal vert	46/46	-	-
Rapport intensité du signal vert/bruit du fond	1/46	39/46	6/46
Intensité du signal vert	19/46	27/46	-
Bruit du fond du signal rouge	39/46	7/46	-
Rapport intensité du signal rouge/bruit du fond	2/46	35/46	9/46
Intensité du signal rouge	25/46	21/46	-

Tableau 8 : Scores qualité obtenus pour les lames de l'analyse chromosomique sur microréseau d'ADN 1M : excellent, bon ou à évaluer.

Les scores obtenus sont globalement très satisfaisants, en particulier, pour les intensités de signal fluorescent de la cyanine 3 et de la cyanine 5, les scores sont bons à excellents. La DLRS moyenne est à 0,23 et le signal moyen à 147,77 pour le vert et 180,88 pour le rouge. Nous avons

exclu de l'analyse un patient (patient n° 46 dans le tableau 7) pour lequel, malgré des scores de qualité satisfaisants et comparables aux autres patients (donc une hybridation correcte), l'analyse n'était pas possible en raison de la présence de nombreux artefacts : 435 variations sont détectées avec une taille moyenne de 2,3 Mb (soit 750 sondes déviantes en moyenne par CNV), ce qui représente 326 068 oligonucléotides déviants au total pour ce patient, soit environ un oligonucléotide sur 3 de la lame 1M. Ce résultat ininterprétable est probablement lié à un ADN de mauvaise qualité (dégradation).

2. Analyse des lames de l'analyse chromosomique sur microréseau d'ADN 1M-DIS

2.1. Analyse des régions génomiques en déséquilibre étape par étape en fonction des critères d'analyse chromosomique sur microréseau d'ADN 1M-DIS

2.1.1. Données obtenues

Après avoir scanné la lame aux 2 longueurs d'onde des cyanines 3 et 5 une image haute résolution au format informatique .tiff est obtenue. Les logiciels Agilent Feature Extraction[®] et Agilent CytoGenomics[®] permettent ensuite d'extraire puis d'analyser les données à partir de cette image. Pour chaque oligonucléotide, le rapport d'intensité des signaux rouge et vert est calculé et une grille propre au format de la lame utilisé permet d'assigner chaque spot à une position génomique. **Le tableau 9** indique le nombre de CNV détectés pour chacun des 45 patients retenus en fonction des seuils appliqués pour l'analyse. Les résultats de la colonne située à gauche correspondent au nombre de CNV détectés par au moins 3 sondes déviantes consécutives avec un \log_2 ratio inférieur ou égal à -0,25 pour les pertes et supérieur ou égal à +0.25 pour les gains. La colonne du milieu indique le nombre de CNV correspondant à au moins 10 sondes consécutives déviantes et un \log_2 ratio inférieur ou égal à -0.60 pour les délétions et supérieur ou égal à +0.30 pour les amplifications. La colonne de droite indique le nombre de CNV correspondant à au moins 20 sondes consécutives déviantes et un \log_2 ratio inférieur ou égal à -0.60 pour les délétions et supérieur ou égal à +0.30 pour les amplifications. Pour l'analyse des ACM-1M-DIS, nous avons retenu pour la suite un seuil à 10 sondes consécutives déviantes et un \log_2 ratio inférieur ou égal à -0.60 pour les délétions et supérieur ou égal à +0.30 pour les amplifications (colonne du milieu). Ce seuil permet de retenir un total de 2101 CNV pour les 45 patients, soit en moyenne 46.7 CNV par patient avec un minimum à 26 et un maximum à 87 CNV pour un patient.

Patient	N°	Nb CNV (seuil à 3 sondes et log ₂ ratio à +/-0,25)	Nb CNV (seuil à 10 sondes et log ₂ ratio inf ou égal à -0.60 pour les del et sup ou égal à +0.30 pour les ampli)	Nb CNV (seuil à 20 sondes et log ₂ ratio inf ou égal à -0.60 pour les del et sup ou égal à +0.30 pour les ampli)
Patient	1	333	59	26
Patient	2	304	56	19
Patient	3	287	59	16
Patient	4	267	55	17
Patient	5	127	40	14
Patient	6	393	84	29
Patient	7	269	63	25
Patient	8	212	42	16
Patient	9	135	43	16
Patient	10	274	51	19
Patient	11	259	48	20
Patient	12	110	40	15
Patient	13	372	87	41
Patient	14	169	35	14
Patient	15	315	58	21
Patient	16	127	42	17
Patient	17	194	55	18
Patient	18	137	34	8
Patient	19	253	50	24
Patient	20	330	66	26
Patient	21	159	52	18
Patient	22	174	48	14
Patient	23	137	35	12
Patient	24	235	53	23
Patient	25	116	34	7
Patient	26	131	30	10
Patient	27	88	34	16
Patient	28	98	42	21
Patient	29	368	85	33
Patient	30	132	36	14
Patient	31	58	31	10
Patient	32	74	26	11
Patient	33	169	40	16
Patient	34	214	53	22
Patient	35	110	27	10
Patient	36	147	33	11
Patient	37	168	42	20
Patient	38	77	30	15
Patient	39	148	38	13
Patient	40	270	57	20
Patient	41	105	30	7
Patient	42	222	43	17
Patient	43	338	62	20
Patient	44	136	39	17
Patient	45	145	34	11
Total		8886	2101	789
Moyenne		197,47	46,69	17,53
Médiane		169	42	17
Maxi		393	87	41
Mini		58	26	7

Tableau 9 : Nombre de CNV détectés selon les différents seuils appliqués

2.1.2. Critères utilisés pour le filtrage des données

Les intervalles génomiques en déséquilibre sont analysés en fonction des critères suivants

- Le nombre de sondes dans la région en déséquilibre: notre choix sur cette puce de 1M s'est porté sur une déviation intéressant au moins 10 sondes.
- Le \log_2 ratio de la région génomique déséquilibrée : les CNV retenus sont les délétions avec un \log_2 ratio inférieur ou égal à -0,60 et les amplifications avec un \log_2 ratio supérieur à +0.30 pour les duplications.
- Compte tenu de l'hétérogénéité génétique de la DI, les variations du nombre de copies retrouvées chez plus de 3 patients de notre série de 45 patients ont été considérées, a priori, comme les variations du nombre de copies récurrentes et "bénignes", sans lien direct avec le phénotype.
- L'interprétation des données issues de l'ACM-1M-DIS utilise la base de données des variants génomiques, DGV (<http://dgv.tcag.ca/>). Ont uniquement été éliminées de l'analyse les polymorphismes décrits par plusieurs études et avec des bornes identiques permettant de valider le caractère de CNP (Polymorphisme de nombre de copie)
- La localisation génomique de la région en déséquilibre : les régions qui couvrent une partie des séquences codantes des gènes candidats (régions exoniques) sont en priorité contrôlées par la PCR quantitative. Dans un deuxième temps, les déséquilibres au niveau intronique ou intergénique peuvent également être contrôlés. La confirmation du remaniement conduit ensuite à rechercher son mode d'apparition, *de novo* ou hérité, par l'analyse parentale, notion indispensable pour l'interprétation du résultat.
- Les sites Genecards (<http://www.genecards.org/>), OMIM (<http://www.omim.org/>) et Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) sont régulièrement consultés ainsi que DECIPHER (<http://decipher.sanger.ac.uk/>) pour obtenir en permanence des données à jour sur les gènes candidats associés à la déficience intellectuelle.
- La corrélation entre le gène candidat de déficience intellectuelle touché par le déséquilibre et le phénotype observé chez le cas-index est systématiquement analysée.

2.1.3. Algorithme d'analyse

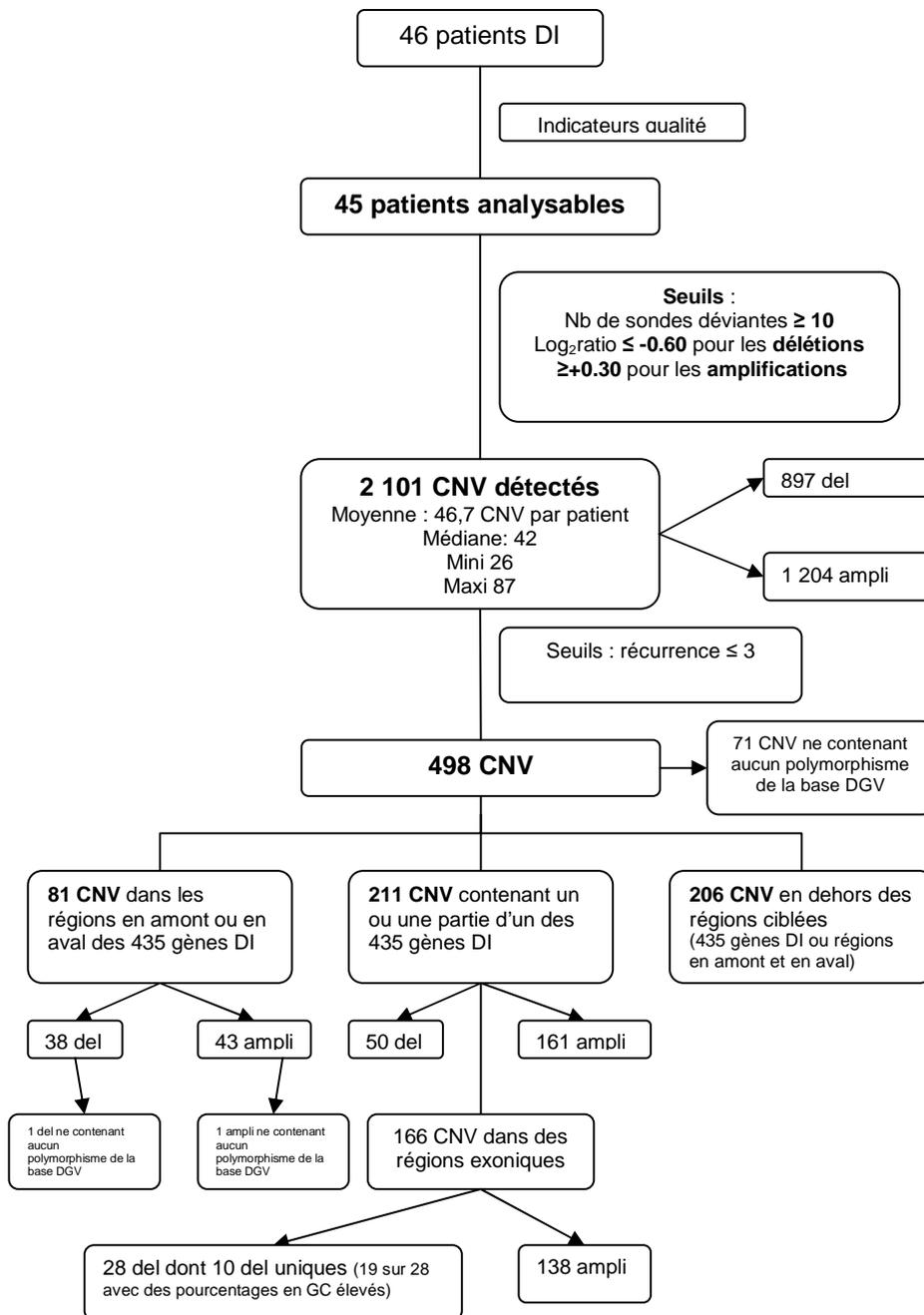


Figure 33 : Algorithme d'analyse des résultats des 46 patients avec DI par l'ACM-1M-DIS Amplification (ampli), délétion (del)

Nous avons étudié une cohorte de 46 patients par ACM-1M-DIS. Sur ces 46 patients, nous avons obtenu des résultats interprétables pour 45 comme indiqué dans le paragraphe V.1. Ce patient a donc été éliminé de l'étude.

Nous avons détecté un total de **8 886 CNV** pour les 45 patients analysés (seuil de 3 sondes consécutives déviés et \log_2 ratio à +0,25) (**Tableau 9**). Nous avons appliqué un filtre à 10 sondes consécutives minimum et un \log_2 ratio inférieur ou égal à -0.60 pour les pertes et supérieur ou égal à +0.30 pour les gains (**cf algorithme en figure 33**). Nous obtenons ainsi un total de **2 101 CNV** détectés dont 897 pertes et 1 204 gains, ce qui correspond à un nombre moyen de CNV de 46,7 par patient. Nous avons ensuite appliqué un filtre de récurrence en considérant que les CNV retrouvé chez plus de 3 patients de la cohorte sont probablement du polymorphisme compte tenu de l'hétérogénéité génétique de la DI. Nous obtenons après application de ce filtre **498 CNV**. Une comparaison des régions en déséquilibre identifiées à la base de données DGV montre que 71 de ces 498 CNV ne contiennent aucun polymorphisme décrit (cf liste de ces 71 CNV en **annexe 4**). Nous n'avons pas retenu ce filtre pour la suite de l'analyse car les polymorphismes de la base DGV ne sont pas vérifiés par une seconde technique et sont souvent de taille beaucoup plus grande que les CNV détectés par notre ACM-1M-DIS. Nous avons donc ensuite trié les CNV observés en fonction de leur contenu : **81 CNV touchent les régions en amont ou en aval des 435 gènes candidats ciblés** (cf liste de ces 81 CNV en **annexe 5**) ; 211 CNV contiennent une partie d'un des 435 gènes (introniques et/ou exoniques) (cf liste de ces 211 CNV en **annexe 6**) dont **166 au moins une région exonique** (cf liste de ces 166 CNV en **annexe 7**) ; enfin 206 CNV sont en dehors des régions ciblées. Parmi les 166 CNV contenant au moins une région exonique d'un des 435 gènes ciblés, 138 sont des gains et **28 sont des délétions** (cf liste de ces 28 délétion CNV en **annexe 8**) dont **10 ne sont retrouvées que chez un patient parmi les 45 analysés** (**Tableau 10**). Dix neuf des 28 délétions exoniques observées touchent des régions très riches en GC (>55% GC) et correspondent souvent à l'exon 1 du gène, il s'agit probablement de faux positifs (**Tableau 11**).

Parmi les 10 délétions uniques (**Tableau 10**), une est une délétion partielle *de novo* et délète du gène *ZEB2* correspondant à un syndrome de Mowat-Wilson. Une deuxième est une délétion 15q11.2 emportant la totalité du gène *NIPAI* et étiquetée récemment comme un facteur de susceptibilité aux troubles neurologiques (Burnside et al., 2011) mais cette délétion est de grande

taille (452 kb) et avait été mise en évidence par l'ACM 180K. Elle était en outre héritée de la mère asymptomatique.

Chr	Bande	Début	Fin	Taille	Nb sondes	Log2ratio del	p value	Gène DI	Mode transmission	Disorder
chr1	q31.3	197 114 518	197 115 824	1 306	27	-0,723433	2,16E-47	ASPM	AR	MCPH5 Microcephaly vera OMIM : The mutations occurred throughout the ASPM gene and were all predicted to be protein truncating.
chr1	q43	241 518 910	241 522 090	3 180	17	-0,663868	5,18E-16	RGS7	AR	PMID: 21937992 Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders.
chr10	q23.1	84 712 282	84 717 217	4 935	29	-0,970426	3,76E-105	NRG3	AD	10q23 deletion
chr15	q11.2	22 756 650	23 208 901	452 251	531	-0,821627	0	NIPA1	AD	vu sur 180 K, 15q11.2 BP1 BP2 recurrent deletion
chr2	q22.3	145 147 560	145 175 929	28 369	301	-0,895855	0	ZEB2	AD	Mowat-Wilson syndrome : severe mental retardation and multiple congenital anomalies
chr2	q31.1	172 340 391	172 340 562	171	15	-0,984377	9,16E-25	DCAF17	AR	Mutations in C2orf37 cause hypogonadism, alopecia, diabetes mellitus, mental retardation, and extrapyramidal syndrome - Woodhouse-Sakati syndrome
chr5	q11.2	58 335 067	58 336 716	1 649	17	-0,785687	2,41E-44	PDE4D	AD	PMID: 22464250 Exome sequencing identifies PDE4D mutations as another cause of acrodysostosis. Acrodysostosis is a rare autosomal-dominant condition characterized by facial
chr6	q25.3	157 256 617	157 256 766	149	10	-0,688264	1,98E-14	ARID1B	AD	Corpus Callosum Abnormalities, Intellectual Deficiency, Speech Impairment, and Autism
chr7	q21.3	96 633 627	96 636 951	3 324	16	-0,727297	5,59E-21	DLX6	Gène candidat	A highly conserved enhancer in the Dlx5/Dlx6 intergenic region is the site of cross-regulatory interactions between Dlx genes in the embryonic forebrain.
chr9	p24.3	215 581	215 789	208	11	-0,788529	5,49E-14	DOCK8	AD	Mental retardation and developmental disabilities

Tableau 10 : 10 délétions exoniques uniques (détectées chez un seul parmi les 45 patients).

Chr	Bande	Début	Fin	Taille	Nb sondes	log2ratio del	p value	réurrence	GC percent : high >55, low <55	Gène DI	exon 1	commentaire	Mode transmission
chr1	q31.3	197 114 518	197 115 824	1 306	27	-0,723433	2,16E-47	1	high	ASPM_aval, ASPM	oui		AR
chr1	q43	241 518 910	241 522 090	3 180	17	-0,663868	5,18E-16	1	high	RGS7_aval, RGS7	oui	Douteux	
chr1	q44	245 026 031	245 028 113	2 082	11	-0,918233	1,88E-34	3	high	HNRPU_aval, HNRPU	oui	Récurrent >2	
chr11	q14.2	88 242 022	88 243 239	1 217	24	-0,999674	1,78E-98	3	high	GRM5		Récurrent >2	
chr13	q12.13	26 043 206	26 044 260	1 054	11	-0,672485	2,64E-13	2	high	ATP8A2	oui	Douteux	
chr14	q11.2	21 899 065	21 899 359	294	12	-0,721779	3,05E-16	3	high	CHD8	oui	Récurrent >2	
chr17	q21.31	43 972 592	43 974 524	1 932	31	-0,718227	2,06E-53	3	high	MAPT	oui	Récurrent >2	
chr17	q25.3	80 038 396	80 058 648	20 252	196	-0,621229	8,81E-138	3	high	FASN_aval, FASN		Polymorphisme	
chr18	q21.2	53 254 878	53 255 877	999	21	-1,374359	6,57E-145	2	high	TCF4_aval, TCF4	oui		AD

chr22	q11.21	19 751 561	19 756 014	4 453	37	0,60191 2	2,22E-16	3	high	TBX1		Récurrent >2	
chr22	q13.2	41 487 420	41 489 187	1 767	18	0,98512 3	2,75E-39	2	high	EP300_ament, EP300	oui		AD
chr3	p21.31	45 634 677	45 636 494	1 817	13	0,66924 6	1,21E-22	3	high	LIMD1_ament, LIMD1	oui	Récurrent >2	
chr3	p21.2	51 418 350	51 418 960	610	25	0,61271 1	3,22E-45	2	high	DOCK3			AD
chr5	q11.2	58 335 067	58 336 619	1 552	16	0,81818 1	2,03E-44	2	high	PDE4D	oui		AD
chr5	q11.2	58 335 067	58 336 716	1 649	17	0,78568 7	2,41E-44	1	high	PDE4D	oui		AD
chr6	p21.31	34 023 304	34 024 354	1 050	11	0,79685 4	1,25E-23	3	high	GRM4		Récurrent >2	
chr7	q21.3	96 633 627	96 636 951	3 324	16	0,72729 7	5,59E-21	1	high	DLX6_ament, DLX6	oui		Gène candidat
chr9	q31.2	110 251 190	110 257 646	6 456	31	0,69762 2	2,35E-19	2	high	KLF4_aval, KLF4	oui		AD
chrX	p22.31	6 144 067	6 145 438	1 371	11	0,96388 7	8,46E-33	3	high	NLGN4X	oui	Douteux	
chr10	q23.1	84 712 282	84 717 217	4 935	29	0,97042 6	3,76E-105	1	Low	NRG3		Polymorphisme	AD
chr15	q11.2	22 756 650	23 208 901	452 251	531	0,82162 7	0	1	Low	NIPA1_ament, NIPA1_aval, NIPA1		VOUS, détecté sur 180K	AD
chr15	q26.3	101 110 128	101 110 289	161	12	0,63669	9,45E-22	3	Low	LINS1			AR
chr2	q22.3	145 147 560	145 175 929	28 369	301	0,89585 5	0	1	Low	ZEB2		Délétère	AD
chr2	q31.1	172 340 391	172 340 562	171	15	0,98437 7	9,16E-25	1	Low	DCAF17		Douteux	AR
chr3	p21.2	51 378 716	51 378 843	127	10	0,69890 6	1,02E-18	3	Low	DOCK3			AD
chr5	q35.3	178 403 611	178 405 459	1 848	13	0,70758 1	1,63E-14	3	Low	GRM6_ament, GRM6			Gène candidat
chr6	q25.3	157 256 617	157 256 766	149	10	0,68826 4	1,98E-14	1	Low	ARID1B			AD
chr9	p24.3	215 581	215 789	208	11	0,78852 9	5,49E-14	1	Low	DOCK8			AD

Tableau 11 : Pourcentage en GC des 28 délétions exoniques détectées (« high » si >55%, « low » si <55%). Mode de transmission : AR, autosomique récessif et AD, autosomique dominant.

N.B. : Nous avons utilisé l'outil Galaxy (<https://main.g2.bx.psu.edu/>) afin de réaliser le filtrage des régions génomiques (pour identifier les régions géniques, exoniques ou intergéniques et les régions correspondants aux 435 gènes ciblés) et pour comparer les régions en déséquilibre aux régions décrites comme polymorphes (Blankenberg et al., 2010 ; Giardine et al., 2005 ; Goecks et al., 2010).

2.2. Contrôle des déséquilibres génomiques par la PCR quantitative (qPCR)

2.2.1. CNV contrôlés par qPCR

Les régions génomiques en déséquilibre que nous avons considérés comme "potentiellement pathogènes" doivent être contrôlées par une seconde technique (PCR quantitative ou autre) afin de s'assurer qu'il ne s'agit pas de faux positifs et ensuite déterminer leur caractère hérité ou *de novo*, notion indispensable pour l'interprétation du résultat. Etant donné le nombre important de CNV détectés avec cette analyse à très haute résolution, il n'était pas possible de contrôler tous ces CNV. Nous avons donc étudié en priorité les CNV retenus en fonction de la probabilité qu'ils soient pathogènes, cette probabilité étant estimée grâce aux critères que nous avons décrits dans le paragraphe 2.1. Nous avons retenu dans un premier temps 30 régions en déséquilibres que nous avons contrôlées par PCR quantitative, nous avons pour cela utilisé 44 couples d'amorces différents (**Tableau 12**).

Positions des CNV détectés par l'ACM-1M-DIS (hg19)	Nb de sondes	Log ₂ ratio	Taille de l'anomalie en pb	Gène(s)	Nb de qPCR	Résultats
Chr1:197,114,840-197,115,824	26	-1.57	985	<i>ASPM*</i> (AR) (E)	1	Faux positif
Chr1 : 7,115,567-7,119,047	20	-0.59	3480	<i>CAMTA1*</i> (AD) (I)	2	Hérité de la mère
Chr2:145,147,560-145,175,929	301	-0.9	28370	<i>ZEB2*</i> (AD) (E)	2	Délétion <i>de novo</i>
Chr2:145,273,849-145,275,021	13	-1.8	1173	<i>ZEB2*</i> (AD) (E)	1	Faux positif
Chr2:145,273,849-145,275,266	16	+1.1	1418	<i>ZEB2*</i> (AD) (E)	1	Faux positif
Chr2:145,273,849-145,274,954	11	+0.7	1106	<i>ZEB2*</i> (AD) (E)	1	Faux positif
Chr2:145,273,849-145,275,266	16	-1.45	1418	<i>ZEB2*</i> (AD) (E)	1	Faux positif
Chr2:148,743,138-	15	-0.89	5366	<i>ORC4L</i> (CG)	2	Héritée de

148,748,513				(I)		la mère
Chr2:166,226,588- 166,226,772	16	+0.5 1	185	SCN2A* (AD) (E)	1	Faux positif
Chr3: 85,489,737- 85,603,669	22	-1.1	113933	CADM2 (I)	2	Héritée de la mère
Chr3:51,418,351- 51,418,730	20	-1.32	380	DOCK3* (CG) (E)	1	Faux positif
Chr4:56,432,996- 56,691,877	35	-0.87	186882	PDCL2 et LOC644145	2	Hérité de la mère
Chr4:149,907,585- 149,115,725	39	-1	791861	ARHGAP10 et NR3C2	1	Faux positif
Chr4:82,392,474- 82,393,940	10	+0.8	1466	RASGEF1B* (CG) (E)	1	Faux positif
Chr5:14,871,451- 14,871,888	13	-1.05	438	ANKH* (AR) (E)	1	Faux positif
Chr5:178,405,302- 178,405,459	11	-0.88	158	GRM6* (CG) (E)	1	Faux positif
Chr6:107,811,788- 107,811,937	11	- 2.8/- 0.7/- 2.3	151	SOBP* (AR) (E)	3	Faux positif
Chr7:103,266,210- 103,268,157	10	-1	1,947	RELN* (AR) (I)	2	Héritée de la mère
Chr11:644,225- 644,438	15	-1.25	214	DEAF1 (CG) (E)	1	Faux positif
Chr11:126,310,154- 126,310,713	19	-0.84	560	KIRREL3 (AD) (E)	1	Faux positif
Chr13:26,043,206- 26,044,260	11	-0.7	1055	ATP8A2* (AR) (I)	1	Faux positif
Chr14:29,236,516- 29,238,985	103	-0.36	2470	FOXG1* (AD) (E)	3	Faux positif

Chr14:102,452,461-102,452,995	13	+0.57	534	<i>DYNC1H1</i> * (AD) (E)	1	Faux positif
Chr17:29,551,529-29,558,412	59	+0.56	7884	<i>NF1</i> * (AD) (I)	2	Héritée de la mère
Chr17:29,591,906-29,594,654	14	0.67	2749	<i>NF1</i> * (AD) (I)	2	Faux positif
Chr19:13,209,214-13,209,637	15	0.86	424	<i>NFIX</i> * (AD) (E)	1	Faux positif
Chr19:53,522,243-53,603,328	16	0.62	81086	<i>ZNF160</i> (E)	2	Faux positif
Chr21:46,246,130-46,301,102	14	-0.5	54973	<i>PTTG1IP</i> (E)	2	Faux positif
Chr22:41,487,420-41,489,187	18	-0.99	1768	<i>EP300</i> * (AD) (E)	1	Faux positif
Chr22:41,572,801-41,574,751	102	-0.51	1951	<i>EP300</i> * (AD) (E)	1	Faux positif

Tableau 12 : Récapitulatif des contrôles par qPCR des résultats de l'ACM-1M-DIS, nous avons réalisé 44 réactions de PCR quantitative pour contrôler 30 régions en déséquilibre. Sur ces 30 régions, 23 régions sont en fait des faux-positifs (couleur orange), 6 déséquilibres sont hérités d'un parent asymptomatique (couleur verte) et une anomalie est survenue *de novo* et est délétère (en rose).

AD : mode de transmission autosomique dominant, AR : mode de transmission autosomique récessif, CG : gène candidat, *gènes ciblés sur l'ACM-1M-DIS, E : exonique, I : intronique.

2.2.2. Quelques exemples de contrôles par PCR quantitative

2.2.2.1. Un exemple d'un faux-positif

Une délétion exonique d'une taille de 157 pb touchant la fin de l'exon 10 (dernier exon) du gène *GRM6* (récepteur du glutamate, récepteur couplé aux protéines G) située en 5q35.3, position génomique *chr5:178,405,302-178,405,459* (UCSC build hg 19), correspondant à 11 sondes déviantes avec un \log_2 ratio moyen à -0.88 est en fait un faux positif (**Figure 34**).

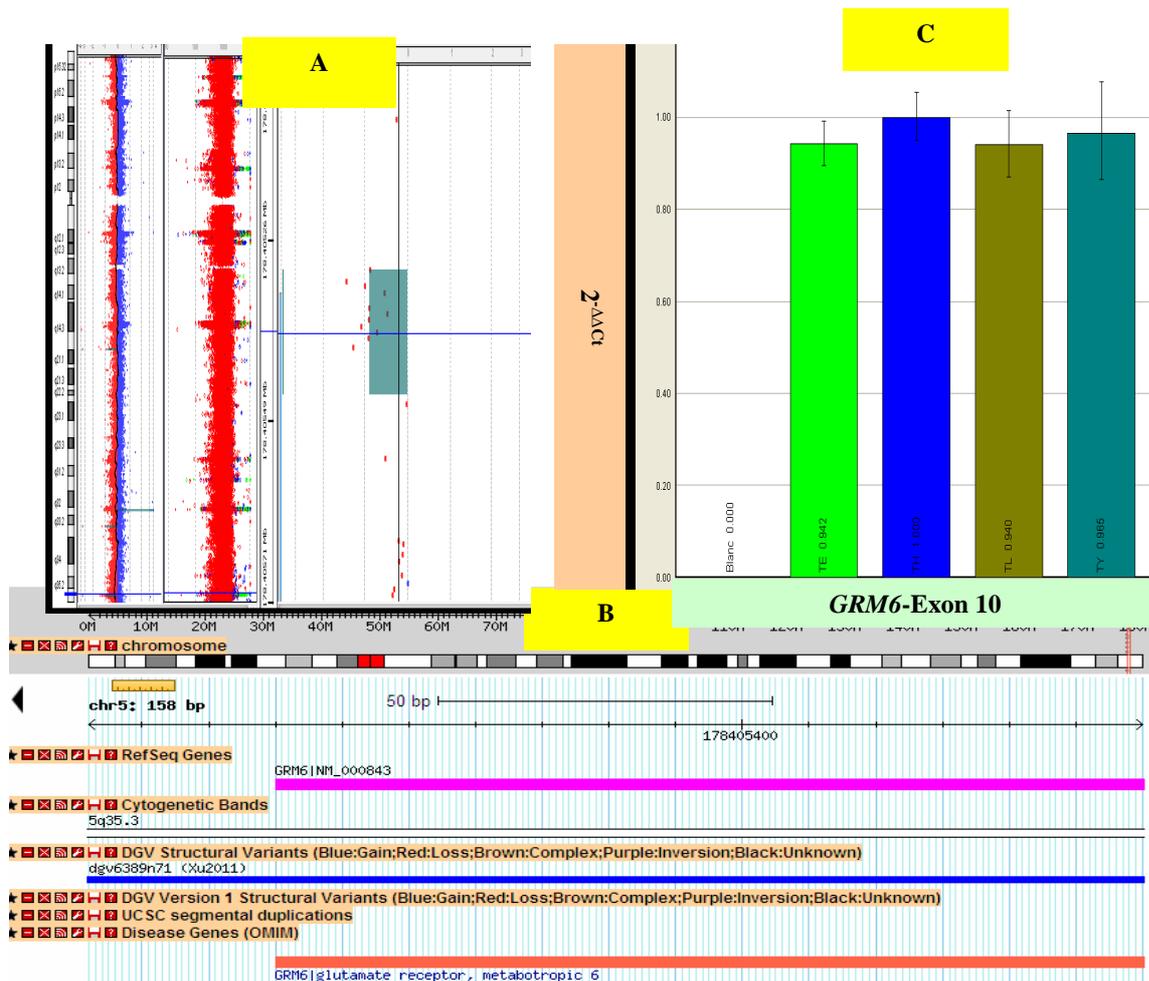


Figure 34 : A : résultat de l'ACM-1M-DIS montrant la délétion d'une taille de 157 pb au niveau de l'exon 10 du gène *GRM6* avec 11 sondes déviantes et un \log_2 ratio à -0.88 ; B : cette délétion contient la fin de l'exon 10, dernier exon du gène *GRM6* (base de donnée DGV) ; C : résultat du contrôle par la PCR quantitative ne confirmant pas la présence de la délétion (le probant est en couleur bleue, la mère en brun, le père en azur et le témoin femme en couleur verte).

2.2.2.2. Un exemple d'une région déséquilibrée héritée d'un parent

Une délétion intronique (intron 20) d'une taille de 1 948 pb du gène *RELN* en 7q22.1, avec 10 sondes déviantes, en position *chr7:103,266,210-103,268,157* (UCSC build hg 19), \log_2 ratio à -1, a été confirmé par qPCR et est hérité de la mère du patient en bonne santé. Le gène *RELN* est responsable de lissencéphalie de type 2 (*MIM600514*) (**Figure 35**).

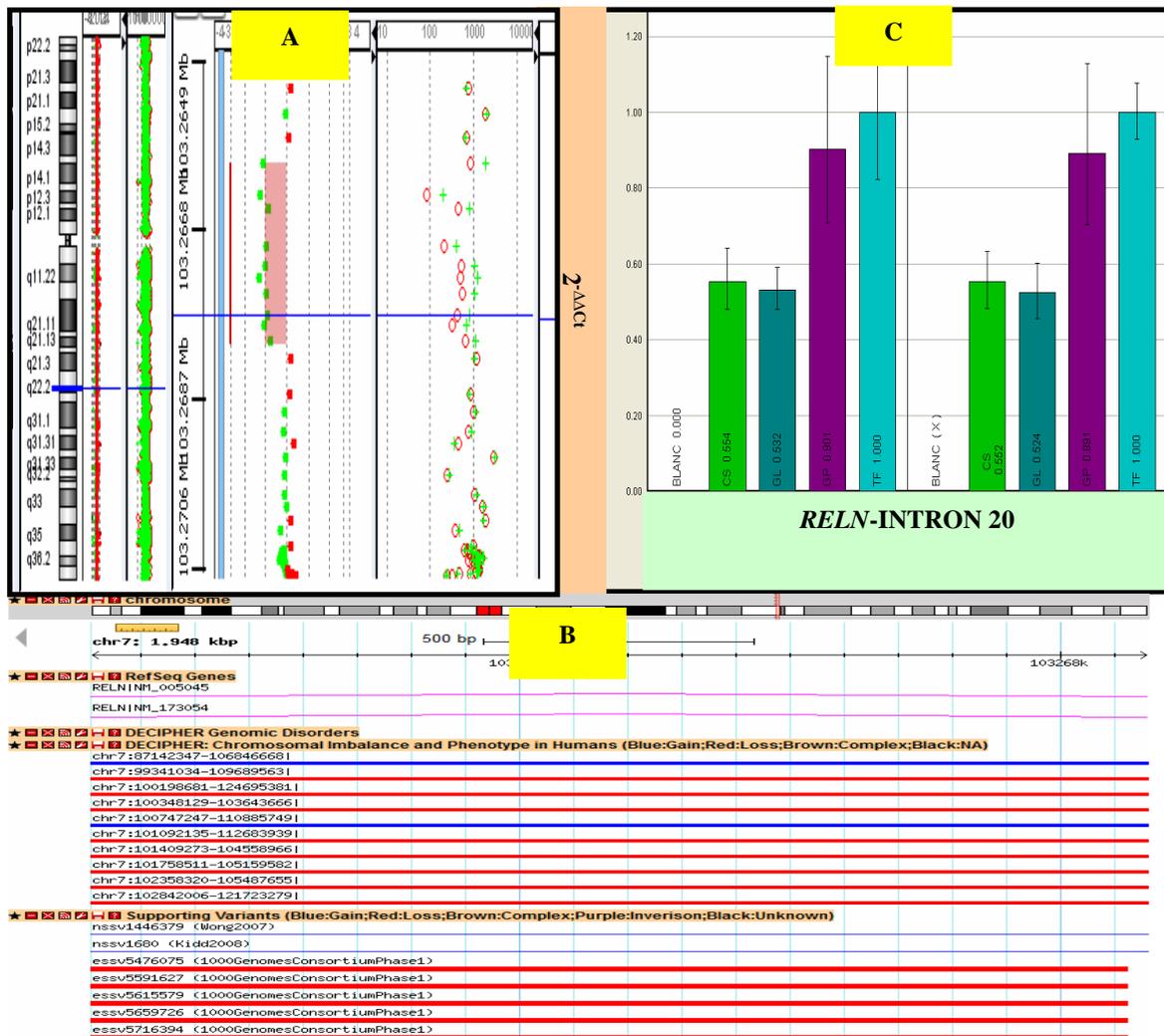


Figure 35 : A : résultat de l'ACM-1M-DIS montrant la délétion interstitielle d'une taille de 1 948 pb en 7q22.1, 10 sondes déviantes, \log_2 ratio à -1, qui interrompt le gène *RELN* ; B : la délétion se situe au niveau de l'intron 20 du gène *RELN* ; C : résultat de la PCR quantitative montrant que cette délétion est héritée de la mère (le probant est en couleur azur foncée, la mère est en vert, le père est en violet et le témoin femme est en azur clair).

2.2.2.3. Une délétion *de novo* chez une patiente avec une déficience intellectuelle sévère liée au gène *ZEB2*

2.2.2.3.1. Observation clinique

Il s'agit d'une fille de 8 ans née à l'issue d'une grossesse de 34 semaines, de parents non consanguins. L'échographie prénatale avait montré une clarté nucale. Le poids de naissance est de 2080 g pour une taille de 44 cm et un périmètre crânien de 29.8 cm. Ces paramètres sont inférieurs à -2DS. Une hypotonie néonatale, des difficultés alimentaires et un retard à la prise de poids sont relevés. Les explorations cardiaques mettent en évidence une valve aortique bicuspide, une communication interauriculaire. Les autres anomalies congénitales sont un reflux vésico-urétéral unilatéral et des pieds équins. Un retard de langage est observé précocement avec seuls quelques mots à l'âge de 36 mois. Le développement moteur semble dans les limites de la normale. Le diagnostic de déficience intellectuelle sévère a été porté. Lors de la consultation de génétique, à 8 ans, le poids est de 13,5 kg, la taille 93 cm et le périmètre crânien de 46,5 cm.. L'examen cranio-facial montre une microcéphalie, un visage triangulaire et allongé, un hypertélorisme, des oreilles avec de grands lobes remontés possédant une dépression centrale, une lèvre inférieure éversée (**Figure 36**). Elle a un caractère joyeux et affectueux. L'examen d'IRM cérébrale montre une agénésie du corps calleux. Le caryotype en bandes G (résolution de 550 bandes) est normal 46,XX. L'étude en technique de FISH (Hybridation in situ en fluorescence) avec les sondes spécifiques des locus 17p11.2, 7q11.2, 11p/11q subtélomérique, 15q11q13 est normale. L'étude du profil de méthylation de l'ADN au locus 15q11q13 a montré une double contribution parentale. L'examen par séquençage du gène *PTPN11* (Protein tyrosine phosphatase, non receptor type 11) est normal. Une première analyse ACM, à l'aide d'un microréseau de résolution de 105K (Agilent) n'a pas détecté de variation du nombre de copies à l'exception des régions polymorphes.

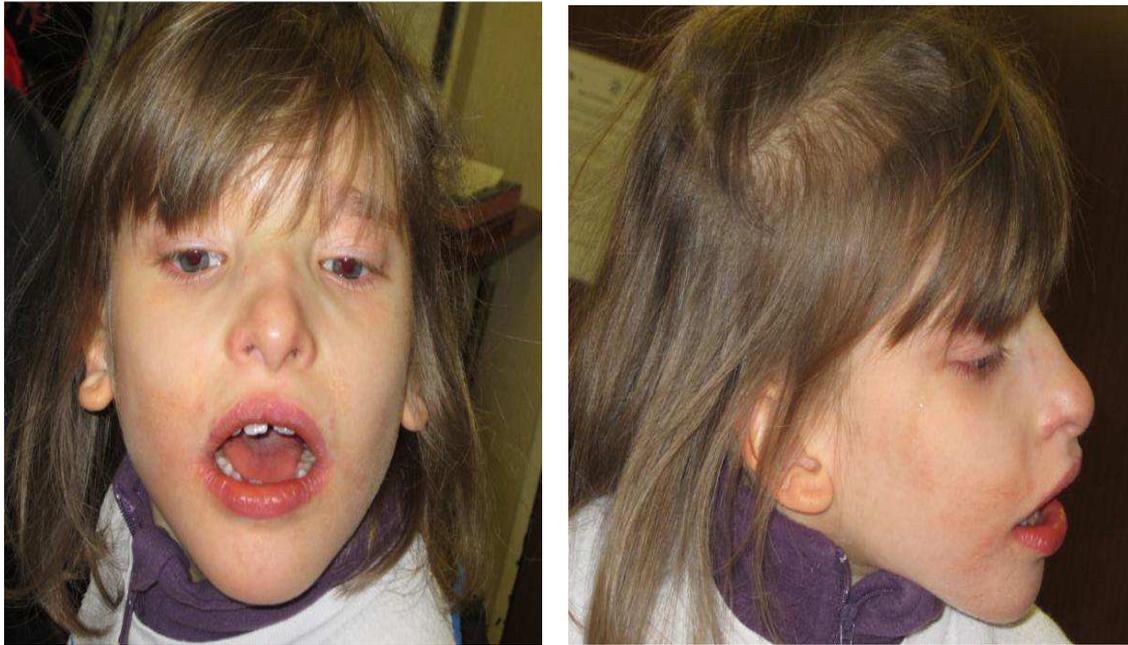


Figure 36 : Photographie de la patiente de face et de profil à l'âge de 8 ans montrant un visage triangulaire et allongé, hypertélorisme, oreilles avec de grands lobes remontés, racine du nez large, nez bulbeux, columelle proéminente, bouche ouverte avec une lèvre inférieure éversée et un prognathisme.

2.2.2.3.2. Résultat de l'ACM-1M-DIS

L'ACM-1M-DIS a détecté une délétion d'une taille de 28,37 kb du gène *ZEB2* (NM_014795.3) : arr[hg19] 2q22.3(145,147,560-145,175,929)x1 avec \log_2 ratio moyen à -0.89 (**Figure 37**). Cette délétion emporte les exons 5 à 10 du gène *ZEB2* (**Figure 38**), ce gène est impliqué dans le syndrome de Mowat-Wilson.

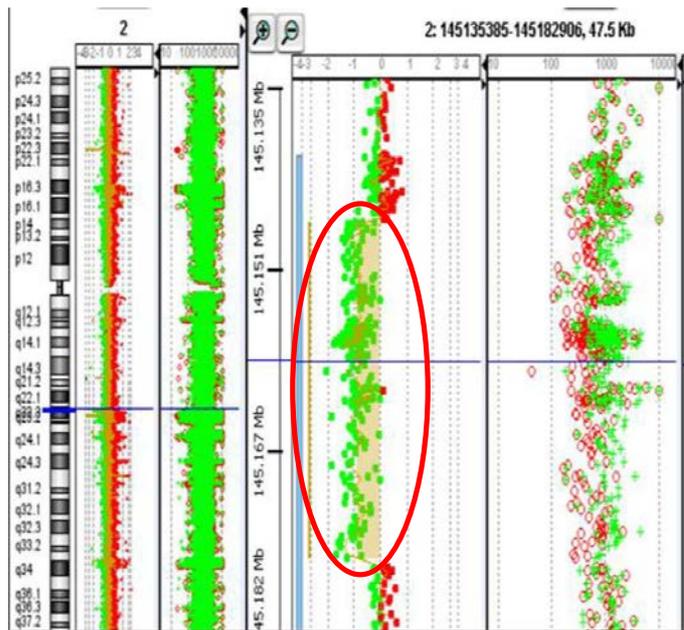


Figure 37 : Résultat de l'ACM-1M-DIS avec une délétion interstitielle d'une taille de 28,37 kb du gène *ZEB2* avec 301 sondes déviantes.

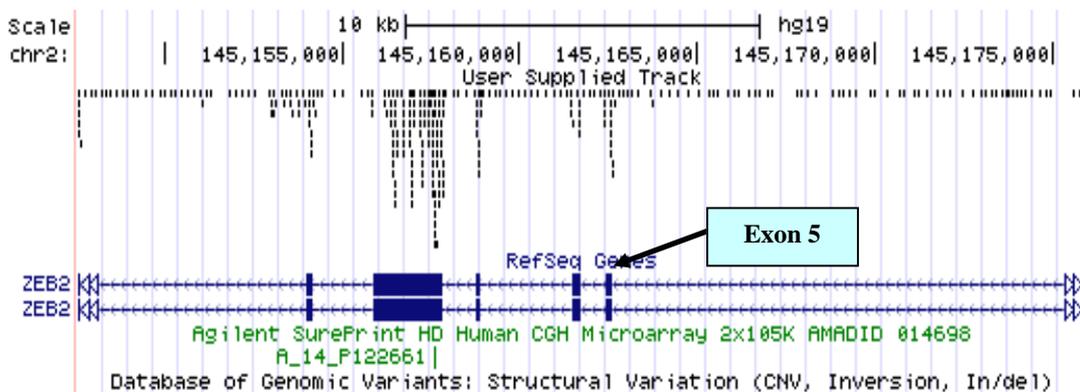


Figure 38 : Délétion 2q22.3 touchant partiellement le gène *ZEB2* à partir de l'exon 5 identifiée par ACM-1M-DIS (UCSC) ; User Supplied Track : position des 301 sondes déviantes de l'ACM-1M-DIS ; RefSeq Genes : exons et introns des gènes RefSeq, ici les exons 5 à 9 du gène *ZEB2* sont représentés ; Agilent SurePrint HD Human CGH Microarray 2x105K AMADID 014698 : position de la sonde déviante sur l'ACM 105 K (A_14_P122661) ; Database of Genomic Variants : absence de polymorphisme décrit dans cette région génomique.

2.2.2.3.3. Résultat de l'ACM 105K en 2q22.3

En fonction des résultats de l'ACM-1M-DIS et en raison de la présence d'une sonde sur l'ACM 105K dans la région déléetée, nous avons rétrospectivement repris les résultats bruts de l'ACM 105K réalisée auparavant. En effet, pour l'oligonucléotide A_14_P122661 positionné en chr2:145,157,585-145,157,644 (hg19), le \log_2 ratio obtenu est à -1 indiquant une délétion à cette position. Ce résultat n'avait pas été retenu puisque le seuil est fixé à un minimum de 3 sondes consécutives déviantes pour considérer un CNV (**Figure 39**).

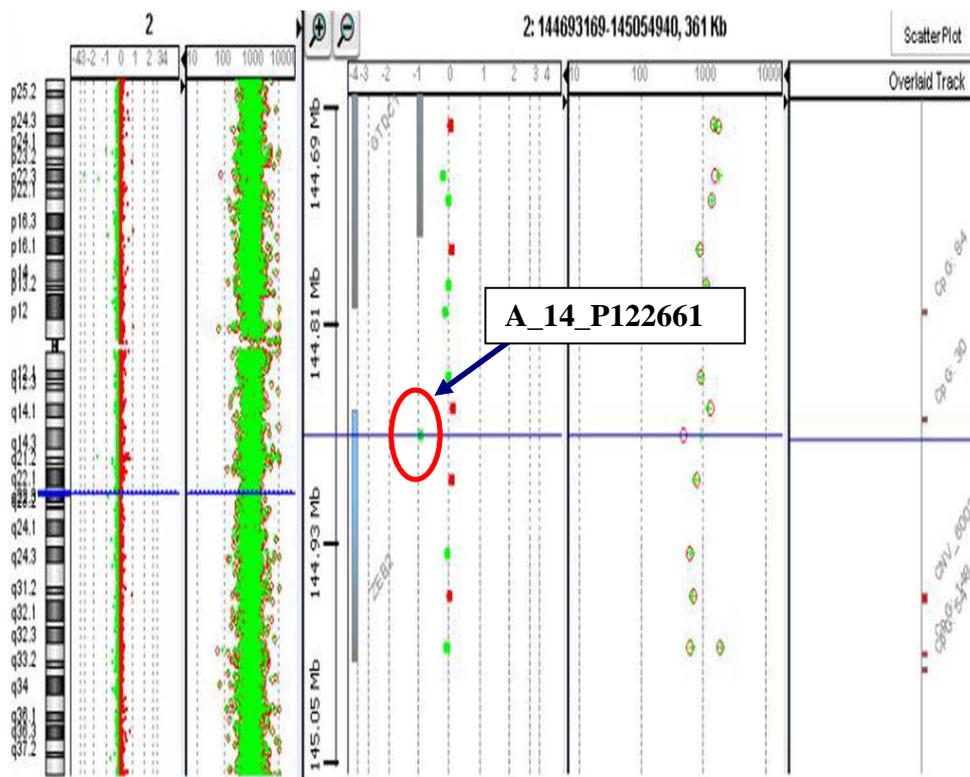


Figure 39 : L'ACM 105K a révélé une seule sonde déviante (*A_14_P122661*) sur la région 2q22.3 au niveau du gène *ZEB2* qui au seuil de l'analyse ne retient pas le diagnostic de CNV.

2.2.2.3.4. Confirmation de la délétion *de novo* du gène *ZEB2* sur la PCR quantitative

L'analyse de la PCR en temps réel avec des couples d'amorces situés au niveau des introns 4 et 9 du gène *ZEB2* a permis de confirmer la délétion partielle du gène *ZEB2*. L'étude des ADN parentaux a permis de déterminer qu'il s'agit d'une délétion *de novo* (**Figure 40**).

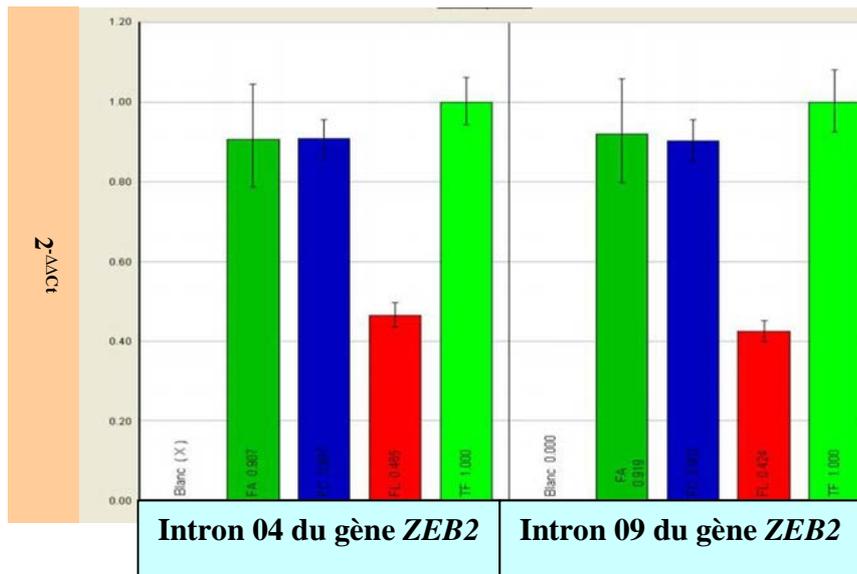


Figure 40 : Analyse en PCR en temps réel confirmant la délétion interstitielle *de novo* des exons 5 à 9 chez le probant (en rouge) par rapport aux parents (vert foncé et bleu) et au témoin femme (vert clair).

2.2.2.3.5. Séquençage du point de cassure de l'allèle délété

Afin de déterminer la position exacte des deux points de cassure de la délétion partielle de *ZEB2*, nous avons séquencé ces points de cassures en utilisant des amorces spécifiques positionnées dans l'intron 4 et dans l'exon 10 du gène (**Figure 41**). Nous avons ainsi déterminé que la position génomique de la délétion est : chr2:145,147,520-145,176,120 (hg19) soit une délétion de 28,600 pb. Sur l'intron 4, 13,528 pb sont touchées par la délétion et sur l'exon 10, les 76 premières bases sont perdues.

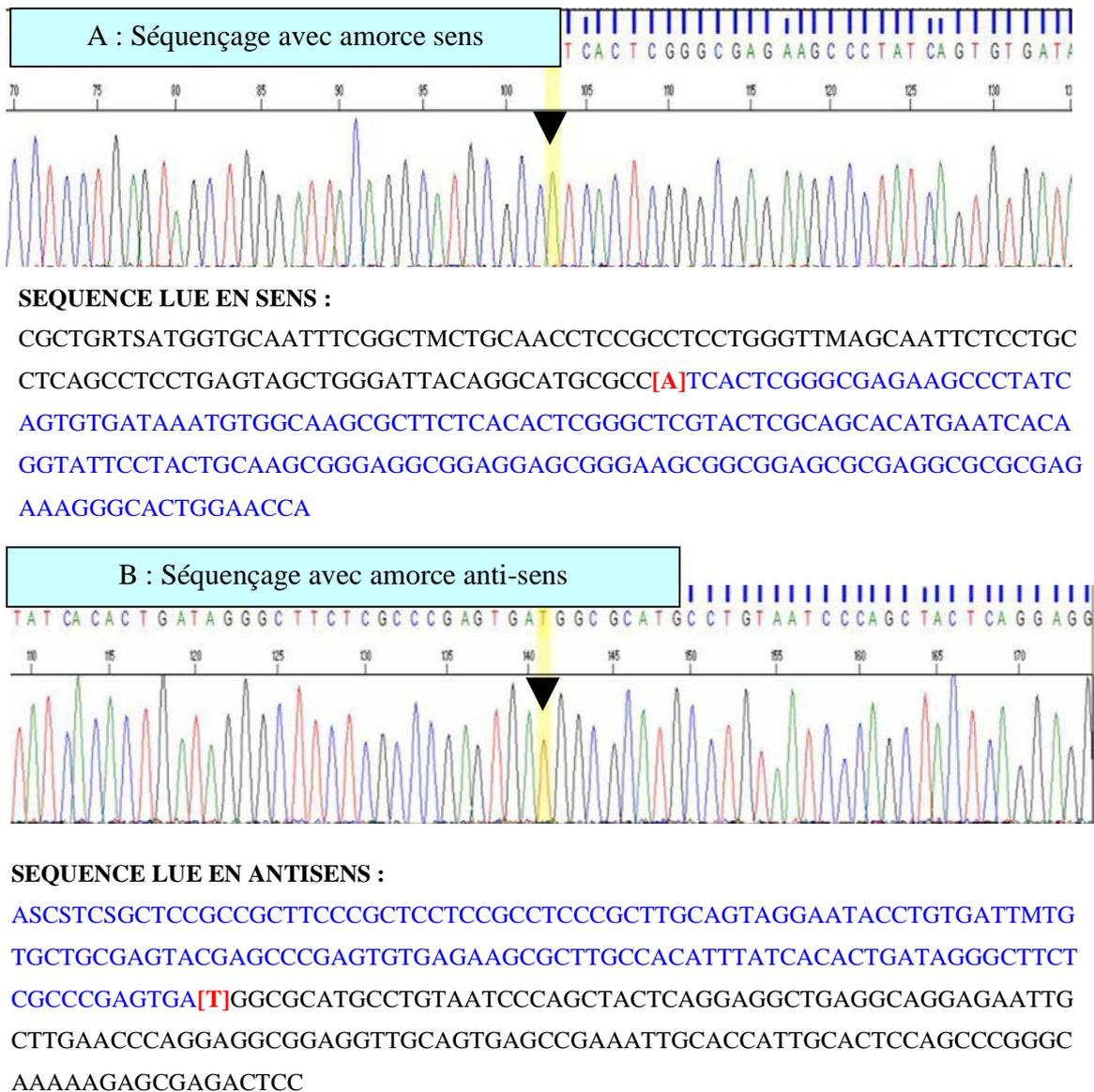


Figure 41 : Résultats du séquençage ayant permis de déterminer la position nucléotidique des points de cassure localisés dans l'intron 4 et dans l'exon 10 du gène *ZEB2*.

A : Séquençage du gène *ZEB2* avec l'amorce sens : l'intron 4 est en couleur noire et l'exon 10 est en bleue, le nucléotide [A] en rouge et entre crochets correspond au dernier nucléotide de l'intron 4 (flèche noire).

B : Séquençage du gène *ZEB2* avec l'amorce anti-sens : l'intron 4 est en couleur noire et l'exon 10 est en bleue, le nucléotide [T] en rouge et entre crochets correspond au dernier nucléotide de l'intron 4 (flèche noire).

2.3. Contrôles des déséquilibres génomiques réalisés par PCR

En plus des régions contrôlées par PCR quantitative, nous avons contrôlé certaines régions en déséquilibre par PCR « classique » c'est-à-dire non quantitative. Il s'agit de 7 régions exoniques pour lesquelles un déséquilibre a été détecté mais le positionnement des amorces de qPCR n'était pas réalisable pour plusieurs raisons : il s'agit de régions de très petites taille et/ou de régions contenant un grand nombre de SNPs. Nous avons donc choisi d'utiliser une approche alternative pour contrôler ces régions : une PCR suivi d'une migration du produit de PCR obtenu sur gel d'agarose afin de déterminer la taille des produits amplifiés. Pour cela, un couple d'amorces de PCR est positionné à l'extérieur de la région en déséquilibre. Il est possible de calculer la taille théorique du produit de PCR de l'allèle normal et celle de l'allèle porteur de la délétion ou de la duplication. Nous avons une délétion/duplication à l'état hétérozygote s'il existe des deux bandes avec des tailles différentes, une bande correspondant à l'allèle normal et une autre correspondant à l'allèle anormal. La PCR classique est réalisée pour le trio enfant et parents dans les mêmes conditions de PCR. Un exemple de contrôle d'ACM-1M-DIS par la PCR classique est présenté en **(Figure 42)**. Le **tableau 13** reprend les CNV détectés par l'ACM-1M-DIS et contrôlés par PCR : il s'agit de faux positifs pour les 7 régions étudiées.

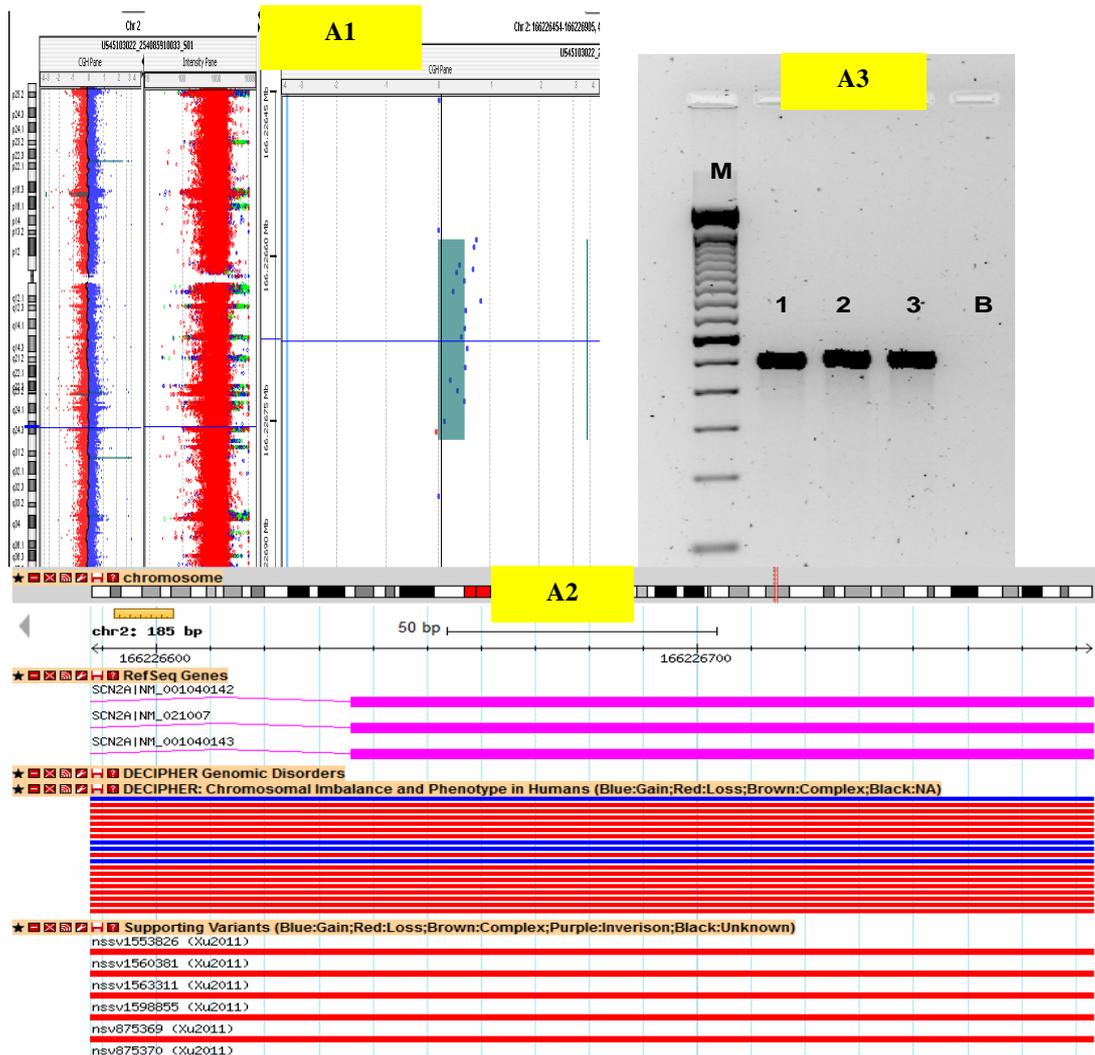


Figure 42 : Exemple de contrôle par PCR d'un CNV détecté par l'ACM-1M-DIS. A1 : Duplication d'une taille de 185 pb chez un patient présentant une encéphalopathie infantile précoce, 16 sondes déviantes, $\log_2\text{ratio}$ à +0.51 : arr[hg19] 2q24.3(166,226,588-166,226,772)x3 ; A2 : La duplication touche une partie de l'exon 20 du gène *SCN2A* (DGV) ; A3 : Le produit de PCR de l'allèle normal a d'une taille de 510 pb tandis que celui de l'allèle dupliqué aurait une taille théorique de 695 pb dans le cas d'une duplication en tandem. La PCR réalisée sur le trio permet d'amplifier une seule bande à 510 pb, la duplication n'est donc pas retrouvée, il s'agit d'un faux-positif. (M : marqueur de taille 100 pb, 1 : probant, 2 : mère, 3 : père et B : blanc). (Position génomique du couple d'amorces utilisé pour la PCR : chr2:166,226,459-166,226,958).

Positions des régions en déséquilibre détectées par l'ACM-1M-DIS (hg 19)	Log ₂ ratio	Gènes	Taille en pb	Résultat
chr2:166,226,588-166,226,772	+0.51	<i>SCN2A E20 sur 27</i>	185	Faux-positif
chr5:178,405,302-178,405,459	-0.88	<i>GRM6 E10 sur 10</i>	158	Faux-positif
chr11:644,225-644,438	-1.25	<i>DEAF1E12 sur 12</i>	213	Faux-positif
chr9:312,035-312,082	+1.37	<i>DOCK8 E6 sur 48</i>	47	Faux-positif
chr15:73,007,704-73,007,747	+2,03	<i>BBS4 E6 sur 16</i>	43	Faux-positif
chr3:51,418,351-51,418,730	-1.32	<i>DOCK3 E53 sur 53</i>	380	Faux positif
chr6:133,852,248-133,852,338	+0.65	<i>EYA4 E20 sur 20</i>	90	Faux-positif

Tableau 13 : Récapitulatif des anomalies déséquilibrées exoniques détectées par l'ACM-1M-DIS et contrôlées par PCR : il s'agit de faux positifs pour les 7 régions étudiées.

2.4. Régions en déséquilibre ayant un potentiel effet pathogène non contrôlées dans la première phase de l'étude

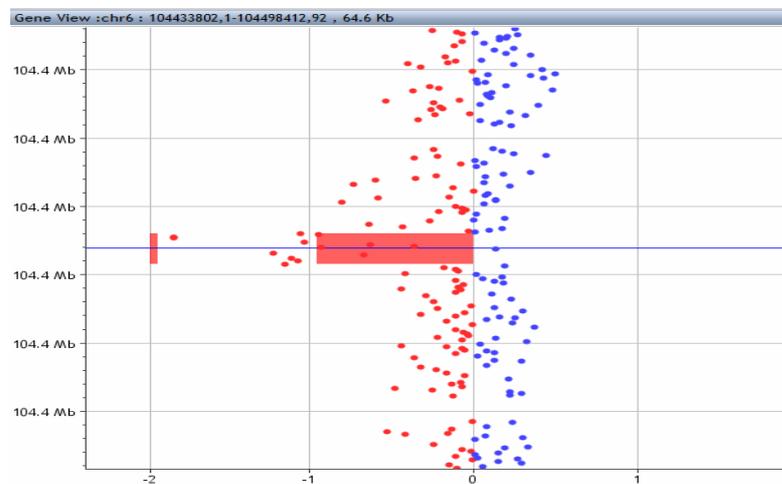
Les régions génomiques en déséquilibre que nous avons considérées comme "potentiellement pathogènes" ont été contrôlées par une seconde technique (PCR quantitative ou PCR) afin de s'assurer qu'il ne s'agit pas de faux positifs et ensuite de déterminer leur caractère hérité ou *de novo*, notion indispensable pour l'interprétation du résultats. Toutefois, étant donné le nombre important de CNV détectés avec cette analyse à très haute résolution, il n'était pas possible de contrôler tous ces CNV. Nous avons donc triés les CNV en fonction du niveau de probabilité de leur pathogénicité. Dans une deuxième phase de cette étude, nous contrôlerons d'autres CNV et nous étudierons leur transmission et la ségrégation familiale s'ils sont confirmés.

2.4.1. CNV ne contenant pas de gène exerçant un potentiel effet de position sur les gènes voisins

Cette deuxième phase de l'étude concernera principalement les régions ne contenant pas de gène mais de potentielles régions régulatrices de l'expression des 435 gènes ciblés car situées immédiatement en amont ou en aval de ces gènes, ce qui représente **81 CNV (Annexe 5)**. Par exemple, parmi ces CNV, un retient particulièrement notre attention, il s'agit d'un CNV localisé en 6q16.3 situé en aval du gène *GRIK2* et ne contenant pas de gène (**Figure 43**) mais contenant un rétrotransposon du gène *R3HDM2* qui s'exprime dans le cerveau d'après les bases de données

disponibles et interagit potentiellement avec des gènes comme l'ataxine *ATXN1* ou *YWHAE* ou *MAPK6* d'après les prédictions d'interaction ([MINT http://mint.bio.uniroma2.it/](http://mint.bio.uniroma2.it/), [STRING string-db.org/](http://string-db.org/), [I2D http://ophid.utoronto.ca/](http://ophid.utoronto.ca/)). Les rétrotransposons sont des ARNm « rétro »transcrits qui se sont insérés dans le génome (Baertsch et al., 2008 ; Kent et al., 2003 ; Pei et al., 2012 ; Schwartz et al., 2003 ; Zheng et al., 2007). La plupart sont des pseudogènes mais certains sont des gènes fonctionnels s'ils acquièrent le promoteur d'un gène voisin et ils peuvent parfois générer la production de transcrits antisens qui peuvent potentiellement agir sur la traduction de l'ARN messager du gène initial.

A



B

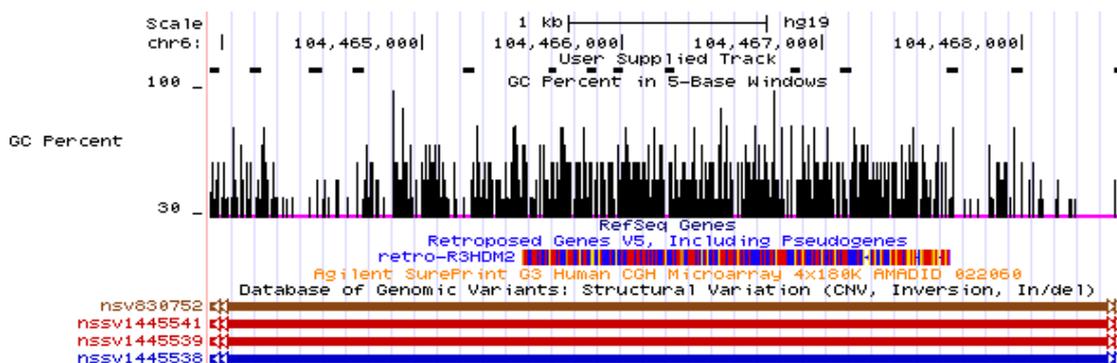


Figure 43 : Exemple d'une délétion en aval du gène *GRIK2* contenant un rétrotransposon du gène de *R3HDM2* qui s'exprime dans le cerveau et interagit potentiellement avec des gènes comme l'ataxine *ATXN1* ou *YWHAE* ou *MAPK6*.

A : Résultat de l'ACM-M-DIS arr[hg19] 6q16.3(chr6:104,463,942-104,468,522)x1 ; B : région génomique en déséquilibre dans UCSC montrant la présence du rétrotransposon rétro-R3HDM2.

2.4.2. CNV touchant des gènes impliqués dans des maladies de transmission autosomique récessive

Nous allons également contrôler les CNV affectant les gènes ciblés sur l'ACM-1M-DIS dont la transmission est connue comme autosomique récessive en particulier pour les patients pour lesquels une consanguinité a été notée (3 patients de notre cohorte). Considérant la notion de consanguinité, nous n'avons pas identifié pour ces 3 patients de CNV (perte ou gain) à l'état homozygote (identifiables grâce aux valeurs des log₂ratios) qui témoignerait de la transmission biparentale d'un CNV issu d'un ancêtre commun. Pour les CNV hétérozygotes qui touchent les gènes de DI autosomique récessive, si ils sont confirmés et que le phénotype clinique observé est compatible avec le gène, nous pourrons alors rechercher une mutation affectant le second allèle. Dans le tableau 10 qui liste dix délétions exoniques uniques, trois CNV touchent des gènes de transmission autosomique récessive : *ASPM*, responsable de micocéphalies ; *RGS7*, responsable de déficits cognitifs et *DCAF17*, responsable d'une déficience intellectuelle syndromique.

DISCUSSION

Notre travail de thèse s'est orienté vers l'identification de gènes candidats responsables de déficience intellectuelle à l'aide de l'analyse chromosomique sur microréseaux d'ADN. L'ACM permet d'identifier des déséquilibres génomiques de taille variable et dont le contenu génique peut contribuer à la survenue de la DI. Dans une première partie de nos résultats nous avons démontré que l'ACM dans une résolution de 180K peut conduire à reconnaître des remaniements géniques rares devant un tableau clinique non spécifique tel celui du gène *RUNX1T1* et DI légère à modérée mais aussi celui du gène *ANKRD11* devant une présentation clinique de l'adulte. Les résultats concernant les gènes *KIAA1468* et *FABP7*, gènes jusqu'alors non associés à la DI, illustrent les difficultés rencontrées pour interpréter le caractère délétère de ces réarrangements. Ainsi, nous avons essayé de mettre en place une ACM DIS (Déficience Intellectuelle Spécifique) 1M, ciblée sur les gènes reconnus ou candidats de DI dans l'optique d'améliorer le rendement diagnostique.

1. *RUNX1T1*, corépresseur transcriptionnel régulant la structure chromatinienne, est un gène candidat autosomique dominant de déficience intellectuelle

Nous avons identifié une délétion intragénique survenue apparemment *de novo* dans le gène *RUNX1T1*, situé en 8q21.3, chez une patiente ayant une déficience intellectuelle légère. La première association du gène *RUNX1T1* avec la déficience intellectuelle concerne l'interruption du gène (dans l'intron 1b) lors d'une translocation réciproque équilibrée t(5;8)(q13;q21) chez un individu avec une DI légère à modérée, une dysmorphie crânio-faciale mineure et une CIV (Zhang et al., 2009). Cette translocation avec le point de cassure situé dans le gène *RUNX1T1* suggérait que le phénotype de ce patient pouvait être du à l'haploinsuffisance du gène *RUNX1T1*. Quelques ressemblances sont notées entre ce patient et notre patiente avec un front large, des sourcils pleins, une implantation postérieure basse des cheveux. Toutefois, notre patiente présente un examen clinique cardiaque normal bien que l'échocardiographie n'ait pas été réalisée. D'après Zhang et al [2009], la délétion 8q21.3q22 isolée a été décrite chez deux patients déficients intellectuels, mais la taille exacte des réarrangements n'a pas été précisément déterminée. Depuis la description des ces 3 premiers cas, cinq autres patients ont été rapportés dans *DECIPHER* (2399, 4103, 248172, 253842 et 265010) avec des délétions chevauchantes infra microscopiques

en 8q21.3 (<http://decipher.sanger.ac.uk>). Cependant, ces déséquilibres génomiques sont plus larges que dans notre cas présent (3.6 Mb, 11.13 Mb, 12.8 Mb et 5.28 Mb et 0.27 Mb respectivement) et pour certains, il existe des autres anomalies génétiques associées (patient 4103 et patient 265010) et impliquent de nombreux gènes qui entravent la mise en évidence une corrélation génotype phénotype (**Tableau 14**).

RUNX1T1 code un des membres de la famille MTG, gènes des translocations myéloïdes, protéine qui participe à la formation de réseaux multi protéiques impliquant des corépresseurs transcriptionnels, des enzymes de modification des histones, et des facteurs transcriptionnels (Koyano-Nakagawa et al., 2005).

Cas clinique	Déficiência intellectuelle	Signes associés	Taille de la délétion Nombre de gènes impliqués
Patient 248172	Non rapportée	Hypospadias, déviation ulnaire des doigts, scoliose, hyperlaxité articulaire, hernie ombilicale, fentes palpébrales en haut en dehors, anomalie du septum nasal, hypertélorisme, anomalie du pavillon de l'oreille	5.28 Mb (26 gènes)
Patient 2399	+	Racine du nez large, fentes palpébrales en haut et en dehors, sténose pulmonaire.	3.6 Mb (17 gènes)
Patient 253842	+	Non rapportés	12.81 Mb (50 gènes)
Patient 4103	Non rapportée	TOF, plis palmaires profonds, implantation anormale des cheveux, fente labiale non médiane	11.13 Mb (48 gènes) et une del19p13.2 d'une taille de 0.07 Mb (3 gènes)
Patient 265010	+	Non rapportés	0.27 Mb (<i>RUNX1T1</i>) et une amp16p13.12-p13.11 d'une taille de 1.65 Mb (15 gènes)
Patient t(5;8)(q32;q21.3q22)	+ légère à modérée	CIV	<i>RUNX1T1</i>
Patient del(8)(q21q22) (Donahue et al., 1995)	+ légère à modérée	CIV, variant Dandy-Walker, anomalies faciales mineures : hypertélorisme, épicanthus bilatéral asymétrique, racine du nez large, bouche ouverte, micrognathie, oreilles décollées et implantation basse des oreilles.	Délétion détectée par caryotype constitutionnel
Patient del(8)(q13.3q22.1) (Fryburg et al., 1993)	+ légère à modérée	Synostose lambdoïdale	Délétion détectée par caryotype constitutionnel
Notre patiente	+ légère	Front large, sourcils épais, oreille droite saillante, prognathisme et implantation basse des cheveux	<i>RUNX1T1</i> 37.85 kb

Tableau 14 : Tableau récapitulatif de tous les cas de délétion altérant le gène *RUNX1T1* qui ont été rapportés dans la littérature. TOF : Tétralogie de Fallot, CIV : Communication InterVentriculaire.

Le gène *RUNX1T1* est abondamment exprimé au cours de développement cérébral et la fonction du gène *RUNX1T1* s'inscrirait dans les programmes de répression de gènes spécifiques dans le cerveau (Aaker et al., 2010). La structure modulaire de la protéine *RUNX1T1* sauvage est caractérisée par quatre domaines conservés au cours de l'évolution appelés NHR (Nervy Homology Regions) (Davis et al., 2003). En raison de la délétion présente des exons 3 à 7, la perte attendue de l'interaction des domaines NHR1 et NHR2 avec des corepresseurs nucléaires et des enzymes modifiant la structure de la chromatine pourrait entraîner une altération dans ce programme de répression de gènes spécifiques dans le cerveau. Lorsque des réarrangements chromosomiques touchent des gènes autosomiques, les pathologies associées sont le plus souvent dominantes. Dans le cas présent, le séquençage du gène *RUNX1T1* a permis d'exclure une mutation ponctuelle dans la séquence codante de l'autre allèle en faveur d'une forme dominante de déficience intellectuelle. En conclusion, l'observation d'une interruption spécifique et isolée du gène *RUNX1T1* chez deux patients indépendants, survenue a priori de novo, avec un phénotype similaire est un argument pour l'implication du gène *RUNX1T1* dans les troubles cognitifs.

Ce travail a fait l'objet d'une publication :

Huynh MT, Béri-Dexheimer M, Bonnet C, Bronner M, Khan AA, Allou L, Philippe C, Vigneron J, Jonveaux P. *RUNX1T1*, a chromatin repression protein, is a candidate gene for autosomal dominant intellectual disability. *Am J Med Genet A*. 2012 Jul; 158A(7):1782-4

2. DI syndromique et variabilité phénotypique : exemple du syndrome KBG et du gène *ANKRD11*

Le syndrome KBG (MIM 148050) rapporté initialement en 1975 (Herrmann et al., 1975) est caractérisé par une dysmorphie faciale (visage triangulaire, implantation basse antérieure et postérieure des cheveux, synophrys, hypertélorisme, ptose des paupières, une arête nasale large, un long philtrum), une macrodontie des incisives centrales supérieures, des anomalies squelettiques (une petite taille, anomalies costo-vertébrales) et une déficience intellectuelle légère à modérée. Notre patient, vu la première fois à la consultation de génétique à l'âge de 40 ans, présente quelques signes atypiques de dysmorphie faciale avec une implantation basse des cheveux, des fentes palpébrales courtes, des oreilles avec conque décollée et absence d'anthélix, une lèvre inférieure éversée et un palais haut et large. Certains patients atteints de syndrome KBG

peuvent avoir des troubles autistiques, troubles qui ont été également trouvés chez notre patient. Son QI a été estimé à 56, les cas décrits dans la littérature rapportent un QI entre 40 et 74. En 2011, par une approche de séquençage de l'exome, le gène *ANKRD11* (Ankyrin Repeat Domain 11) a été identifié comme responsable du syndrome KBG. Ce gène code une protéine qui interagit dans la voie de signalisation des récepteurs nucléaires ciblant l'activation transcriptionnelle avec un rôle potentiel dans la plasticité neuronale (Sirmaci et al, 2011). La délétion interstitielle en 16q24.3 de 214 kb identifiée chez le cas présent interrompt le gène *ANKRD11*. La délétion n'est pas héritée de la mère. Le père étant décédé il n'a pas été possible de vérifier le caractère *de novo* ou hérité de cette délétion. Cette observation a conduit en retour à réévaluer le phénotype du patient révélant la présence d'une macrodontie confirmant le diagnostic de syndrome KBG chez cet homme de 40 ans.

Cette observation relève l'apport diagnostique de l'analyse chromosomique sur microréseau en soulignant que la variabilité phénotypique d'un syndrome rend celui-ci moins aisé à diagnostiquer notamment lorsque le patient est vu initialement à un âge (ici 40 ans) pour lequel classiquement les données phénotypiques sont moins bien établies. Aussi, il nous semble important que devant toute anomalie génomique détectée par ACM soit effectué un retour systématique sur l'analyse phénotypique, étape essentielle pour contribuer à valider l'approche biologique. Cette observation clinico-biologique contribue ainsi à enrichir les données évolutives de certaines anomalies chromosomiques rares qui ont été surtout identifiées initialement chez des enfants.

3. Délétion du gène *KIAA1468* et spasmes infantiles

Nous avons identifié une délétion intragénique *de novo* *KIAA1468*. La protéine KIAA1468 possède un domaine LisH à son extrémité N-terminale et trois domaines répétés en tandem de type HEAT à son extrémité C-terminale. La délétion *de novo* débute à partir de l'exon 9 du gène *KIAA1468* entraînant, si elle est produite, une protéine tronquée ayant perdue les domaines HEAT.

Les protéines possédant des motifs répétés de type HEAT sont des protéines cytoplasmiques avec une fonction dans le transport intracellulaire. Ces motifs HEAT répétés participent à l'assemblage d'un complexe multiprotéique. D'après les bases de données de prédiction d'interactions (UniProt) la protéine KIAA1468 pourrait interagir avec au moins 10 protéines différentes:

MORC1, C1orf175, FAM179A, HEATR2, HEATR4, TMC07, PIGN, KIAA2026, SLC24A4, COG3 (**Figure 44 et Tableau 15**). Ces protéines s'expriment d'une façon diverse dans plusieurs tissus, en particulier au niveau cérébral. Parmi ces 10 protéines, 4 s'expriment de façon abondante au niveau du cerveau (*PIGN*, *AFM179A*, *HEATR2*, *SLC24A4*) et deux sont impliquées dans des pathologies connues comme la dyskinésie ciliaire de type 18 avec ou sans situs inversus (MIM 614874) pour le gène *HEATR2* (MIM 614864) et le syndrome MCAHS 1 ou syndrome d'anomalies congénitales multiples-hypotonie-épilepsie (MIM 614080) pour le gène *PIGN* (MIM 606097). Le syndrome MCAHS 1 est une affection de transmission autosomique récessive caractérisée par une hypotonie néonatale, une épilepsie, des anomalies congénitales variables touchant les systèmes cardiaque, urinaire et gastro-intestinal. La plupart des enfants atteints décèdent avant l'âge de trois ans. Le gène *PIGN* code une protéine impliquée dans la biosynthèse du système d'ancrage du Glycosylphosphatidylinositol (GPI). La protéine *HEATR2* est importante dans le transport rétrograde des axonemes des cils et des flagelles.

Gène	Fonction(s) cellulaire(s)	Expression	Maladie(s)
<i>PIGN</i> (Phosphatidyl-Inositol Glycan, class N)	Synthèse d'ancrage de GPI (Phosphatidylinositol) pour des protéines	Divers tissus mais abondant au niveau cérébral, rénal et cutané.	multiples anomalies congénitales-hypotonie-épilepsie (MIM614080) (AR) (Maydan et al., 2013)
<i>C1orf175</i>	-	-	-
<i>FAM179A</i> (Family with sequence similarity 179, member A)	-	Divers tissus dont une expression au niveau cérébral	-
<i>HEATR2</i> (Heat-Repeat Containing Protein 2)	Responsable de la stabilité de la dynéine au niveau des cils.	Divers dont une expression forte au niveau cérébral	Ciliary dyskinesia, primary 18 (MIM 614874) (Horani et al., 2012)
<i>HEATR4</i> (HEAT Repeat Containing Protein 4)	-	Divers tissus	-
<i>SLC24A4</i> (Solute Carrier Family 24)	Transport ionique (Calcium)	Cérébrale et aortique	-
<i>TMC07</i> (transmembrane and coiled-coil domains 7) ou Transport And Golgi Organization 6 Homolog (Drosophila)	-	-	-
<i>KIAA2026</i>	-	Divers tissus	-
<i>COG3</i> (Component of Oligomeric Golgi Complex 3)	Traffic intracellulaire	Divers tissus	-
<i>MORC1</i> (MORC family CW-type Zinc Finger)	Maturation des spermatogonies	Spermatogonies	-

Tableau 15 : Liste des protéines qui interagissent avec la protéine KIAA1468 (UnitProt Q9P260)

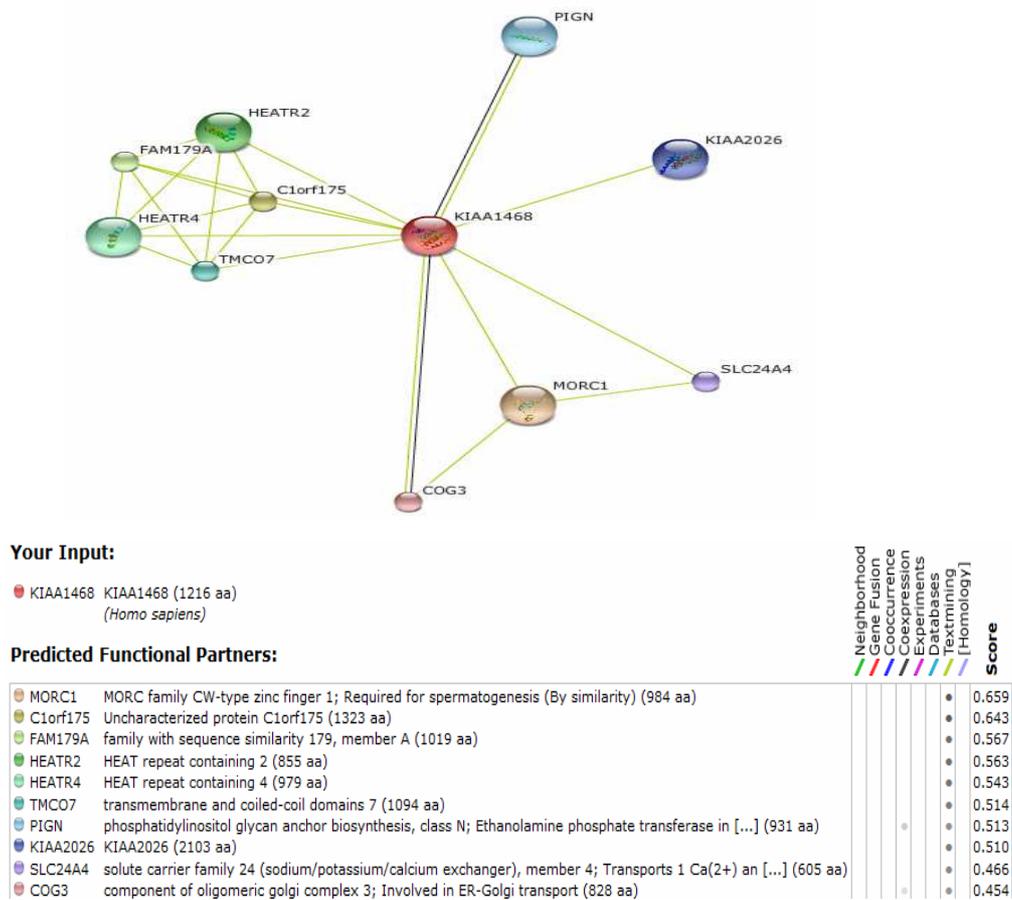


Figure 44 : Prédiction d'interaction de la protéine KIAA1468 (interactome) avec ses partenaires (UniProt).

Par ailleurs, la protéine KIAA1468 possède un motif LisH (Lis homology), domaine qui est trouvé dans des protéines impliquées dans la migration neuronale post-mitotique au cours de la neurogenèse, comme la protéine LIS1, dont la mutation est responsable de la lissencéphalie de type 1 (Faulkner et al., 2000). Si le motif LisH n'est pas inclus dans la région délétée, la délétion d'une grande partie de la protéine KIAA1468 pourrait conduire à une modification conformationnelle entraînant d'une part une perte de la fonction du motif LisH et d'autre part en raison de la délétion du domaine HEAT une perte d'interaction avec les protéines partenaires (Mateja et al., 2006). Les données sur les domaines fonctionnels de la protéine KIAA1468 et des interactants potentiels apportent des arguments complémentaires pour un rôle de la dérégulation de ce gène dans le phénotype clinique (épilepsie, spasmes infantiles) et la présence d'hétérotopies

nodulaires identifiées sur l'IRM du probant pouvant témoigner d'une anomalie de la migration neuronale.

La délétion génomique partielle de KIAA1468 est associée à la production d'un transcrit anormal identifié par RT-qPCR évoquant l'absence de dégradation de ce transcrit anormal par le système NMD. En cas de la traduction de la protéine tronquée, un effet dominant négatif pourrait intervenir par une compétition d'interaction avec la protéine sauvage entraînant le phénotype malade. Le séquençage bidirectionnel de l'allèle normal du gène *KIAA1468* n'a pas trouvé de mutation délétère chez le cas-index ce qui suggère, a priori, un mode de transmission dominant. L'étude de l'origine parentale a confirmé que l'allèle délété est d'origine paternelle. Dans la région 18q21.33, à ce jour, il n'a pas été décrit d'empreinte génomique parentale. Le gène le plus proche qui est soumis à empreinte (paternelle) est *TCE3C* codant l'élongine A3, situé en 18q21.1 environ 16 Mb en amont.

Dans l'hypothèse d'une région régulatrice présente dans la région délétée et agissant sur un gène situé à distance par effet de position, et ayant un rôle dans le phénotype, nous nous sommes intéressés, 1Mb en amont, au gène *CDH20*. Malheureusement ce gène ne s'exprime pas au niveau du sang et donc nous n'avons pas pu documenté un tel effet.

Plusieurs cas de délétion du bras long du chromosome 18q- ont été décrits dans la littérature. Les délétions 18q- distales sont parfois associées avec variabilité à différents types d'épilepsie. A ce jour dans la base DECIPHER, 11 cas emportent le gène *KIAA1468* [patient ID 253873 : 23.8 Mb comprenant 79 gènes, patient ID 251072 : 21.95 Mb comprenant 71 gènes, patient ID 248373 : 19.65 Mb comprenant 59 gènes, patient ID 257207 : 28.15 Mb comprenant 88 gènes, patient ID 258 894 ; 26.33 Mb comprenant 87 gènes, patient ID 256951 : 24.22 Mb comprenant 79 gènes, patient ID 252887 : 22.59 Mb comprenant 72 gènes, patient ID 257087 : 21.77 Mb comprenant 69 gènes, patient ID 265501 : 21.47 Mb comprenant 68 gènes, patient ID 270323 : 20.71 Mb comprenant 62 gènes et le patient ID 263315 : 26.19 Mb comprenant 86 gènes) . Parmi ces 11 patients, seul 5 patients ont été rapportés avec des données cliniques, ces 5 patients ont tous une DI mais sur les données cliniques accessibles, il n'y qu'un seul patient, **ID 263315**, qui a été rapporté avec une encéphalopathie infantile précoce, ID, hypotonie musculaire et microcéphalie (**Tableau 16**). Toutes ces délétions sont de très grande taille dont certaines avec des remaniements associés rendant difficile l'établissement de corrélations génotype-phénotype.

Patient ID	Taille de délétion en Mb	Gènes	Observation clinique
263315	26.19	86	Microcéphalie, DI, spasmes en salve, hypotonie musculaire.
256951	24.22	79	DI et cardiomyopathie
253873	23.8	79	Anomalies des lèvres, petite taille proportionnée, pied varus, CIV, CAV, DI, retard de langage, surdité, philtrum court et hypertélorisme, hypotonie musculaire.
251072	21.95	71	Surdité, myopie, DI, pied varus, petite taille proportionnée.
257087	21.77	69	Aplatissement malaire, front étroit, autisme, bosses frontales, malformation Arnold-Chiari, racine du nez plat, hypotonie musculaire

Tableau 16 : Les cas de délétion 18q- dans la base de données Decipher avec leurs données cliniques accessibles, *patient ID 263315* présentant des spasmes en salves, une microcéphalie, une DI et une hypotonie musculaire avec le phénotype plus au moins similaire chez notre probant (couleur jaune). *Patient ID 251072* ayant une délétion 18q- d'une taille de 21.95 Mb qui s'associe avec d' autres remaniements chromosomiques cryptiques comme la délétion en 1q43 d'une taille de 331 kb (3 gènes), la délétion en 3p14.1 d'une taille de 240 kb emportant le gène *MAGII*, la duplication en 8p22 d'une taille de 137 kb emportant le gène *NATI*. CIV : Communication InterVentriculaire, CAV : Canal AtrioVentriculaire.

Afin d'avancer dans l'hypothèse de l'implication de ce gène dans le phénotype du cas probant, une analyse de la séquence du gène *KIAA1468* et la recherche de grands réarrangements exoniques ont été effectués sur une cohorte de patients sélectionnés en fonction des critères cliniques proches du cas index. Deux variants ont été détectés c.2761-7 T>C (intron 20) et c.3547 G>A (dernier exon du gène). Ces 2 variants n'ont pas été déjà rapportés dans la base de données de SNPs (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) (dbSNPs build129) et la base de données de 1000

genomes (<http://www.1000genomes.org/>). Ces 2 variants ont été analysés par au moins 4 programmes de prédiction des épissages alternatifs différents (MaxEntScan ss5' ou ss3', Gene Splicer, Human splicing Finder et NextGene2...) mais les résultats n'ont pas montré une grande variation entre les sites d'épissage constitutif et les nouveaux sites créés. De plus, la mutation faux sens c.3547 G>A est héritée de la mère du cas-index, c'est pourquoi, ce variant c.3547 G>A est peu probablement responsable du phénotype délétère chez le cas-index. En outre, la prédiction des effets des mutations faux sens par au moins 3 programmes (SIFT, SNAP et Polyphen-2...) a montré que le variant c.3547 G>A est neutre (SIFT et SNAP) par rapport au programme Polyphen-2 qui donne un effet probablement délétère. Cette prédiction nous permet de juger que le variant c.3547 G>A est vraisemblablement neutre ou de pénétrance incomplète. Le NHLBI Exome Sequencing Project (*Exome Variant Server*) (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), qui a colligé les résultats de l'exome de plus de 6500 individus inclus dans différents projets, tous non reliés à la déficience intellectuelle ou autres troubles neurodéveloppementaux, révèlent dans la population cible témoin une mutation non sens, c.1675C>T p.R559* (profondeur de lecture moyenne de 106) et plusieurs mutations faux-sens (**Figure 45 et Tableau 17**)

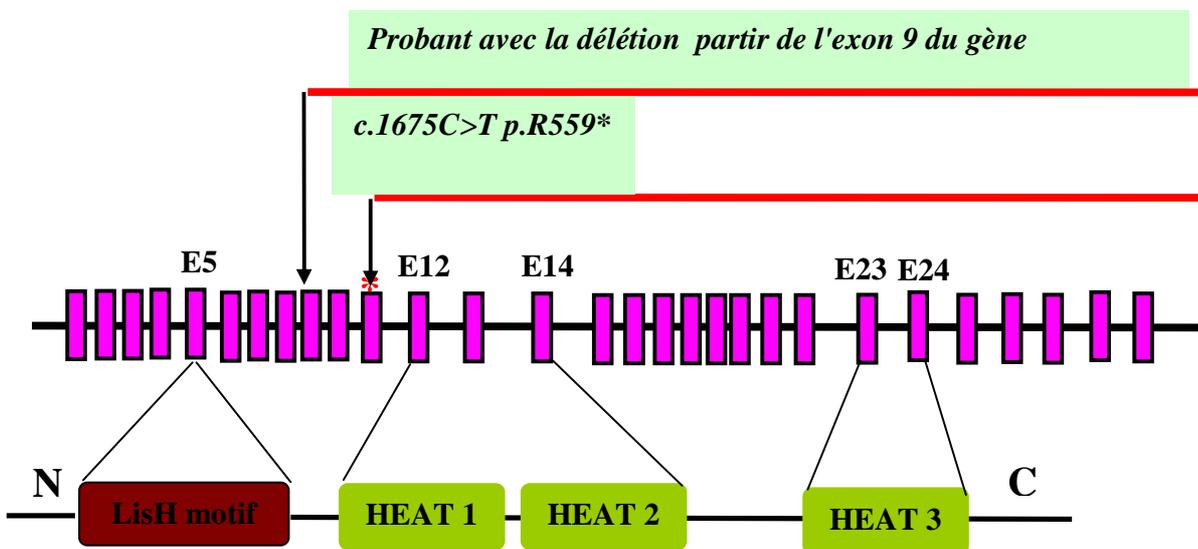


Figure 45 : Structure du gène *KIAA1468* (29 exons) en haut : petite rectangle en rose (exon) et structure de la protéine *KIAA1468* avec ses domaines fonctionnels (en bas) : domaine *LisH* à l'extrémité N-terminale à la position d'acide aminé 255-287 (brun) codé par exon 5 et 3 domaines répétés *HEAT* (vert) : *HEAT 1* position 601-639 codé par exons 12-14, *HEAT 2* position 640-679 codé par exon 14, *HEAT 3* position 1004-1042 codé par exons 23-24. Ligne rouge en haut : délétion à partir l'exon 9 du gène (proband), ligne rouge en bas : la mutation c.1675C>T p.R559* avec codon *STOP* dans l'exon 11 du gène (données EVS).

Variant Pos	rs ID	Alleles	EA Allele #	AA Allele #	AI Allele #	Avg. Sample Read Depth	cDNA Change
18:59854729	unknown	A>G	G=0/A=8420	G=1/A=4141	G=1/A=12561	78	c.-10A>G
18:59854733	unknown	G>T	T=1/G=8415	T=0/G=4148	T=1/G=12563	80	c.-6G>T
18:59854770	unknown	G>A	A=0/G=8460	A=1/G=4217	A=1/G=12677	88	c.32G>A
18:59854807	rs181701851	T>A	A=6/T=8456	A=0/T=4240	A=6/T=12696	108	c.69T>A
18:59854863	unknown	G>A	A=0/G=8360	A=1/G=4091	A=1/G=12451	76	c.125G>A
18:59854886	rs146488728	G>A	A=85/G=8227	A=10/G=4008	A=95/G=12235	63	c.148G>A
18:59854906	unknown	G>A	A=0/G=8276	A=1/G=3951	A=1/G=12227	48	c.168G>A
18:59854918	unknown	C>T	T=1/C=8251	T=0/C=3896	T=1/C=12147	40	c.180C>T
18:59854993	rs140959449	C>T	T=84/C=8082	T=7/C=3747	T=91/C=11829	11	c.255C>T
18:59855051	unknown	C>A	A=0/C=8336	A=1/C=4023	A=1/C=12359	9	c.313C>A
18:59855152	rs186593975	G>A	A=0/G=8212	A=10/G=3838	A=10/G=12050	7	c.414G>A
18:59855170	unknown	G>T	T=1/G=7947	T=0/G=3656	T=1/G=11603	6	c.432G>T
18:59855193	unknown	T>C	C=0/T=7648	C=2/T=3550	C=2/T=11198	6	c.455T>C
18:59855251	unknown	C>T	T=0/C=7630	T=5/C=3759	T=5/C=11389	7	c.513C>T
18:59855291	rs17644012	C>T	T=1302/C=6162	T=137/C=3625	T=1439/C=9787	6	c.526+27C>T
18:59878377	unknown	T>G	G=1/T=8097	G=0/T=3562	G=1/T=11659	38	c.527-9T>G
18:59882291	rs17644012	C>T	T=1302/C=6162	T=137/C=3625	T=1439/C=9787	6	c.526+27C>T
18:59878377	unknown	T>G	G=1/T=8097	G=0/T=3562	G=1/T=11659	38	c.527-9T>G
18:59878496	rs191621625	A>G	G=0/A=8156	G=35/A=3587	G=35/A=11743	59	c.616+21A>G
18:59878498	unknown	A>G	G=0/A=8152	G=1/A=3617	G=1/A=11769	58	c.616+23A>G
18:59878513	unknown	R>A1	A1=1/R=7825	A1=0/R=3500	A1=1/R=11325	49	c.616+39del1
18:59888238	unknown	C>G	G=0/C=8178	G=1/C=3665	G=1/C=11843	96	c.617-32C>G
18:59888247	unknown	R>A1	A1=13/R=7831	A1=1/R=3549	A1=14/R=11380	106	c.617-23_617-22insT
18:59888255	unknown	C>T	T=1/C=8181	T=0/C=3680	T=1/C=11861	113	c.617-15C>T
18:59888356	unknown	A>C	C=1/A=8135	C=0/A=3664	C=1/A=11799	78	c.688+15A>C
18:59888361	rs199618090	T>C	C=4/T=8130	C=0/T=3660	C=4/T=11790	72	c.688+20T>C
18:59888408	unknown	A>C	C=2/A=8112	C=0/A=3582	C=2/A=11694	32	c.689-44A>C
18:59888436	unknown	T>C	C=2/T=8108	C=0/T=3584	C=2/T=11692	29	c.689-16T>C
18:59888464	unknown	C>T	T=0/C=8120	T=1/C=3603	T=1/C=11723	32	c.701C>T
18:59888588	rs74462707	T>G	G=652/T=7482	G=329/T=3313	G=981/T=10795	54	c.745-29T>G
18:59888608	unknown	T>C	C=0/T=8148	C=1/T=3633	C=1/T=11781	57	c.745-9T>C
18:59888645	unknown	C>T	T=0/C=8134	T=1/C=3595	T=1/C=11729	59	c.773C>T
18:59888746	rs148489646	R>A1	A1=4/R=7712	A1=139/R=3317	A1=143/R=11029	23	c.858+17del1
18:59894502	unknown	R>A1; R>A2	A1=289/A2=182/R=7255	A1=81/A2=91/R=3262	A1=370/A2=273/R=10517	17	c.859-19del1
18:59894502	unknown	R>A1; R>A2	A1=289/A2=182/R=7255	A1=81/A2=91/R=3262	A1=370/A2=273/R=10517	17	c.859-20_859-19insT
18:59894518	unknown	T>C	C=0/T=8096	C=1/T=3555	C=1/T=11651	27	c.859-4T>C
18:59894625	unknown	T>A	A=1/T=8259	A=0/T=3792	A=1/T=12051	106	c.962T>A
18:59894663	unknown	G>A	A=0/G=8390	A=1/G=4029	A=1/G=12419	119	c.1000G>A
18:59894681	unknown	A>G	G=1/A=8453	G=1/A=4143	G=2/A=12596	109	c.1018A>G
18:59894764	rs17717783	T>C	C=2070/T=6530	C=216/T=4186	C=2286/T=10716	85	c.1062+39T>C
18:59894772	unknown	C>T	T=1/C=8599	T=0/C=4404	T=1/C=13003	84	c.1062+47C>T
18:59894776	unknown	G>A	A=1/G=8599	A=0/G=4406	A=1/G=13005	83	c.1062+51G>A
18:59894780	unknown	A>C	C=37/A=8600	C=37/A=4369	C=37/A=12969	84	c.1063-51A>C
18:59894783	rs200283659	C>T	T=0/C=8600	T=38/C=4368	T=38/C=12968	83	c.1063-48C>T

18:59894784	unknown	G>A	A=0/G=8598	A=1/G=4405	A=1/G=13003	86	c.1063-47G>A
18:59894973	unknown	A>G	G=4/A=8578	G=0/A=4376	G=4/A=12954	31	c.1154+51A>G
18:59895550	rs151143967	C>T	T=227/C=8373	T=115/C=4291	T=342/C=12664	108	c.1167C>T
18:59895581	unknown	G>T	T=1/G=8599	T=0/G=4406	T=1/G=13005	128	c.1198G>T
18:59895684	rs149719715	C>G	G=0/C=8600	G=3/C=4403	G=3/C=13003	102	c.1301C>G
18:59895693	rs145589690	A>G	G=1/A=8599	G=1/A=4405	G=2/A=13004	95	c.1310A>G
18:59895722	unknown	A>G	G=1/A=8599	G=0/A=4406	G=1/A=13005	77	c.1339A>G
18:59895738	unknown	A>G	G=1/A=8599	G=0/A=4406	G=1/A=13005	71	c.1355A>G
18:59895742	rs149162254	C>T	T=5/C=8595	T=0/C=4406	T=5/C=13001	69	c.1359C>T
18:59895877	unknown	G>T	T=1/G=8589	T=0/G=4396	T=1/G=12985	25	c.1448+46G>T
18:59898381	rs111791654	A>G	G=0/A=8588	G=82/A=4324	G=82/A=12912	61	c.1449-46A>G
18:59898414	unknown	C>A	A=2/C=8594	A=0/C=4406	A=2/C=13000	92	c.1449-13C>A
18:59898437	rs146616407	C>T	T=0/C=8598	T=10/C=4396	T=10/C=12994	113	c.1459C>T
18:59898499	rs147870131	C>T	T=2/C=8598	T=0/C=4404	T=2/C=13002	111	c.1521C>T
18:59898526	rs199618714	C>T	T=5/C=8595	T=0/C=4404	T=5/C=12999	80	c.1524+24C>T
18:59898535	rs149751169	A>G	G=0/A=8596	G=22/A=4382	G=22/A=12978	67	c.1524+33A>G
18:59898552	unknown	R>A1	A1=2/R=8240	A1=10/R=4252	A1=12/R=12492	49	c.1524+51_1524+53del13
18:59898558	unknown	R>A1	A1=1/R=8243	A1=0/R=4262	A1=1/R=12505	60	c.1524+57_1524+61del15
18:59899534	unknown	A>C	C=1/A=8599	C=0/A=4406	C=1/A=13005	81	c.1525-31A>C
18:59899543	unknown	T>C	C=3/T=8597	C=0/T=4404	C=3/T=13001	86	c.1525-22T>C
18:59899576	rs3764493	T>C	C=89/T=8511	C=22/T=4384	C=111/T=12895	122	c.1536T>C
18:59899594	unknown	C>T	T=1/C=8599	T=0/C=4406	T=1/C=13005	125	c.1554C>T
18:59899595	rs147104823	G>A	A=4/G=8596	A=3/G=4403	A=7/G=12999	126	c.1555G>A
18:59899607	rs34591384	C>T	T=0/C=8600	T=26/C=4380	T=26/C=12980	120	c.1567C>T
18:59899639	rs142034430	T>C	C=1/T=8599	C=0/T=4406	C=1/T=13005	106	c.1599T>C
18:59899672	rs145829893	G>A	A=0/G=8600	A=60/G=4346	A=60/G=12946	85	c.1620+12G>A
18:59899676	unknown	G>A	A=0/G=8600	A=3/G=4403	A=3/G=13003	82	c.1620+16G>A
18:59911950	rs111686196	C>T	T=0/C=8596	T=113/C=4293	T=113/C=12889	42	c.1621-47C>T
18:59911984	rs188667348	C>T	T=0/C=8600	T=5/C=4401	T=5/C=13001	70	c.1621-13C>T
18:59912004	unknown	T>G	G=1/T=8599	G=0/T=4406	G=1/T=13005	89	c.1628T>G
18:59912036	rs150243588	C>T	T=1/C=8599	T=0/C=4406	T=1/C=13005	105	c.1660C>T
18:59912051	unknown	C>I	I=0/C=8600	I=1/C=4405	I=1/C=13005	106	c.1675C>I
18:59912130	unknown	G>A	A=1/G=8599	A=0/G=4406	A=1/G=13005	60	c.1733+21G>A
18:59916870	rs13381574	A>G	G=709/A=2421	G=64/A=1318	G=773/A=3739	12	c.1734-3027A>G
18:59916899	unknown	R>A1	A1=1/R=3847	A1=3/R=1903	A1=4/R=5750	11	c.1734-2997del1
18:59919876	unknown	G>A	A=1/G=8599	A=0/G=4406	A=1/G=13005	78	c.1734-21G>A
18:59919930	rs200041484	G>A	A=0/G=8600	A=1/G=4405	A=1/G=13005	117	c.1767G>A
18:59919932	unknown	G>A	A=1/G=8599	A=0/G=4406	A=1/G=13005	117	c.1769G>A
18:59919991	unknown	A>G	G=1/A=8599	G=0/A=4406	G=1/A=13005	80	c.1824+4A>G
18:59920034	unknown	R>A1	A1=1/R=8251	A1=26/R=4238	A1=27/R=12489	39	c.1824+48del1
18:59922605	unknown	R>A1	A1=6/R=8248	A1=7/R=4257	A1=13/R=12505	64	c.1825-34del1
18:59922609	unknown	A>G	G=0/A=8600	G=2/A=4404	G=2/A=13004	67	c.1825-31A>G
18:59925135	rs200097157	T>C	C=15/T=8563	C=1/T=4379	C=16/T=12942	36	c.1897-46T>C
18:59925139	rs201339388	T>G	G=0/T=8578	G=3/T=4385	G=3/T=12963	38	c.1897-42T>G
18:59925169	unknown	G>A	A=0/G=8590	A=1/G=4401	A=1/G=12991	64	c.1897-12G>A

18:59925195	rs138911352	C>T	T=13/C=8581	T=0/C=4404	T=13/C=12985	90	c.1911C>T
18:59925246	rs147529244	T>C	C=0/T=8596	C=23/T=4381	C=23/T=12977	96	c.1962T>C
18:59925286	rs146220305	A>G	G=11/A=8589	G=2/A=4402	G=13/A=12991	88	c.2002A>G
18:59925293	unknown	A>G	G=1/A=8599	G=0/A=4404	G=1/A=13003	87	c.2009A>G
18:59925365	rs191926026	C>G	G=25/C=8541	G=0/C=4388	G=25/C=12929	26	c.2037+44C>G
18:59925728	unknown	R>A1	A1=282/R=7970	A1=194/R=4070	A1=476/R=12040	63	c.2038-16del1
18:59925828	rs139058773	C>T	T=1/C=8599	T=0/C=4406	T=1/C=13005	95	c.2121C>T
18:59925872	unknown	T>C	C=0/T=8598	C=1/T=4405	C=1/T=13003	82	c.2165T>C
18:59925902	unknown	T>C	C=0/T=8598	C=1/T=4403	C=1/T=13001	58	c.2195T>C
18:59925920	unknown	R>A1	A1=1/R=8243	A1=0/R=4258	A1=1/R=12501	43	c.2202+12_2202+14del3
18:59925938	rs3752093	G>A	A=700/G=7874	A=463/G=3933	A=1163/G=11807	29	c.2202+29G>A
18:59925959	unknown	C>A	A=1/C=8553	A=0/C=4372	A=1/C=12925	23	c.2202+50C>A
18:59928702	rs147506371	C>T	T=0/C=8600	T=7/C=4397	T=7/C=12997	107	c.2203-42C>T
18:59928702	rs147506371	C>T	T=0/C=8600	T=7/C=4397	T=7/C=12997	107	c.2203-42C>T
18:59928721	rs77208629	G>A	A=78/G=8522	A=5/G=4399	A=83/G=12921	128	c.2203-23G>A
18:59928729	rs200355694	C>A	A=0/C=8600	A=2/C=4404	A=2/C=13004	138	c.2203-15C>A
18:59928768	rs142362396	C>T	T=0/C=8600	T=2/C=4404	T=2/C=13004	197	c.2227C>T
18:59928782	rs146015918	G>T	T=1/G=8599	T=0/G=4406	T=1/G=13005	202	c.2241G>T
18:59928809	rs201670645	C>G	G=1/C=8599	G=0/C=4406	G=1/C=13005	182	c.2268C>G
18:59928833	rs148689470	A>G	G=0/A=8600	G=1/A=4405	G=1/A=13005	154	c.2292A>G
18:59928885	rs75589884	A>G	G=0/A=8600	G=9/A=4397	G=9/A=12997	84	c.2344A>G
18:59928900	unknown	C>T	T=1/C=8597	T=0/C=4406	T=1/C=13003	67	c.2350+9C>T
18:59928919	unknown	A>G	G=2/A=8598	G=0/A=4404	G=2/A=13002	48	c.2350+28A>G
18:59928933	unknown	C>T	T=1/C=8599	T=0/C=4404	T=1/C=13003	38	c.2350+42C>T
18:59928934	unknown	A>C	C=1/A=8599	C=0/A=4404	C=1/A=13003	36	c.2350+43A>C
18:59931191	unknown	A>G	G=2/A=8596	G=0/A=4406	G=2/A=13002	67	c.2351-31A>G
18:59931244	unknown	G>A	A=1/G=8599	A=0/G=4406	A=1/G=13005	125	c.2373G>A
18:59931247	rs151191309	G>A	A=16/G=8584	A=1/G=4405	A=17/G=12989	125	c.2376G>A
18:59931395	rs17069670	A>G	G=114/A=8484	G=71/A=4335	G=185/A=12819	55	c.2507+17A>G
18:59931941	rs76058161	T>C	C=0/T=8592	C=289/T=4109	C=289/T=12701	43	c.2508-21T>C
18:59932054	unknown	G>A	A=1/G=8593	A=0/G=4400	A=1/G=12993	41	c.2600G>A
18:59932130	unknown	R>A1	A1=0/R=8228	A1=1/R=4233	A1=1/R=12461	18	c.2631+46_2631+50del5
18:59933899	unknown	T>G	G=0/T=8592	G=2/T=4402	G=2/T=12994	82	c.2632-35T>G
18:59933936	unknown	A>G	G=1/A=8587	G=0/A=4406	G=1/A=12993	86	c.2634A>G
18:59934015	rs144245835	T>C	C=0/T=8584	C=16/T=4386	C=16/T=12970	52	c.2680+33T>C
18:59936042	unknown	R>A1	A1=23/R=6207	A1=8/R=2920	A1=31/R=9127	4	c.2681-59del1
18:59936081	rs55806215	A>T	T=1321/A=6863	T=131/A=3863	T=1452/A=10726	6	c.2681-21A>T
18:59936142	rs17645999	C>T	T=2049/C=6549	T=213/C=4193	T=2262/C=10742	49	c.2721C>T
18:59936169	rs78241142	G>A	A=19/G=8579	A=2/G=4402	A=21/G=12981	46	c.2748G>A
18:59936175	rs141500048	T>C	C=0/T=8598	C=2/T=4404	C=2/T=13002	46	c.2754T>C
18:59936200	unknown	C>A	A=0/C=8598	A=1/C=4405	A=1/C=13003	40	c.2760+19C>A
18:59941169	unknown	A>G	G=1/A=8599	G=0/A=4406	G=1/A=13005	57	c.2761-44A>G
18:59941170	unknown	C>A	A=0/C=8600	A=1/C=4405	A=1/C=13005	58	c.2761-43C>A

18:59941254	rs17069686	A>C	C=599/A=8001	C=347/A=4059	C=946/A=12060	138	c.2802A>C
18:59941263	unknown	G>A	A=1/G=8599	A=0/G=4406	A=1/G=13005	135	c.2811G>A
18:59941283	unknown	C>A	A=1/C=8599	A=0/C=4406	A=1/C=13005	125	c.2831C>A
18:59941300	unknown	G>T	T=1/G=8599	T=0/G=4406	T=1/G=13005	109	c.2848G>T
18:59941352	rs147595482	G>A	A=1/G=8597	A=27/G=4379	A=28/G=12976	54	c.2867+33G>A
18:59942565	unknown	G>A	A=0/G=8600	A=3/G=4403	A=3/G=13003	46	c.2868-42G>A
18:59942568	unknown	G>A	A=0/G=8600	A=3/G=4403	A=3/G=13003	48	c.2868-39G>A
18:59942628	unknown	G>A	A=0/G=8600	A=1/G=4405	A=1/G=13005	133	c.2889G>A
18:59942646	rs138241312	G>A	A=8/G=8592	A=2/G=4404	A=10/G=12996	143	c.2907G>A
18:59942670	unknown	A>T	T=1/A=8599	T=0/A=4406	T=1/A=13005	141	c.2931A>T
18:59942691	rs9948159	T>C	C=25/T=8575	C=109/T=4297	C=134/T=12872	154	c.2952T>C
18:59942699	unknown	T>C	C=1/T=8599	C=0/T=4406	C=1/T=13005	156	c.2960T>C
18:59942740	rs201628969	A>G	G=0/A=8600	G=7/A=4399	G=7/A=12999	68	c.2967+34A>G
18:59942745	unknown	R>A1	A1=1/R=8253	A1=2/R=4262	A1=3/R=12515	55	c.2967+40del1
18:59942746	unknown	R>A1; R>A2; R>A3	A1=2543/A2=625/A3=182/R=4902	A1=671/A2=521/A3=28/R=3044	A1=3214/A2=1146/A3=210/R=7946	54	c.2967+40_2967+41insTT
18:59942746	unknown	R>A1; R>A2; R>A3	A1=2543/A2=625/A3=182/R=4902	A1=671/A2=521/A3=28/R=3044	A1=3214/A2=1146/A3=210/R=7946	54	c.2967+41del1
18:59942746	unknown	R>A1; R>A2; R>A3	A1=2543/A2=625/A3=182/R=4902	A1=671/A2=521/A3=28/R=3044	A1=3214/A2=1146/A3=210/R=7946	54	c.2967+40_2967+41insT
18:59947542	unknown	C>G	G=0/C=8598	G=1/C=4405	G=1/C=13003	47	c.2968-51C>G
18:59947597	rs143408856	C>T	T=1/C=8599	T=0/C=4406	T=1/C=13005	110	c.2972C>T
18:59947619	unknown	G>A	A=2/G=8598	A=0/G=4406	A=2/G=13004	124	c.2994G>A
18:59947655	rs148343794	C>T	T=2/C=8598	T=0/C=4406	T=2/C=13004	109	c.3030C>T
18:59947722	unknown	G>A	A=1/G=8599	A=0/G=4406	A=1/G=13005	55	c.3050+47G>A
18:59947726	unknown	R>A1	A1=3/R=8251	A1=0/R=4264	A1=3/R=12515	53	c.3050+52_3050+57del6
18:59947827	unknown	T>C	C=1/T=7159	C=0/T=3136	C=1/T=10295	30	c.3051-52T>C
18:59947832	rs182117869	G>A	A=6/G=8588	A=0/G=4400	A=6/G=12988	34	c.3051-47G>A
18:59947857	unknown	C>G	G=0/C=8600	G=1/C=4403	G=1/C=13003	46	c.3051-22C>G
18:59947906	unknown	C>G	G=1/C=8597	G=0/C=4406	G=1/C=13003	56	c.3078C>G
18:59947970	rs74513184	R>A1	A1=851/R=7389	A1=1164/R=3100	A1=2015/R=10489	33	c.3114+29_3114+30del2
18:59947980	unknown	T>A	A=1/T=8595	A=0/T=4406	A=1/T=13001	29	c.3114+38T>A
18:59947988	rs1506325	G>A	A=3579/G=5019	A=1855/G=2551	A=5434/G=7570	26	c.3114+46G>A
18:59949521	unknown	A>G	G=1/A=8599	G=0/A=4406	G=1/A=13005	76	c.3115-18A>G
18:59949553	unknown	G>A	A=1/G=8599	A=0/G=4406	A=1/G=13005	117	c.3129G>A
18:59949598	unknown	C>T	T=0/C=8600	T=1/C=4405	T=1/C=13005	147	c.3174C>T
18:59949652	rs145307507	C>T	T=1/C=8599	T=0/C=4406	T=1/C=13005	163	c.3228C>T
18:59949699	rs117792984	T>C	C=0/T=8600	C=2/T=4404	C=2/T=13004	106	c.3253+22T>C
18:59949716	unknown	G>A	A=0/G=8600	A=1/G=4405	A=1/G=13005	84	c.3253+39G>A
18:59954536	unknown	G>C	C=0/G=8598	C=1/G=4405	C=1/G=13003	57	c.3254-48G>C
18:59954565	unknown	R>A1	A1=13/R=8239	A1=18/R=4246	A1=31/R=12485	91	c.3254-18del1

18:59954602	unknown	A>G	G=1/A=8599	G=0/A=4406	G=1/A=13005	141	c.3272A>G
18:59954659	rs137937451	C>T	T=1/C=8599	T=0/C=4406	T=1/C=13005	183	c.3329C>T
18:59954663	rs17646799	G>A	A=19/G=8581	A=1/G=4405	A=20/G=12986	182	c.3333G>A
18:59954677	rs145936814	C>G	G=0/C=8598	G=3/C=4403	G=3/C=13001	183	c.3347C>G
18:59954682	unknown	A>G	G=1/A=8597	G=0/A=4406	G=1/A=13003	181	c.3352A>G
18:59954710	rs200808561	T>C	C=2/T=8596	C=1/T=4403	C=3/T=12999	150	c.3370+10T>C
18:59954736	rs190692484	G>A	A=2/G=8596	A=0/G=4406	A=2/G=13002	115	c.3370+36G>A
18:59954740	rs182803183	C>A	A=12/C=8586	A=0/C=4406	A=12/C=12992	112	c.3370+40C>A
18:59954745	unknown	C>A	A=0/C=8598	A=1/C=4405	A=1/C=13003	105	c.3370+45C>A
18:59958740	unknown	G>T	T=1/G=8599	T=0/G=4406	T=1/G=13005	99	c.3371-36G>T
18:59958742	unknown	R>A1	A1=21/R=8233	A1=2/R=4262	A1=23/R=12495	102	c.3371-33_3371-30del4
18:59958811	unknown	C>T	T=1/C=8599	T=0/C=4406	T=1/C=13005	146	c.3406C>T
18:59958824	rs201823885	G>A	A=1/G=8599	A=0/G=4406	A=1/G=13005	141	c.3419G>A
18:59958829	rs139480966	C>T	T=1/C=8599	T=0/C=4406	T=1/C=13005	137	c.3424C>T
18:59958830	unknown	G>A	A=1/G=8599	A=0/G=4406	A=1/G=13005	136	c.3425G>A
18:59958880	rs150153857	T>C	C=0/T=8600	C=56/T=4350	C=56/T=12950	95	c.3459+16T>C
18:5995990	unknown	R>A1	A1=23/R=8175	A1=17/R=4227	A1=40/R=12402	27	c.3460-32_3460-31del2
18:5995991	unknown	T>C	C=1/T=8549	C=0/T=4398	C=1/T=12947	27	c.3460-32T>C
18:5996049	unknown	A>G	G=1/A=8593	G=0/A=4406	G=1/A=12999	60	c.3486A>G
18:5996101	unknown	A>G	G=1/A=8593	G=0/A=4406	G=1/A=12999	59	c.3530+8A>G
18:5996108	unknown	C>A	A=0/C=8594	A=1/C=4405	A=1/C=12999	54	c.3530+15C>A
18:59972738	unknown	T>C	C=0/T=8600	C=1/T=4405	C=1/T=13005	127	c.3622T>C
18:59972777	unknown	A>G	G=0/A=8600	G=1/A=4405	G=1/A=13005	88	c.*10A>G
18:59972793	rs78688877	C>A	A=0/C=8600	A=77/C=4329	A=77/C=12929	75	c.*26C>A
18:59972814	rs199979310	G>A	A=3/G=8595	A=0/G=4406	A=3/G=13001	57	c.*47G>A

Tableau 17 : Récapitulatif de tous les variants du gène *KIAA1468* dans Exome Variant Server, la mutation non sens trouvée dans la population Africo-américaine est en couleur violet (rectangle jaune), les variants faux sens sont en couleur rouge, les variants codant-synonymes sont en vert et les variants en 5'UTR et en 3' UTR sont en orange.

La mutation c.1675C>T p.R559* conduit à un codon **STOP** au niveau de l'exon 11 du gène *KIAA1468* (**Figure 45**) entraînant, a priori, une même conséquence sur la production d'une protéine tronquée avec une perte des trois domaines répétés HEAT de la protéine *KIAA1468* comme la délétion hétérozygote chez le probant. En se basant sur la prédiction des conséquences protéiques avec la perte des domaines HEAT entre notre probant et l'individu sain rapporté dans Exome Variant Server, il est difficile d'établir une corrélation entre le phénotype d'encéphalopathie observé et des mutations du gène *KIAA1468*.

En conclusion, nous ne pouvons aujourd'hui confirmer la causalité de l'altération du gène *KIAA1468* dans la symptomatologie du probant. Bien qu'il y ait une profondeur de lecture moyenne pour ce séquençage estimée à 105, il sera pertinent de contacter l'équipe qui a effectué cette analyse pour confirmer par séquençage ciblé de type Sanger la présence de cette mutation ponctuelle chez cet individu. Par ailleurs, des études moléculaires complémentaires sont nécessaires afin d'étudier l'effet de la délétion sur la production et la fonction de la protéine tronquée (WesternBlot).

4. DI sévère, encéphalopathie infantile précoce et délétion du gène *FABP7*

FABP7 appartient à la famille des gènes codant des protéines de transport des acides gras. Cette famille de gènes contient au moins 10 membres parmi lesquels *FABP3*, *FABP5* et *FABP7* sont exprimés au niveau du cerveau (Liu et al., 2010 ; Sellner, 1994). Les gènes de cette famille ont des fonctions importantes dans le développement cérébral notamment la différenciation des cellules neuronales et gliales, et la migration neuronale (Feng et al., 1994 ; Kurtz et al., 1994, Feng et al., 1995, Moullé et al., 2012). *FABP7* est l'une des cibles de la voie de signalisation de Notch qui régule son expression au niveau des cellules gliales et radiales (Anthony et al., 2005). *FABP7* se compose de 4 exons dans un intervalle génomique de 4,57 kb en 6q22.31. Des taux élevés des protéines *FABP* cérébrales ont été observés dans le sérum de patients atteints de troubles cognitifs démentiels (Alzheimer, Parkinson) par rapport à une population témoin (Teunissen et al., 2011). Des études d'association ont montré dans certaines cohortes de patients une association entre *FABP7* et la schizophrénie et les désordres bipolaires (Watanabe et al., 2007; Iwayama et al., 2009). Nous avons identifié une délétion interstitielle de novo en 6q22.31 emportant le gène *FABP7* chez une fille de 14 ans présentant une encéphalopathie convulsivante responsable d'une DI sévère. Le profil d'expression cérébral et le rôle dans la neurogenèse précoce sont des éléments indirects qui pourraient orienter vers un rôle de la délétion *de novo* du gène *FABP7* dans le phénotype observé chez le probant. Les deux autres gènes *PKIB* et *SMPD3A* inclus dans la délétion n'ont pas d'élément d'annotation, à ce jour, en faveur d'un rôle majeur dans le phénotype du probant. Le séquençage de l'allèle normal n'a pas révélé de variation de la séquence du gène *FABP7* permettant au seuil de résolution de notre analyse d'éliminer un mode de transmission autosomique récessive. Néanmoins, les variants délétères peuvent se situer dans

d'autres régions du gène non explorées (promoteur, enhancer, silencer...). Nous n'avons pas pu apprécier les conséquences de ce remaniement sur l'expression du gène *FABP7* car le niveau d'expression dans le sang est trop faible dans les conditions physiologiques.

Actuellement, dans les données de la littérature 4 cas de délétion de la région 6q22 ont été rapportés avec dans la base DECIPHER les patients, ID 249733 (taille de la délétion 13.48 Mb contenant 49 gènes), ID 249645 (taille de la délétion 15.41 Mb contenant 57 gènes), ID 1560 (taille de la délétion 9.91 Mb contenant 30 gènes) et le patient ID 248885 (taille de la délétion 8.79 Mb contenant 28 gènes) (**Figure 31**). Les délétions sont toutes de plus grande taille rendant difficile les corrélations génotype phénotype. Toutefois, le phénotype décrit chez ces patients ne signale pas d'encéphalopathie convulsivante. Par ailleurs, la consultation des bases de données sur le séquençage de l'exome rassemblant les variants génomiques observés en population dite témoin retrouve : (1) Pour le NHLBI Exome Sequencing Project (*Exome Variant Server*) (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) dans la population témoin étudiée, on note parmi les mutations identifiées, une mutation frameshift (c.316_317ins, p.R107Kfs*4) (**Figure 46**), et 7 mutations faux-sens (**tableau 18**) dans la population Euro-américaine et une mutation non sens et une mutation faux-sens supplémentaires dans la population Afro-américaine ; (2) Pour le projet 1000 Genomes (<http://browser.1000genomes.org>), il n'y a pas de nouvelles mutations par rapport à EVS

Variant Pos	rs ID	Alleles	EA Allele #	AA Allele #	All Allele #	Avg. Sample Read Depth	Genes	cDNA Change	cDNA Size	Protein Change
6:123100915	rs114011179	T>G	G=4/T=8596	G=62/T=4344	G=66/T=12940	58	FABP7	c.-25T>G	399	NA
6:123100925	unknown	G>C	C=1/G=8599	C=0/G=4406	C=1/G=13005	67	FABP7	c.-15G>C	399	NA
6:123100928	rs200752405	G>A	A=1/G=8599	A=0/G=4406	A=1/G=13005	70	FABP7	c.-12G>A	399	NA
6:123100943	rs138028097	G>T	T=1/G=8599	T=0/G=4406	T=1/G=13005	81	FABP7	c.4G>T	399	p.(V2L)
6:123101001	rs142639478	T>C	C=1/T=8599	C=0/T=4406	C=1/T=13005	80	FABP7	c.62T>C	399	p.(M21T)
6:123101401	unknown	C>T	T=3/C=8597	T=2/C=4404	T=5/C=13001	41	FABP7	c.74-35C>T	399	NA
6:123101438	rs146035139	G>A	A=1/G=8599	A=0/G=4406	A=1/G=13005	73	FABP7	c.76G>A	399	p.(V26M)
6:123101473	rs139990122	C>G	G=3/C=8597	G=0/C=4406	G=3/C=13003	87	FABP7	c.111C>G	399	p.(T37=)
6:123101481	rs202040158	C>T	T=1/C=8599	T=1/C=4405	T=2/C=13004	91	FABP7	c.119C>T	399	p.(T40M)
6:123101482	rs149239919	G>A	A=1/G=8599	A=2/G=4404	A=3/G=13003	91	FABP7	c.120G>A	399	p.(T40=)
6:123101544	rs2279381	C>T	T=1/C=8599	T=0/C=4406	T=1/C=13005	87	FABP7	c.182C>T	399	p.(T61M)
6:123101545	unknown	G>A	A=1/G=8599	A=0/G=4406	A=1/G=13005	85	FABP7	c.183G>A	399	p.(T61=)
6:123101647	rs2243372	A>G	G=4975/A=3625	G=2489/A=1917	G=7464/A=5542	23	FABP7	c.246+39A>G	399	NA
6:123102218	unknown	C>A	A=2/C=8598	A=0/C=4406	A=2/C=13004	97	FABP7	c.247-20C>A	399	NA
6:123102239	unknown	R>A1	A1=37/R=8217	A1=20/R=4244	A1=57/R=12461	120	FABP7	c.249_251del3	399	p.(S83_V84delinsS)
6:123102279	rs12211883	G>A	A=42/G=8558	A=1/G=4405	A=43/G=12963	139	FABP7	c.288G>A	399	p.(D96=)
6:123102307	unknown	R>A1	A1=1/R=8253	A1=0/R=4264	A1=1/R=12517	133	FABP7	c.316_317insT	399	p.(R107Kfs*4)
6:123102307	rs147711680	G>A	A=2/G=8598	A=0/G=4406	A=2/G=13004	133	FABP7	c.316G>A	399	p.(V106I)
6:123102345	rs114216518	T>C	C=3/T=8597	C=179/T=4227	C=182/T=12824	120	FABP7	c.348+6T>C	399	NA
6:123102386	rs188839950	C>A	A=26/C=8574	A=4/C=4402	A=30/C=12976	66	FABP7	c.348+47C>A	399	NA
6:123104788	unknown	T>C	C=1/T=3181	C=0/T=1384	C=1/T=4565	126	FABP7	c.349-74T>C	399	NA
6:123104890	unknown	T>C	C=1/T=8599	C=0/T=4406	C=1/T=13005	167	FABP7	c.377T>C	399	p.(V126A)
6:123104920	rs200491146	C>G	G=3/C=8597	G=0/C=4406	G=3/C=13003	143	FABP7	c.*8C>G	399	NA
6:123104949	unknown	T>C	C=2/T=8598	C=0/T=4406	C=2/T=13004	100	FABP7	c.*37T>C	399	NA

Tableau 18 : Séquençage à haut débit de type "exome" dans la base de données NHLBI Exome Sequencing Project "Exome Variant Server" avec tous les variants du gène *FABP7* rapportés, une mutation frameshift c.316_317insT, p.(R107Kfs*4) (*rectangle jaune*) et 7 mutations faux-sens ont été identifiées chez des sujets sains (*couleur rouge*) dans la population Euro-américaine. Variant en 5'UTR ou 3'UTR (orange), variant faux-sens (rouge), variant intronique (blanc), variant codant synonyme (vert), variant non-sens ou frameshift (rose).

123,100,646

6q22.31

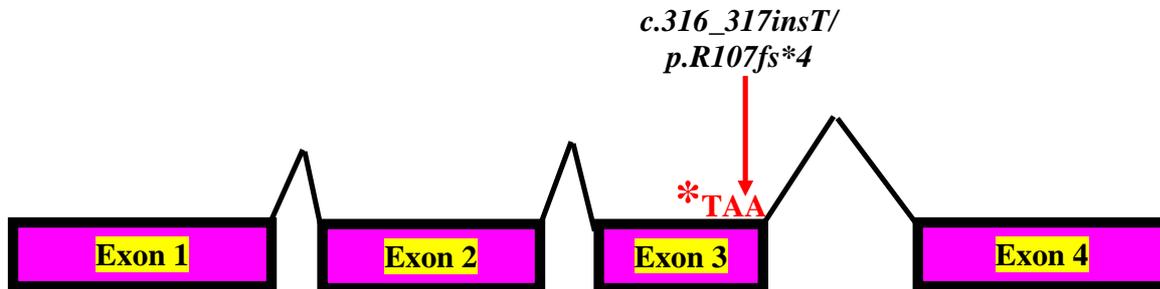


Figure 46 : Structure du gène *FABP7* avec sa position génomique en 6q22.31 et ses 4 exons (*ENST00000368444*), la mutation c.316_317insT/p.R107fs*4 se situe au niveau de l'exon 3 du gène. La mutation c.316_317insT entraîne un **codon STOP** prématuré à position 110 de la protéine FABP7 (la protéine FABP7 avec 132 acides aminés) avec la perte des 22 acides aminés à son extrémité C-terminal. Les rectangles en rose indiquent les exons du gène *FABP7* et les traits simples entre les 2 deux exons (rectangle rose) désignent l'intron du gène. * **TAA** (**PTC** : Premature Termination Codon).

En conclusion, si le caractère *de novo* du CNV, délétion qui comprend un gène candidat *FABP7* dont le profil d'expression et le rôle au cours du développement cérébral sont des éléments d'orientation intéressants. il n'en demeure pas moins que la mutation frameshift c.316_317insT trouvée chez un individu sain de la population Euro-américaine et la mutation non sens p.E108X chez un autre individu sain de la population Afro-américaine, avec une profondeur moyenne de lecture du séquençage de 100 doivent nous rendre très prudent dans l'interprétation du CNV quant à sa causalité. A nouveau, il sera indiqué de pouvoir se rapprocher de l'équipe qui à identifier ces 2 variants nucléotidiques afin de confirmer leur présence par un séquençage type Sanger chez les deux témoins. Il faut souligner que *FABP7* appartient à une famille de gènes et que la redondance fonctionnelle au sein de cette famille pourrait expliquer le caractère neutre d'un tel CNV.

5. L'analyse chromosomique sur microréseau haute résolution 1M ciblée sur les gènes de la déficience intellectuelle

Nous avons envisagé l'évaluation d'une puce correspondant à un microréseau de sondes de très haute résolution, ciblée sur les gènes de DI. Notre raisonnement a été basé sur deux observations : (i) à côté des déséquilibres exoniques, des anomalies siégeant dans les introns ou dans les régions intergéniques situées en amont et aval d'un gène peuvent contribuer à la dérégulation de son expression, via des anomalies de l'épissage, des altérations de séquences régulatrices situées à distance tels des enhanceurs ou silencers ; (ii) le fait de cibler l'analyse sur des gènes connus pour être associés à la survenue d'une DI renforce l'implication d'un tel microremaniement à l'origine de la DI chez les individus étudiés. Actuellement, les puces utilisées à titre diagnostique reposent sur un microréseau d'oligonucléotides d'une résolution moyenne de 180 K (type Agilent) avec une couverture très inégale et parfois incomplète des gènes de la DI.

L'aspect novateur de l'ACM DIS (Déficience Intellectuelle Spécifique) porte sur sa conception couvrant à très haute résolution (1M), les exons, les introns et les régions en amont et aval les gènes de DI. La population étudiée a porté sur une cohorte de 46 individus atteints d'une DI modérée à sévère non syndromique, sans anomalie génomique identifiée au préalable à l'aide d'une analyse sur microréseau 180K.

Au stade d'analyse des résultats obtenus, l'ACM a été pu être analysée selon les critères qualité requis pour 45 des 46 patients étudiées. **Pour un patient sur les 45 (2,2%) un diagnostic d'anomalie délétère a été rendu possible grâce à cette puce DIS.** Il s'agit d'un réarrangement exonique du gène *ZEB2* responsable du syndrome de Mowat-Wilson. Le diagnostic du syndrome de Mowat-Wilson est principalement basé sur les signes cliniques notamment la dysmorphie cranio-faciale à laquelle s'ajoutent d'autres malformations associées, en particulier la maladie de Hirschsprung, néanmoins considérée comme un élément inconstant dans ce syndrome. Le syndrome de Mowat-Wilson est causé par des mutations ponctuelles ou des délétions du gène *ZEB2*. A ce jour, différentes tailles de délétions du gène *ZEB2* ont été rapportées. En ce qui concerne les délétions partielles, la perte de l'exon 1 du gène *ZEB2* ont été révélée par PCR multiplex fluorescente chez un patient et 2 autres patients ayant des délétions intragéniques cryptiques identifiées par MLPA (des exons 4 à 10 chez un patient et exons 5 à 10 chez un autre). Cependant, cette méthode de MLPA vise seulement les patients pour lesquels le diagnostic clinique a été évoqué, orientant ainsi de façon ciblée l'analyse du gène *ZEB2*. Dans notre étude,

le cas-index avait des éléments de la dysmorphie faciale du syndrome de Mowat-Wilson (tableau 19), une déficience intellectuelle sévère, des anomalies malformatives congénitales, sans maladie de Hirschsprung. Seul l'ACM DIS 1M a permis de faire le diagnostic chez ce patient. La délétion partielle exonique de 28.37 kb, *de novo*, du gène *ZEB2* a échappé à la détection avec la technique d'ACM 105K. Les points de cassure ont été finalement cartographiés entre l'intron 4 et l'exon 10 résultant en un codon stop prématuré et une protéine tronquée de 159 acides aminés avec l'absence de plusieurs domaines fonctionnels. Ce résultat illustre la capacité de l'ACM DIS 1M à identifier des microremaniements exoniques de petite taille et dans le cas présent à assurer (i) un diagnostic précis contribuant à une meilleure évaluation pronostique pour le suivi médical du probant et (ii) un conseil génétique pour la famille.

Signes cliniques de la patiente	Signes cliniques des cas de syndrome de Mowat-Wilson déjà rapportés dans la littérature
Microcéphalie post-natale (-2.6 DS)	Microcéphalie
Hypertélorisme	Hypertélorisme
Oreilles décollées en rotation postérieure, implantation basse des oreilles, grands lobes remontés possédant une dépression centrale	Lobules larges et grands, remontés possédant une dépression centrale
Cardiopathies congénitales (Persistance du canal aortique)	Cardiopathies congénitales [(Persistance du canal aortique, sténose pulmonaire, CIA, CIV)]
Déficience intellectuelle sévère	Déficience intellectuelle sévère constante
Agénésie du corps calleux	Agénésie ou hypoplasie du corps calleux
(-)	Constipation/ maladie de Hirschsprung
Reflux vésico-urinaire, lèvre inférieure éversée, retard de langage, pieds équins, columelle basse	Anomalies uro-génitales, lèvre inférieure éversée, retard de langage, fente palatine, sténose pylorique, anomalies rénales, hypospadias chez le garçon, ...
Délétion 28.37 kb du gène <i>ZEB2</i> (des exons 5 à une partie de l'exon 10)	Haplo insuffisance du gène <i>ZEB2</i> (délétion intragénique ou mutations délétères) (Garavelli. L et al, 2007)

Tableau 19 : Comparaison des signes cliniques chez notre patiente avec des cas de syndrome de Mowat-Wilson rapportés dans la littérature, CIA : Communication InterAuriculaire et CIV : Communication InterVentriculaire.

Parmi les 28 délétions touchant au moins une région exonique d'un des 435 gènes ciblés, nous constatons que 19 CNV concernent des **régions très riches en GC (pourcentage en GC > 55%)** et contiennent souvent l'exon 1 du gène. Plusieurs travaux ont montré que le pourcentage en GC avait une influence sur le log₂ratio. Les variations du pourcentage en GC en fonction des régions du génome sont responsables de l'apparition de « vagues » appelées « GC-Waves » qui sont artéfactuelles (Leo et al. 2012). Les régions riches en GC correspondent aux creux de ces vagues (pseudo-délétions) et les régions plus pauvres en GC aux sommets de ces vagues (pseudo-amplifications) (Marioni et al. 2007). Les 19 délétions dans des régions riches en GC que nous avons observées sont donc très probablement des faux-positifs. Il serait par conséquent intéressant de revoir le design de l'ACM-1M-DIS en limitant le nombre de sondes localisées dans ces régions afin de limiter ces artéfacts. Par ailleurs, des algorithmes de correction de ces « vagues » artéfactuelles liées aux variations du pourcentage en GC dans le génome ont été développés par les bio-informaticiens (Leo et al. 2012) et leur application sur nos données permettrait vraisemblablement de les corriger.

Nous avons identifié 81 CNV touchant les régions en amont ou en aval des 435 gènes candidats ciblés. Si on élimine les régions décrites au moins une fois dans DGV comme polymorphes, il ne reste que 2 CNV. Nous avons décidé de ne pas retenir ce filtre, en effet les polymorphismes de la base DGV ne sont pas vérifiés par une seconde technique et sont souvent de taille beaucoup plus grande que les CNV détectés par notre ACM-1M-DIS. En effet, dans la littérature, peu d'études sur les polymorphismes ont utilisé des ACM de si haute résolution et les polymorphismes de très petite taille sont donc peu décrits. Il est par conséquent plus adapté d'utiliser nos propres données : nous nous basons sur les CNV récurrents dans notre série de 45 patients que nous considérons comme des CNP (Copy Number Polymorphism) étant donnée l'hétérogénéité génétique des DI. Par ailleurs, comme l'ont montré Thierry et al., 2012 pour la région 1q44, il faut retenir que certains des polymorphismes répertoriés dans DGV sont en fait des faux-positifs.

CONCLUSION et PERSPECTIVES

Le nombre de gènes impliqués dans la déficience intellectuelle augmente rapidement au regard des analyses de séquençage sur l'exome dans des cohortes de patients étudiés (Vissers et al, 2010 ; de Ligt et al, 2012 ; Rauch et al, 2012). Bien que la découverte de mutations dans de nouveaux gènes représente une étape importante dans la compréhension des mécanismes génétiques de la DI, il y a un besoin manifeste de réplication de toutes ces études pour valider les résultats obtenus sur plusieurs populations (O'Roak et al, 2012).

Si la survenue *de novo* d'un CNV est un élément évocateur de son implication dans la maladie, il est bien reconnu maintenant que les mutations germinales *de novo* surviennent dans la population générale (Kong et al, 2012) et une étude récente sur les résultats de séquençage haut débit génomique relève une estimation de 100 variants « perte de fonction » par individu en moyenne, avec environ 20 gènes complètement inactivés (MacArthur et al, 2012). Ces données témoignent de la redondance fonctionnelle de certains de nos gènes. Toutefois ces données sont préliminaires sur une série limitée de populations et seules les analyses à long terme pourront s'assurer du caractère non pathogène de ces variants.

Le taux de mutation *de novo* concernant les CNV >100 kb est estimé à 1/50 individus (Itsara et al, 2010), en revanche le taux de mutation *de novo* pour les CNV <100 kb n'est pas encore bien connu. Des exemples de CNV survenus *de novo* sans rapport pertinent avec un phénotype ont été décrits (Vermeesch et al, 2011). Ainsi la délétion *de novo* affectant le gène *MACROD2* a été identifiée chez un patient avec un syndrome de KABUKI. L'analyse ultérieure du gène *MLL2* a révélé la présence d'une mutation *de novo* expliquant la phénotype clinique donc ici non relié au CNV.

Récemment, le gène *RAB40AL* (MIM 300405) a été associé à la survenue du syndrome de Martin-Probst (MIM 300519) (surdité, DI et petite taille) avec la présence d'une substitution de 2 nucléotides (c.176_177AC>GA) conduisant à un changement faux sens d'acide aminé (p.Asp59Gly) à l'origine d'une délocalisation de la protéine cellulaire (Bedoyan, et al, 2012). Cette variation a cependant été décrite chez deux individus males dans la population de la base Exome Variant Server (ESV). Une autre étude (Kalscheuer et al, 2013) a rapporté cette même variation en démontrant clairement qu'elle ne coségrégait pas avec le phénotype malade, mettant ainsi en doute l'implication de ce gène dans le syndrome. Si le gène *ADAM33* a été considéré

comme un gène candidat d'une forme dominante d'autisme de par la découverte de mutation tronquante *de novo* chez un probant avec autisme, 5 variants dont 3 non sens et 2 variants d'épissage ont ensuite été décrits dans la population témoin de la cohorte NHLBI (ESV) (Sanders et al, 2012), résultat non en faveur de son implication dans l'autisme ou alors avec une pénétrance incomplète.

La consultation de ces bases de données est indispensable aussi dans le cas d'un gène reconnu comme impliqué dans la DI. En effet certains variants rares pourraient être à tort considérés comme pathogènes car survenant dans un gène connu de DI mais finalement retrouvés dans la population témoin (Bell et al, 2013).

S'agissant des perspectives de l'ACM DIS 1M, quatre points sont à aborder :

1-La poursuivre les contrôles des CNV

Dans cette première phase de l'étude, nous n'avons pas exploité la totalité des résultats obtenus. Nous avons contrôlé une partie des CNV qui nous semblaient avoir la plus grande probabilité d'être délétère. De nombreux CNV avec effet potentiellement délétère restent à explorer. En effet, une des particularités de notre design est d'explorer à haute résolution les parties intergéniques en amont et en aval des gènes d'intérêt car elles contiennent de potentielles régions régulatrices de l'expression des gènes voisins. Il est donc important de contrôler ces CNV en commençant par les régions les plus conservées au cours de l'évolution. Un grand nombre de gènes impliqués dans des DI de transmission autosomique récessive ont été intégrés au design et cette piste reste également à explorer.

2. Etudier de plus grandes cohortes de patients

Nous avons étudié une cohorte de petite taille (46 patients). Les DI d'origine génétique peuvent être dues soit à des mutations ponctuelles dans un gène de DI soit des remaniements génomiques de type CNV. Si on prend l'exemple du gène *ZEB2* dans le syndrome de Mowat-Wilson, le nombre de patients avec une mutation ponctuelle dans le gène est beaucoup plus important que ceux avec une délétion partielle du gène. Les mutations ponctuelles DI ne peuvent pas être mises en évidence par l'ACM, par conséquent l'ACM-1M-DIS n'apportera pas de réponse chez une importante partie de la cohorte. Il est donc nécessaire d'étudier de grandes cohortes de patients afin de mettre en évidence des CNV délétères affectant les gènes de DI.

3. Revoir le design de l'ACM-1M-DI

Une troisième version de l'ACM-1M-DI serait nécessaire. Les données que nous avons obtenues sur ces 45 patients nous permettront de sélectionner les régions génomiques très polymorphes et les régions génomiques génératrices de faux-positifs (notamment les régions riches en GC) afin de supprimer les oligonucléotides positionnés dans ces régions sur le nouveau design. Un autre point à revoir est la résolution qui pourrait éventuellement être réduite et également le nombre de gènes ciblés qui pourrait être vu à la baisse (suppression de certains gènes candidats). Ces révisions permettraient peut-être de passer à un format deux fois 400K afin de réduire les coûts et d'étudier plus de patients.

4. NGS

Enfin, les données actuelles laissant à penser que la technologie de séquençage haut débit ciblée sur nos gènes candidats devrait permettre à la fois de détecter les mutations ponctuelles et les CNV en une seule expérience, modifiant ainsi la stratégie diagnostique au profit du NGS dans les années à venir.

BIBLIOGRAPHIE

Aaker JD, Patineau AL, Yang HJ, Ewart DT, Nakagawa Y, McLoon SC, Koyano-Nakagawa N. Interaction of MTG family proteins with NEUROG and ASCL1 in the developing nervous system. *Neurosci. Lett.* 2010; 474 : 46-51.

Anthony TE, Mason HA, Gridley T, Fishell G, Heintz N. Brain lipid-binding protein is a direct target of Notch signaling in radial glial cells. *Genes and Development.* 2005; 19 : 1028-1033.

BBadano JL, Katsanis N. Beyond Mendel : an evolving view of human genetic disease transmission. *Nat. Rev. Genet.* 2002; 3 : 779-789.

Baertsch R, Diekhans M, Kent WJ, Haussler D, Brosius J. Retrocopy contributions to the evolution of the human genome. *BMC Genomics.* 2008; Oct 8;9 : 466.

Bagni C, Tassone F, Neri G, Hagerman R. Fragile X syndrome : causes, diagnosis, mechanisms and therapeutics. *J. Clin. Invest.* 2012; 122(12) : 4314-4322.

Blankenberg D, Von Kuster G, Coraor N, Ananda G, Lazarus R, Mangan M, Nekrutenko A, Taylor J. "Galaxy : a web-based genome analysis tool for experimentalists". *Current Protocols in Molecular Biology.* 2010 Jan; Chapter 19 : Unit 19.10.1-21.

Bedoyan, J.K., Schaibley, V.M., Peng, W., Bai, Y., Mondal, K., Shetty, A.C., Durham, M., Micucci, J.A., Dhiraaj, A., Skidmore, J.M., et al. (2012). Disruption of RAB40AL function leads to Martin—Probst syndrome, a rare X-linked multisystem neurodevelopmental human disorder. *J. Med. Genet.*; 49 : 332–340.

Bell, C.J., Dinwiddie, D.L., Miller, N.A., Hateley, S.L., Ganusova, E.E., Mudge, J., Langley, R.J., Zhang, L., Lee, C.C., Schilkey, F.D., et al. (2011). Carrier testing for severe childhood recessive diseases by next-generation sequencing. *Sci. Transl. Med.*; 3 : ra4..

Bokhoven vH. . Genetic and Epigenetic Networks in Intellectual Disabilities. *Annu. Rev. Genet.* 2011; 45 : 81-104.

Bonnet C, Ali Khan A, Bresso E, Vigouroux C, Béri M, Lejczak S, Deemer B, Andrieux J, Philippe C, Moncla A, Giurgea I, Devignes MD, Leheup B, Jonveaux P. Extended spectrum of MBD5 mutations in neurodevelopmental disorders. *Eur. J. Hum. Genet.* 2013 : Feb 20. Doi : 10.1038/ejhg.2013.22.

Bryson SE, Bradley EA, Thompson A, Wainwright A. Prevalence of autism among adolescents with intellectual disabilities. *Can. J. Psychiatry.* 2008; 53(7) : 449-459.

Burnside RD, Pasion R, Mikhail FM, Carroll AJ, Robin NH, Youngs EL, Gadi IK, Keitges E, Jaswaney VL, Papenhausen PR, Potluri VR, Risheg H, Rush B, Smith JL, Schwartz S, Tepperberg JH, Butler MG. Microdeletion/microduplication of proximal 15q11.2 between BP1 and BP2 : a susceptibility region for neurological dysfunction including developmental and language delay. *Hum. Genet.* 2011 Oct; 130(4) : 517-28.

Crepel A, Breckpot J, Fryns J-P, De la Marche W, Steyaert J, Devriendt K, Peeters H. DISC1 duplication in two brothers with autism and mild mental retardation. *Clin. Genet.* 2010; 77 : 389-394.

Davis HP, Squire LR. Protein synthesis and memory : a review. *Psychol. Bull.* 1984; 96(3) : 518-559.

Davis JN, McGhee L, Meyers S. The ETO (MTG8) gene family. *Gene.* 2003; 303 : 1-10.

De Ligt J, Willemsen MH, Van Bon WB, Kleefstra T, Yntema GH, Kroes T, Vulto-van Silfhout TA, Koolen AD, De Vries P, Gilissen C, Rosario DE, Hoischen A, Scheffer H, de Vries BAB, Brunner GH, Veltman AJ, Vissers ELML. Diagnostic Exome Sequencing in Persons With Severe Intellectual Disability. *N. Eng. J. Med.* 2012; 367(20) : 1921-1929.

Donahue ML, Ryan RM. Interstitial deletion of 8q21-q22 associated with minor anomalies, congenital heart defect, and Dandy-Walker variant. *Am. J. Med. Genet.* 1995; 56(1) : 97-100.

Faulkner EN, Dujardin LD, Tai CY, Vaughant TK, O'Connell BC, Wang LY, Vallee BR. A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function. *Nature Cell Biology.* 2000; 2 : 784-791.

Feng L, Hatten ME, Heintz N. Brain lipid-binding protein (BLBP) : a novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron.* 1994; 12(4) : 895-908.

Feng L and Heintz N. Differentiating neurons activate transcription of the brain lipid-binding protein gene in radial glia through a novel regulatory element. *Development.* 1995; 121 : 1719-1730.

Fombonne E, Simmons H, Ford T, Meltzer H, Goodman R. Prevalence of pervasive developmental disorders in the British nationwide survey of child mental health. *International Review of Psychiatry.* 2003; 15(1-2) : 158-165.

Frühmesser A, Blake J, Haberlandt E, Baying B, Raeder B, Runz H, Spreiz A, Fauth C, Benes V, Utermann G, Zschocke J, Kotzot D. Disruption of EXOC6B in a patient with developmental delay, epilepsy, and a de novo balanced t(2;8) translocation. *Eur. J. Med. Genet.* 2013 doi : 10.1038/ejhg.2013.18

Fryburg JS, Golden WL : interstitial deletion of 8q13.3-->22.1 associated with craniosynostosis. *Am. J. Med. Genet.* 1993; 45 : 638-641.

Garavelli L, Mainardi PC. Mowat-Wilson syndrome. *Ophanet J Rare Dis.* 2007; 2 :42.

Giardine B, Riemer C, Hardison RC, Burhans R, Elnitski L, Shah P, Zhang Y, Blankenberg D, Albert I, Taylor J, Miller W, Kent WJ, Nekrutenko A. "Galaxy : a platform for interactive large-scale genome analysis." *Genome Research.* 2005 Oct; 15(10) : 1451-5.

Girirajan S, Rosenfeld JA, Cooper GM, Antonacci F, Siswara P et al. A recurrent 16p12.1 microdeletion supports a two-hit model for severe developmental delay. *Nat. Genet.* 2010; 42(3) : 203-209.

Goecks, J, Nekrutenko, A, Taylor, J and The Galaxy Team. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol.* 2010 Aug 25; 11(8) : R86.

Gu W, Zhang F, Lupski RJ. Mechanisms for human genomic rearrangements. *PathoGenetics.* 2008; 1(4) : 1-17.

Hassold T, Sherman S. Down syndrome : genetic recombination and the origin of the extra chromosome 21. *Clin. Genet.* 2000; 57 : 95-1000.

Horani A, Druley TE, Zariwala MA, Patel AC, Levinson BT, et al. Whole-exome capture and sequencing identifies HEART2 mutation as a primary cause of primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Hum. Genet.* 2012; 91(4) : 685-693.

Huang K. De novo paradigm : the ultimate answer to the paradox in mental retardation. *Clin. Genet.* 2011; 79(5) : 427-428.

Herrmann J, Pallister PD, Tiddy W, Opitz JM : The KBG syndrome-syndrome of short stature, characteristic facies, mental retardation, macrodontia and skeletal anomalies. *Birth. Defects. Orig. Artic. Ser.* 1975; 11 : 7-18.

Itsara A, Wu H, Smith JD, Nickerson DA, Romieu I, London SJ, Eichler EE. De novo rates and selection of large copy number variation. *Genome Research.* 2010; 20 : 1469-1481.

Iwayama Y, Hattori E, Maekawa M, Yamada K, Toyota T, Ohnishi T, Iwata Y et al. Association Analyses Between Brain-Expressed Fatty-Acid Binding Protein (FABP) Genes and schizophrenia and Bipolar Disorder. *Am. J. Med. Genet.* 2009; 153B : 484-493.

Kalscheuer, V.M., Iqbal, Z., Hu, H., Haas, S.A., Shaw, M., Lebrun, N., Seemanova, E., Voesenek, K., Hobson, L., Ropers, H.H., et al. (2013). RAB40AL loss-of-function mutation does not cause X-linked intellectual disability. *J. Med. Genet.* Published online March 25, 2013. http://jmg.bmj.com/content/49/5/332/reply#jmedgenet_el_1730.

Kaminsky EB, Kaul V, Paschall J et al. An evidence-based approach to establish the functional and clinical significance of copy number variants in intellectual disability and developmental disabilities. *Genet. Med.* 2011; 13 : 777-784.

Kent WJ, Baertsch R, Hinrichs A, Miller W, Haussler D. Evolution's cauldron: duplication, deletion, and rearrangement in the mouse and human genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2003 Sep 30; 100(20) : 11484-9.

Kleinjan JD, van Heyningen V. Position effect in human genetic disease. *Hum. Mol. Genet.* 1998; 7(10) : 1611-1618.

Kong A, Frigge ML, Masson G, Besenbacher S, Sulem P et al. Rate of de novo mutations, father's age and disease risk. *Nature.* 2012; 488(7412) : 471-475.

Koolen DA, Kramer JM, Neveling K, Nillesen WM, Moore-Barton HL, Elmslie FV, Toutain A, Amiel J, Malan V, Tsai AC, Cheung SW, Gilissen C, Verwiel ET, Martens S, Feuth T, Bongers EM, de Vries P, Scheffer H, Vissers LE, de Brouwer AP, Brunner HG, Veltman JA, Schenck A, Yntema HG, de Vries BB. Mutations in the chromatin modifier gene KANSL1 cause the 17q21.31 microdeletion syndrome. *Nat. Genet.* 2012; 44(6) : 639-641.

Koyano-Nakagawa N, Kintner C. The expression and function of MTG/ETO family proteins during neurogenesis. *Dev. Biol.* 2005; 278 : 22-34.

Kurts A, Zimmer A, Schnütgen F, Brüning G, Spener F, Müller T. The expression pattern of a novel gene encoding brain-fatty acid binding protein correlates with neuronal and glial cell development. *Development*. 1994; 120 : 2637-2649.

Leo A, Walker AM, Lebo MS, Hendrickson B, Scholl T, Akmaev VR. A GC-wave correction algorithm that improves the analytical performance of aCGH. *J. Mol. Diagn.* 2012 Nov; 14(6) : 550-9.

Leonard H, Wen X. The epidemiology of mental retardation : challenges and opportunities in the new millennium. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Review*. 2002; 8 : 117-1134.

Liu RZ, Mita R, Beaulieu M, Gao Z and GODBOUT R. Fatty acid binding proteins in brain development and disease. *Int. J. Dev. Biol.* 2010; 54 : 1229-1239.

Livak JK, Schmittgen DT. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methods. *Methods*. 2001; 25 : 402-408.

Lubs HA, Stevenson RE, Schwartz CE. Fragile X and X-linked intellectual disability : four decades of discovery. *Am. J. Hum. Genet.* 2012; 90(4) : 579-590.

Lugtenberg D, Yntema HG, Banning MJ, Oudakker AR, Firth HV, Willatt L, Raynaud M, Kleefstra T, Fryns JP, Ropers HH, Chelly J, Moraine C, Gecz J, van Reeuwijk J, Nabuurs SB, de Vries BB, Hamel BC, de Brouwer AP, van Bokhoven H. ZNF674 : a new kruppel-associated box-containing zinc-finger gene involved in nonsyndromic X-linked mental retardation. 2006; 78(2) : 265-278.

Lupski JR. New mutations and intellectual functions. *Nat. Genet.* 2010; 42(12) : 1036-1038.

MacArthur DG, Balasubramanian S, Frankish A, huang Ni, Morris J, Walter K et al. A systematic survey of Loss-of-Function Variants in Human Protein Coding Genes. *Science*. 2012; 335(6070) : 823-828.

Malhotra D, Sebat J. CNVs : harbingers of a rare variant evolution in psychiatric genetics. *Cell*. 2012; 148(6) : 1223-1241.

Marioni JC, Thorne NP, Valsesia A, Fitzgerald T, Redon R, Fiegler H, Andrews TD, Stranger BE, Lynch AG, Dermitzakis ET, Carter NP, Tavaré S, Hurles ME. Breaking the waves: improved detection of copy number variation from microarray-based comparative genomic hybridization. *Genome Biol*. 2007; 8(10) : R228.

Mateja A, Cierpicki T, Paduch M, Derewenda SZ, Otlewski J. The Dimerization Mechanism of LIS1 and its Implication for Proteins Containing the LIS1 Motif. *J. Mol. Biol*. 2006; 357 : 621-631.

Maydan G, Noyman I, Har-Zahav A, Neria BZ, Pasmanik-Chor M, Yeheskel A, Albin-Kaplanski A, Maya I, Magal N, Birk E, Simon JA, Halevy A, Rechavi G, Shohat M, Straussberg R, Basel-Vanagaite L. Multiple congenital anomalies-hypotonia-seizures syndrome is caused by a mutation *PIGN*. *J. Med. Genet*. 2011; 48 : 383-389.

Mefford HC, Batshaw ML, Hoffman EP. Genomics, intellectual disability and autism. *N. Eng. J. Med*. 2012; 366 : 733-743.

Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ, Faucett WA, Feuk L, Friedman JM, Hamosh A, Jackson et al. Consensus statement : chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am. J. Hum. Genet*. 2010; 86 :749-764.

Mitchell KJ. What is complex about complex disorders?. *Mitchell. Genome. Biology*. 2012; 13 : 237.

Moullé VSF, Cansell C, Luquet S, Cruciani-Guglielmacci CC. The multiple roles of fatty acid handling proteins in brain. *Frontiers in Physiology*. 2012; 3(385) : 1-6.

Najmabadi H, Hu H, Garshasbi M, Zemojtel T, Abedini SS, Chen W, Hosseini M, Behjati F, Haas S, Jamali P et al. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature*. 2011; 478(7367) : 57-63.

Need AC, Shashi V, Hitomi Y, Schoch K, Shianna KV, McDonald MT, Meisler MH, Goldstein DB. Clinical Application of Exome Sequencing in Undiagnosed Genetic Conditions. *J. Med. Genet.* 2012; 49(6) : 353-361.

Oberlé I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, Boue J, Bertheas MF and Mandel JL. Instability of a 550-base pair segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science*. 1991; 252 : 1097-1102.

O’Roak, B.J., Vives, L., Fu, W., Egertson, J.D., Stanaway, I.B., Phelps, I.G., Carvill, G., Kumar, A., Lee, C., Ankenman, K., et al. (2012). Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders. *Science*; 338 : 1619–1622.

Pei B, Sisu C, Frankish A, Howald C, Habegger L, Mu XJ, Harte R, Balasubramanian S, Tanzer A, Diekhans M et al. The GENCODE pseudogene resource. *Genome Biol.* 2012 Sep 26; 13(9) : R51.

Pfaffl WM. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids. Res.* 2001; 29(9) e45.

Pfundt R, Veltman JA. Structural genomic variation in intellectual disability. *Methods. Mol. Biol.* 2012; 838 : 77-95.

Ramocki MB, Tavyev YJ, Peters SU. The *MECP2* Duplication Syndrome. *Am. J. Med. Genet. A.* 2010; 152(A) : 1079-1088.

Raymond FL. Monogenic causes of Mental Retardation. Monogr. Hum. Genet. Basel, Karger. 2010; 18 : 89-100.

Regan R, Willat L. Mental retardation : Definition, Classification and Etiology. Kinght SJL (ed) : Genetics of mental retardation. Monogr. Hum. Genet. 2010; 18 : 16-30.

Robinson PN. Whole-exome sequencing for finding de novo mutations in sporadic mental retardation. Genome. Biol. 2010; 11(12) : 144.

Sanders, S.J., Murtha, M.T., Gupta, A.R., Murdoch, J.D., Raubeson, M.J., Willsey, A.J., Ercan-Sencicek, A.G., DiLullo, N.M., Parikshak, N.N., Stein, J.L., et al. (2012). De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. Nature; 485 : 237–241.

Schluth-Boland C, Ottaviani A, Gilson E, Magdinier F. Chromosomal Position Effects and Gene Variegation: Impact in Pathologies. Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics- Chapter 6 : Chromosomal Position Effects and Gene Variegation : Impact in Pathologies. 2011; 77-105.

Schwartz S, Kent WJ, Smit A, Zhang Z, Baertsch R, Hardison RC, Haussler D, Miller W. Human-mouse alignments with BLASTZ. Genome Res. 2003 Jan; 13(1) : 103-7.

Sellner P. Developmental Regulation of Fatty Acid Binding Protein in Neural Tissue. Developmental Dynamics. 1994; 200 : 333-339.

Shogren KA, Turnbull HR. Public policy and outcomes for persons with intellectual disability : extending and expanding the public policy framework of AAIDD's 11th Edition of Intellectual Disability : Definition, Classification and Systems of Support. Intellect. Dev. Disabil. 2010; 48(5) : 375-386.

Sirmaci A, Spiliopoulos M, Brancati F, Powell E, Duman D, Abrams A, Bademci G, Agolini E, Guo S, Konuk B et al. Mutations in *ANKRD11* cause KBG syndrome, characterized by Intellectual Disability, Skeletal Malformations, and Macrodonia. Am. J. Hum. Genet. 2011; 89 : 289-294.

Talkowski ME, Mullegama SV, Rosenfeld JA et al. Assessment of 2q23.1 microdeletion syndrome implicates MBD5 as a single causal locus of intellectual disability, epilepsy, and autism spectrum disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 2011; 89 : 551-563.

Tarpey PS, Smith R, Pleasance E, Whibley A, Edkins S, Hardy C, O'Meara S, Latimer C, Dicks E, Menzies A, Stephens P, Blow M and 67 others. A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. *Nat. Genet.* 2009; 41 : 535-543.

Teunissen CE, Veerhuis R, De Vente J, Verhey FRJ, Vreeling F, van Boxtel MPJ, Glatz JFC, Pelsers MAL. Brain-specific fatty acid-binding protein is elevated in serum of patients with dementia-related diseases. *European Journal of Neurology.* 2011; 18 : 865-871.

Thierry G, Bénateau C, Pichon O, Flori E, Isidor B, Popelard F, Delrue MA, Duboscq-Bidot L, Thuresson AC, van Bon BW, Cailley D, Rooryck C, Paubel A, Metay C, Dusser A, Pasquier L, Béri M, Bonnet C, Jaillard S, Dubourg C, Tou B, Quéré MP, Soussi-Zander C, Toutain A, Lacombe D, Arveiler B, de Vries BB, Jonveaux P, David A, Le Caignec C. Molecular characterization of 1q44 microdeletion in 11 patients reveals three candidate genes for intellectual disability and seizures. *Am J Med Genet A.* 2012 Jul; 158A(7) : 1633-40.

Vermeesch JR, Balikova I, Schrandt-Stumpel C, Fryns JP, Devriendt K. The causality of de novo copy number variants is overestimated. *Eur. J. Hum. Genet.* 2011; 19 : 1112-1113.

Vissers LE, de Ligt J, Gilissen C, Janssen I, Steehouwer M, de Vries P, van Lier B, Arts P, Wieskamp N, del Rosario M, van Bon BW, Hoischen A, de Vries BB, Brunner HG, Veltman JA. A de novo paradigm for mental retardation. *Nat. Genet.* 2010; 42(12) : 1109-1112.

Vissers LE, van Ravenswaaij CM, Admiraal R, Hurst JA, de Vries BB, Janssen IM, van der Vliet WA, Huys EH, de Jong PJ, Hamel BC, Schoenmakers EF, Brunner HG, Veltman JA, van Kessel AG. Mutations in the new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nat. Genet.* 2004; 36(9) : 955-957.

Walsh T, McClellan JM, McCarthy SE, Addington AM, Pierce SB, Cooper GM, Nord AS, Kusenda M, Malhotra D, et al. Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. *Science*. 2008; 320(5875) : 539-543.

Watanabe A, Toyota T, Owada Y, Hayashi T, Iwayama Y, Matsumata M, Ishitsuka Y, Nakaya A, Maekawa M, Ohnishi T et al. *Fabp7* maps to a Quantitative Trait Locus for a Schizophrenia Endophenotype. *PloS. Biol.* 2007; 5(11) : e297.

Willemsen MH, Vissers EL, Willemsen AP, M van Bon BW, Kroes T, de Ligt J, de Vries BB, Schoots J, Lugtenberg D, Hamel CJ, van Bokhoven H, Brunner HG, Veltman JA, Kleefstra T. Mutations in *DYNC1H1* cause severe intellectual disability with neuronal migration defects. *J. Med. Genet.* 2012; 49 : 179-183.

Yuan JS, Wang D, Stewart CN Jr. Statistical methods for efficiency adjusted real-time PCR quantification. *Biotechnol J.* 2008; 3(1) : 112-123.

Zhang L, Tümer Z, Mollgard K, Barbi G, Rossier E, Bendtsen E, Moller RS, Ullmann R, He J, Papadopolous N, Tommerup N, Larsen LA. Characterization of a t(5 ;8)(q31;q21) translocation in a patient with mental retardation and congenital heart disease : implication for involvement of *RUNX1T1* in human brain and heart development. *Eur. J. Hum. Genet.* 2009; 17 :1010-1018.

Zheng D, Frankish A, Baertsch R, Kapranov P, Reymond A, Choo SW, Lu Y, Denoeud F, Antonarakis SE, Snyder M et al. Pseudogenes in the ENCODE regions : consensus annotation, analysis of transcription, and evolution. *Genome Res.* 2007 Jun; 17(6) : 839-51.

ANNEXE 1

Numéro	Consanguinité	DI (Déficience intellectuelle)
Patient 1	Oui	Sévère, retard de langage, retard des acquisitions motrices
Patient 2	x	Sévère, retard psychomoteur, retard de langage
Patient 3	x	Sévère
Patient 4	x	Sévère
Patient 5	x	Sévère
Patient 6	x	Sévère
Patient 7	x	Sévère
Patient 8	x	Sévère, retard des acquisitions sévère
Patient 9	x	Sévère, retard sévère de langage
Patient 10	x	Sévère, retard global des acquisitions
Patient 11	x	Retard psychomoteur marqué, épilepsie et stéréotypie
Patient 12	x	Sévère, encéphalopathie convulsivante sévère
Patient 13	x	Retard global des acquisitions
Patient 14	x	Retard modéré, retard de langage, retard des acquisitions motrices
Patient 15	x	Retard de langage, retard des acquisitions
Patient 16	x	Retard de langage, encéphalopathie épileptique, ataxie
Patient 17	x	Retard de langage très marqué, retard des acquisitions motrices
Patient 18	x	Retard de développement, retard psychomoteur, retard de langage
Patient 19	x	Retard des acquisitions motrices et du langage
Patient 20	x	Syndrome de West, pas de marche
Patient 21	x	encéphalopathie familiale,
Patient 22	Oui	Retard sévère de langage, discret retard d'acquisition motrice, déficience cognitive sévère
Patient 23	Oui	Retard psychomoteur sévère, exposition valproate pendant la période fœtale, expression clinique habituellement sévère pour un syndrome valproate.
Patient 24	x	Retard global des acquisitions avec malformation génito-urinaire, retard de langage
Patient 25	x	Retard psychomoteur sévère
Patient 26	x	Retard de langage, retard des acquisitions, épilepsie sévère rolandique
Patient 27	x	Retard global des acquisitions, retard mental, aucun langage
Patient 28	x	Retard global des acquisitions
Patient 29	x	Retard de langage
Patient 30	x	Retard psychomoteur, retard de langage, microcéphalie à -4 ds
Patient 31	x	Retard modéré, retard global des acquisitions
Patient 32	x	Retard modéré, Dysmorphie
Patient 33	x	Retard des acquisitions motrices
Patient 34	x	Retard mental sévère, retard des acquisitions et retard de langage

Patient 35	x	Retard mental sévère, retard de langage, retard des acquisitions avec épisode de fou-rires
Patient 36	x	Retard global des acquisitions avec hypotrophie sévère
Patient 37	x	Sévère, retard de langage, retard des acquisitions,
Patient 38	x	Sévère, retard des acquisitions sévère
Patient 39	x	Retard d'acquisition motrice
Patient 40	x	Sévère, retard des acquisitions sévère
Patient 41	x	Retard de langage, retard des acquisitions, encéphalopathie convulsivante sévère
Patient 42	x	Retard de langage, discret retard des acquisitions
Patient 43	x	Déficience cognitive avec malformation palatine, retard de langage
Patient 44	x	Retard de langage, retard des acquisitions motrices et épilepsie avec anomalie de gyration
Patient 45	x	Retard de langage, retard des acquisitions motrices
Patient 46	x	Retard de langage avec anomalie cérébelleuse

ANNEXE 2

<i>GABRD</i>	1p36 deletion syndrome	1		11 424	chr1:1950768-1962192
<i>CAMTA1</i>	del1p36	1		984 382	chr1:6845384-7829766
<i>CDC42</i>	small GTPase of the Rho-subfamily, which regulates signalin	1		40 316	chr1:22379120-22419436
<i>PIGV</i>	hyperphosphatasia mental retardation syndrome (HMRS, also	1	AR	10 440	chr1:27114454-27124894
<i>HDAC1</i>		1		41 518	chr1:32757708-32799226
<i>GRIK3</i>	Glutamate receptor complex	1		238 716	chr1:37261128-37499844
<i>YBX1</i>	Young	1		19 951	chr1:43148066-43168017
<i>ST3GAL3</i>	ARMR	1	AR	223 613	chr1:44173218-44396831
<i>POMGnT1</i>	MEB disease (Muscle-Eye-Brain)	1		31 624	chr1:46654353-46685977
<i>NTNG1</i>		1		341 844	chr1:107682629-108024473
<i>FAM40A</i>	set of conserved and new regulators of cytoskeletal organisati	1		20 022	chr1:110577241-110597263
<i>AP4B1</i>	ARMR, paraplegia, shy character, short stature	1	AR	10 064	chr1:114437677-114447741
<i>GJA5</i>	1q21.1 deletion	1		17 152	chr1:147228332-147245484
<i>KCNJ10</i>	Glutamate receptor complex	1		32 794	chr1:160007257-160040051
<i>ATP1A2</i>	Glutamate receptor complex	1		27 854	chr1:160085520-160113374
<i>TMCO1</i>	distinctive craniofacial dysmorphism, skeletal anomalies, and	1	AR	44 607	chr1:165693528-165738135
<i>ASPM</i>	Microcephaly vera	1		62 567	chr1:197053257-197115824
<i>SYT14</i>	Adult-Onset, Autosomal-Recessive Spinocerebellar Ataxia w	1	AR	226 095	chr1:210111538-210337633
<i>DISC1</i>	DISC1 duplication in two brothers with autism and mild ment	1		414 458	chr1:231762561-232177019
<i>HNRPU</i>	del1q44	1		14 225	chr1:245013602-245027827
<i>KIF3C</i>		2		55 988	chr2:26149455-26205443
<i>NRXN1</i>	del2p16	2		1 114 031	chr2:50145643-51259674
<i>VRK2</i>	2p15-16.1 microdeletion syndrome	2		113 278	chr2:58273777-58387055
<i>ARID5A</i>	2q11.2 deletion	2		15 907	chr2:97202464-97218371
<i>LMAN2L</i>	2q11.2 deletion	2		34 146	chr2:97371667-97405813
<i>FHL2</i>	2q11.2q13 deletion	2		77 947	chr2:105977283-106055230
<i>NCK2</i>	2q11.2q13 deletion	2		149 210	chr2:106361520-106510730
ZFHX1B/ZEB2	Mowat-Wilson syndrome : severe mental retardation and mul	2		136 016	chr2:145141942-145277958
<i>MBD5</i>	del2q23	2		492 464	chr2:148778580-149271044
<i>EPC2</i>	del2q23	2		142 576	chr2:149402560-149545136
<i>P3/FBP11/PRPF</i>	set of conserved and new regulators of cytoskeletal organisati	2		65 868	chr2:153508107-153573975
<i>KCNJ3</i>	Glutamate receptor complex	2		157 921	chr2:155555093-155713014
<i>SCN2A</i>		2		152 908	chr2:166095912-166248820
<i>SCN1A</i>	autism	2		159 972	chr2:166845670-167005642
<i>C2orf37/DCAF17</i>	Anas M. Alazami et al, 2008; Mutations in C2orf37, encoding	2		50 801	chr2:172290761-172341562

<i>WIPF1</i>		2			123 325	chr2:175424302-175547627
<i>CREB1</i>		2			75 666	chr2:208394616-208470282
<i>P2 (Clin Genet 2003)</i>		2			310 075	chr2:210288771-210598846
<i>SLC19A3</i>		2			32 818	chr2:228549927-228582745
<i>HDAC4</i>	del2q37, brachydactyly mental retardation syndrome, with br	2			352 779	chr2:239969864-240322643
<i>CNTN4</i>	Autism	3			957 398	chr3:2142247-3099645
<i>CRBN</i>	NS-ARMR	3	AR		30 084	chr3:3191317-3221401
<i>GRM7</i>	Glutamate receptor complex	3		Y	880 416	chr3:6902802-7783218
<i>LIMD1</i>	set of conserved and new regulators of cytoskeletal organisati	3		Y	86 432	chr3:45636323-45722755
<i>DOCK3</i>	RM et hyperactivité	3			708 957	chr3:50712672-51421629
<i>GRM2</i>	Glutamate receptor complex	3		Y	11 544	chr3:51741081-51752625
<i>FOXP1</i>	Intellectual Disability, autism and language impairment	3			628 404	chr3:71004736-71633140
<i>MBD4</i>		3			9 059	chr3:129149793-129158852
<i>SLC9A9</i>		3			583 309	chr3:142984064-143567373
<i>DLG1</i>	3q29 deletion	3			256 016	chr3:196769431-197025447
<i>WHSC1</i>	Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS) is a malformation syndro	4			110 811	chr4:1873123-1983934
<i>WHSC2</i>	Wolf-Hirschhorn deletion	4			26 521	chr4:1984441-2010962
<i>PRKG2</i>	del4q21	4		Y	116 378	chr4:82009837-82126215
<i>RASGEF1B</i>	del4q21	4		Y	44 842	chr4:82348219-82393061
<i>PRSS12</i>	NS-ARMR	4	AR		72 729	chr4:119201193-119273922
<i>GRIA2</i>	Glutamate receptor complex	4		Y	145 490	chr4:158141736-158287226
<i>ANKH</i>	Autosomal Recessive Mental Retardation, Deafness, Ankylos	5	AR		166 978	chr5:14704909-14871887
<i>KIF2A</i>	mental retardation and ocular defects	5		Y	80 221	chr5:61601989-61682210
<i>MEF2C</i>	Rett sd ?	5			185 864	chr5:88014058-88199922
<i>CDKL3</i>	Regulates neuronal morphogenesis	5		Y	68 650	chr5:133634115-133702765
<i>GRM6</i>	Glutamate receptor complex	5		Y	16 794	chr5:178405330-178422124
<i>SYNGAP1</i>	mental retardation autosomal dominant type 5 (MRD5)	6			33 619	chr6:33387847-33421466
<i>GRM4</i>	Glutamate receptor complex	6		Y	111 815	chr6:33989628-34101443
<i>KCNK17</i>	Glutamate receptor complex	6		Y	15 460	chr6:39266777-39282237
<i>SIM1</i>	6q16 deletion	6			74 801	chr6:100836750-100911551
<i>GRIK2</i>	ARMR	6	AR		671 097	chr6:101846861-102517958
<i>SOBP</i>	Autosomal-recessive mental retardation with anterior maxilla	6	AR		171 196	chr6:107811317-107982513
<i>HDAC2</i>		6			35 029	chr6:114257327-114292356
<i>TCBA1/NKAIN2</i>	del6q22	6			1 021 717	chr6:124125069-125146786
<i>MED53</i>	MED23 Mutation Links Intellectual Disability to Dysregulati	6			54 257	chr6:131895106-131949363

<i>EYA4</i>	del6q23	6		Y	290 763	chr6:133562495-133853258
<i>GRM1</i>	Glutamate receptor complex	6		Y	409 949	chr6:146348782-146758731
<i>ARID1B</i>	Corpus Callosum Abnormalities, Mental Retardation, Speech	6			432 849	chr6:157099064-157531913
<i>RAC1</i>	GTPase which belongs to the RAS superfamily of small GTP	7		Y	29 472	chr7:6414126-6443598
<i>GLI3</i>		7			276 070	chr7:42000548-42276618
<i>AUTS2</i>	Autism / MR, WBS-prox deletion	7			1 193 570	chr7:69063905-70257475
<i>ELN</i>	Williams syndrome deletion	7			41 809	chr7:73442427-73484236
<i>GTF2I/GTF2RD1</i>	Williams sd	7			102 992	chr7:74072030-74175022
<i>HIP1</i>	WBS-distal deletion	7			205 664	chr7:75162619-75368283
<i>RHBDD2</i>	WBS-distal deletion	7			9 927	chr7:75508317-75518244
<i>MAGI2</i>		7			1 436 517	chr7:77646375-79082892
<i>GRM3</i>	Glutamate receptor complex	7		Y	220 962	chr7:86273230-86494192
<i>DLX6</i>		7			5 063	chr7:96635290-96640353
<i>DLX5</i>		7			4 441	chr7:96649704-96654145
<i>AP4M1</i>	ARMR, paraplegia, shy character, short stature	7	AR		5 673	chr7:99699130-99704803
<i>RELN</i>	Lissencephaly with cerebellar hypoplasia	7			517 732	chr7:103112231-103629963
<i>FOXP2</i>	speech-language disorder 1 (SPCH1)	7			607 462	chr7:113726365-114333827
<i>GRM8</i>	Glutamate receptor complex	7		Y	813 776	chr7:126078652-126892428
<i>FAM40B</i>	set of conserved and new regulators of cytoskeletal organisati	7		Y	53 965	chr7:129074274-129128239
<i>BRAF</i>	CFC syndrome	7			190 751	chr7:140433813-140624564
<i>CNTNAP2</i>	Gilles de la Tourette syndrome, schizophrenia, epilepsy, autis	7			2 304 635	chr7:145813453-148118088
<i>MCPH1</i>	Microcephaly vera	8			237 027	chr8:6264113-6501140
<i>CLDN23</i>	8p23.1 deletion	8			1 951	chr8:8559666-8561617
<i>SOX7</i>	8p23.1 deletion	8			6 744	chr8:10581278-10588022
<i>TUSC3</i>		8	AR		224 265	chr8:15397730-15621995
<i>TRAPPC9/NIBP</i>		8	AR		726 092	chr8:140742586-141468678
<i>ARC</i>	set of conserved and new regulators of cytoskeletal organisati	8		Y	3 423	chr8:143692410-143695833
<i>DOCK8</i>	Mental retardation and developmental disabilities	9			250 394	chr9:214865-465259
<i>VLDLR</i>	Lissencephaly with cerebellar hypoplasia	9			32 692	chr9:2621793-2654485
<i>TLE1</i>		9		Y	104 998	chr9:84198598-84303596
<i>Fukutin/FKTN</i>	Fukuyama congenital muscular dystrophy (FCMD) with type	9			82 988	chr9:108320411-108403399
<i>CDK5RAP2</i>	Microcephaly vera	9			191 290	chr9:123151147-123342437
<i>STXBP1</i>	Mental retardation and nonsyndromic epilepsy	9			80 509	chr9:130374486-130454995
<i>PP2A/PPP2R4</i>	?	9		Y	37 997	chr9:131873228-131911225
<i>LAMC3</i>	occipital malformation, autism	9			83 942	chr9:133884504-133968446

<i>POMT1</i>	Walker-Warburg sd	9		20 904	chr9:134378289-134399193
<i>MAN1B1</i>	ARMR	9	AR	22 222	chr9:139981417-140003639
<i>EHMT1</i>	del9q34	9		217 134	chr9:140513444-140730578
<i>NRG3</i>	10q23 deletion	10		1 111 865	chr10:83635070-84746935
<i>GRID1</i>	10q23 deletion	10		766 938	chr10:87359312-88126250
<i>ZRANB1</i>	set of conserved and new regulators of cytoskeletal organisati	10		45 313	chr10:126630692-126676005
<i>HRAS</i>	Costello syndrome	11		3 308	chr11:532242-535550
<i>DEAF1</i>	Homo sapiens deformed epidermal autoregulatory factor 1 (E	11		51 515	chr11:644225-695740
<i>GC1</i>	SLC25A22	11		7 759	chr11:790476-798235
<i>BDNF</i>		11		192 817	chr11:27528399-27721216
<i>EXT2</i>	Potocki-Shaffer syndrome	11		149 881	chr11:44117099-44266980
<i>TMEM216</i>	Joubert syndrome, an autosomal recessive condition character	11	AR	6 503	chr11:61159832-61166335
<i>SHANK2</i>	Autism and mental retardation, FGFs deletion	11		621 847	chr11:70313961-70935808
<i>GRM5</i>	Glutamate receptor complex	11		559 072	chr11:88237744-88796816
<i>GRIA4</i>	del11q22	11		372 019	chr11:105480800-105852819
<i>PVRL1</i>	cleft lip and palate/ectodermal dysplasia 1 syndrome (CLPEE	11		90 627	chr11:119508808-119599435
<i>GRIK4</i>	Glutamate receptor complex	11		325 941	chr11:120531028-120856969
<i>KIRREL3</i>		11		577 370	chr11:126293396-126870766
<i>KCNJ5</i>	Glutamate receptor complex	11		26 638	chr11:128761313-128787951
<i>GRIN2B</i>	Variable neurodevelopmental phenotypes	12		418 612	chr12:13714410-14133022
<i>KRAS</i>	CFC syndrome	12		45 674	chr12:25358180-25403854
<i>MLL2</i>	Kabuki sd	12		36 349	chr12:49412758-49449107
<i>TUBA1A</i>	lissencephaly	12		4 278	chr12:49578583-49582861
<i>FMNL3</i>	set of conserved and new regulators of cytoskeletal organisati	12		69 473	chr12:50031724-50101197
<i>HMGA2</i>	12q14 microdeletion syndrome	12		141 831	chr12:66218240-66360071
<i>GRIP1</i>	12q14 microdeletion syndrome	12		331 714	chr12:66741211-67072925
<i>ALX1</i>	microcephaly, language delay, and severe psychomotor retarc	12		21 525	chr12:85674036-85695561
<i>PTPN11</i>	Noonan sd	12		91 181	chr12:112856536-112947717
<i>NCOR2</i>		12		243 048	chr12:124808962-125052010
<i>CRYL1</i>	13q12 deletion	13		122 206	chr13:20977806-21100012
<i>CENPJ</i>	Microcephaly vera	13		40 673	chr13:25456412-25497085
<i>ATP8A2</i>	Severe neurological phenotype	13		649 211	chr13:25946209-26595420
<i>FOXG1</i>	Rett sd ?	14		2 584	chr14:29236287-29238871
<i>PRKD1</i>	Régule FOXG1 ?	14		351 212	chr14:30045687-30396899
<i>AP4S1</i>	ARMR, paraplegia, shy character, short stature	14	AR	67 955	chr14:31494683-31562638

ANNEXE 3

<i>ULIP1/RALGAPA</i>	A novel microdeletion of 14q13.1q13.3 was identified in a pa	14			270 874	chr14:36007558-36278432
<i>POMT2</i>	Walker-Warburg sd	14			45 926	chr14:77741299-77787225
<i>ZC3H14</i>	ARMR	14	AR		50 600	chr14:89029253-89079853
<i>YY1</i>	Homo sapiens YY1 transcription factor (YY1), mRNA	14		Y	39 702	chr14:100705102-100744804
<i>DYNC1H1</i>	Homo sapiens dynein, cytoplasmic 1, heavy chain 1 (DYNC1	14		Y	86 270	chr14:102430865-102517135
<i>NIPAI1</i>	15q11.2 deletion	15			43 564	chr15:23043279-23086843
<i>MKRN3</i>	15q11-q12 imprinted region	15			2 710	chr15:23810454-23813164
<i>MAGEL2</i>	15q11-q12 imprinted region	15			2 477	chr15:23888698-23891175
<i>NDN</i>	15q11-q12 imprinted region	15			1 888	chr15:23930562-23932450
<i>C15orf2</i>	15q11-q12 imprinted region	15			8 051	chr15:24920541-24928592
<i>SNRNP</i>	15q11-q12 imprinted region	15			154 935	chr15:25068794-25223729
<i>UBE3A</i>	Angelman sd	15			101 732	chr15:25582396-25684128
<i>ATP10A</i>	15q11-q12 imprinted region	15			184 489	chr15:25923860-26108349
<i>GABRB3</i>	15q11-q12 imprinted region	15			85 630	chr15:26788695-26874325
<i>GABRA5</i>	15q11-q12 imprinted region	15			81 945	chr15:27112058-27194003
<i>GABRG3</i>	15q11-q12 imprinted region	15			509 962	chr15:27216517-27726479
<i>OCA2</i>	15q11-q12 imprinted region	15			334 433	chr15:28000025-28334458
<i>APBA2</i>		15			196 676	chr15:29213840-29410516
<i>CHRNA7</i>	del15q13	15			139 693	chr15:32322691-32462384
<i>AP4E1</i>	ARMR, paraplegia, shy character, short stature	15	AR		97 151	chr15:51200946-51298097
<i>MAP2K1</i>	CFC syndrome	15			104 671	chr15:66679211-66783882
<i>BBS4</i>	15q24 BP0-BP1 deletion	15			52 291	chr15:72978526-73030817
<i>NEO1</i>	15q24 BP0-BP1 deletion	15			252 722	chr15:73344825-73597547
<i>NPTN</i>	15q24 BP0-BP1 deletion	15			73 409	chr15:73852344-73925753
<i>PML</i>	15q24 BP0-BP1	15			53 141	chr15:74287014-74340155
<i>CLK3</i>	15q24 critical BP1-2 deletion	15			21 829	chr15:74900713-74922542
<i>CSK</i>	15q24 critical BP1-2 deletion	15			21 114	chr15:75074425-75095539
<i>SIN3A</i>	15q24 small deletion	15			86 402	chr15:75661722-75748124
<i>FBXO22</i>	15q24 BP2-BP3 deletion	15			31 408	chr15:76196200-76227608
<i>HOMER2</i>	15q25.2 deletion	15			103 747	chr15:83517729-83621476
<i>BNC1</i>	15q25.2 deletion	15			28 813	chr15:83924655-83953468
<i>TSC2</i>	Tuberous sclerosis	16			40 723	chr16:2097990-2138713
<i>3P/CREB/CREBE</i>	Rubinstein-Taybi sd	16			155 065	chr16:3775056-3930121
<i>GRIN2A</i>	Variable neurodevelopmental phenotypes	16			429 346	chr16:9847265-10276611
<i>MYH11</i>	16p13.11 deletion	16			153 895	chr16:15796992-15950887

<i>EEF2K</i>	16p12.1 deletion	16		82 474	chr16:22217592-22300066
<i>CDR2</i>	16p12.1 deletion	16		28 681	chr16:22357257-22385938
<i>SH2B1</i>	16p11.2 distal deletion	16		10 456	chr16:28875078-28885534
<i>TBX6</i>	16p11.2 deletion	16		6 090	chr16:30097115-30103205
<i>GPR56</i>	Bilateral Frontoparietal Polymicrogyria : mental retardation, l	16		45 034	chr16:57653910-57698944
<i>CDH15</i>		16		23 737	chr16:89238163-89261900
<i>ZNF778</i>	candidate genes for autism and variable cognitive impairment	16	Y	11 252	chr16:89284111-89295363
<i>ANKRD11</i>	candidate genes for autism and variable cognitive impairment	16	Y	222 934	chr16:89334035-89556969
<i>YWHAE</i>	17p13.3 deletion	17		55 722	chr17:1247834-1303556
<i>MiR-132</i>		17		100	chr17:1953202-1953302
<i>LIS1/PAFAH1B1</i>	Miller Dieker sd	17		91 986	chr17:2496923-2588909
<i>ICH2/ARHGAP4</i>	SHANK3 interaction	17	Y	202 131	chr17:12692829-12894960
<i>NCOR1</i>		17		183 588	chr17:15935259-16118847
<i>RAI1</i>	Smith-Magenis	17		129 978	chr17:17584787-17714765
<i>NF1</i>	MR in 50 % of NF1 cases	17		282 750	chr17:29421945-29704695
<i>MAPT</i>	del17q21	17		133 951	chr17:43971748-44105699
<i>TMEM49=VMP1</i>	17q23 deletion	17		133 089	chr17:57784863-57917952
<i>TUBD1</i>	17q23 deletion	17		33 465	chr17:57936841-57970306
<i>TBX2</i>	17q23.1q23.2 deletion	17		9 570	chr17:59477257-59486827
<i>TBX4</i>	17q23.1q23.2 deletion	17		27 857	chr17:59533807-59561664
<i>SETBP1</i>	Schinzel-Giedion sd	18		387 612	chr18:42260863-42648475
<i>MBD1</i>		18		14 890	chr18:47793256-47808146
<i>MBD2</i>		18		70 585	chr18:51680575-51751160
<i>TCF4</i>	Pitt-Hopkins Syndrome	18		366 298	chr18:52889562-53255860
<i>CDH7</i>	CHARGE sd	18		130 017	chr18:63418157-63548174
<i>MBD3</i>		19		15 976	chr19:1576678-1592654
<i>MAP2K2</i>	CFC syndrome	19		33 806	chr19:4090320-4124126
<i>NFIX</i>	Sotos-like or Marshall-smith sd	19		103 026	chr19:13106584-13209610
<i>CACNA1A</i>		19		300 020	chr19:13317256-13617276
<i>CC2D1A</i>	NS-ARMR	19	AR	24 737	chr19:14016956-14041693
<i>LPHN1</i>	Microdélétion en 19p13.12 : atteintes mentales, psychomotric	19		58 448	chr19:14258549-14316997
<i>PKNI</i>	Microdélétion en 19p13.12 : atteintes mentales, psychomotric	19		38 513	chr19:14544166-14582679
<i>PTGER1</i>	Microdélétion en 19p13.12 : atteintes mentales, psychomotric	19		2 896	chr19:14583278-14586174
<i>TECR</i>	AR NSMR	19	AR	36 413	chr19:14640379-14676792
<i>FXYP1</i>		19		4 223	chr19:35629732-35633955

<i>WDR62</i>	Exome	19			50 229	chr19:36545783-36596012
<i>ZNF526</i>	ARMR	19	AR		7 861	chr19:42724492-42732353
<i>CIC</i>	Homo sapiens capicua homolog (Drosophila) (CIC), mRNA	19		Y	11 132	chr19:42788817-42799949
<i>DMPK</i>	Steinert's myotonic dystrophy	19			12 839	chr19:46272976-46285815
<i>PNKP</i>		19			6 358	chr19:50364462-50370820
<i>DNMT3B</i>	ICF sd	20			46 971	chr20:31350191-31397162
<i>APP</i>	Down sd	21			290 585	chr21:27252861-27543446
<i>ITSN1</i>	candidate gene in mental retardation	21		Y	246 825	chr21:35014784-35261609
<i>S100B</i>	Down sd	21			6 504	chr21:48018531-48025035
<i>TBX1</i>	del22q11	22			26 886	chr22:19744226-19771112
<i>MAPK1</i>	22q11.2 distal deletion	22			108 023	chr22:22113947-22221970
<i>BCR</i>	22q11.2 distal deletion	22			137 672	chr22:23522552-23660224
<i>EP300</i>	Rubinstein-Taybi sd	22			87 467	chr22:41488614-41576081
<i>SHANK3</i>	del22q13, Phelan-McDermid syndrome deletion	22			58 571	chr22:51113070-51171641
<i>NLGN4X</i>	Autism / Asperger sd /NS-MR	X			338 623	chrX:5808083-6146706
<i>MID1</i>	Opitz/BBB sd	X			438 459	chrX:10413350-10851809
<i>HCCS</i>	Microphthalmia with linear skin defects sd	X			11 798	chrX:11129406-11141204
<i>OFD1</i>	Sd oro-facio-digital 1	X			34 648	chrX:13752832-13787480
<i>FANCB</i>	X-linked VACTERL with hydrocephalus sd	X			29 655	chrX:14861529-14891184
<i>AP1S2</i>	XLMR Tarpey et al. 2006	X			29 171	chrX:15843929-15873100
<i>NHS</i>	Nance-Horam sd	X			360 570	chrX:17393543-17754113
<i>CDKL5/STK9</i>	Infantile spasms	X			228 024	chrX:18443725-18671749
<i>PDHA1</i>	Déficit en PDH	X			17 814	chrX:19362011-19379825
<i>RSK2/RPSK6KA3</i>	Coffin-Lowry sd / NS-MR	X			116 721	chrX:20168029-20284750
<i>MBTPS2</i>	Ichthyosis follicularis, atrichia, photophobia sd	X			45 885	chrX:21857656-21903541
<i>SMS</i>	Snyder-Robinson sd	X			54 240	chrX:21958715-22012955
<i>PTCHD1</i>		X			61 933	chrX:23352985-23414918
<i>ARX/LISX2</i>	West sd / NS-MR / lissencephaly X-linked with ambiguous g	X			12 252	chrX:25021813-25034065
<i>ILRAP1/ILRAPL</i>	NS-MR	X			1 368 336	chrX:28605681-29974017
<i>GKD</i>	Glycerol kinase deficiency	X			77 249	chrX:30671476-30748725
<i>OTC</i>	Déficit en OTC	X			68 967	chrX:38211736-38280703
<i>TSPAN7</i>	X-linked mental retardation and neuropsychiatric diseases suc	X			127 441	chrX:38420731-38548172
<i>BCOR</i>	Lenz microphthalmia	X			126 083	chrX:39910499-40036582
<i>TP6AP2/ATP6A8</i>	Epilepsy	X			25 672	chrX:40440216-40465888
<i>CASK</i>		X			408 098	chrX:41374189-41782287

<i>MAOA</i>	MAO-A-deficiency behavior : aggressive and violent	X	90 659	chrX:43515409-43606068
<i>NDP</i>	Maladie de Norrie	X	24 897	chrX:43808024-43832921
<i>ZNF674</i>	NS-MR	X	47 732	chrX:46357160-46404892
<i>ZNF41</i>	NS-MR	X	36 784	chrX:47305561-47342345
<i>SYN1</i>	Epilepsy, macrocephaly, aggression	X	47 956	chrX:47431300-47479256
<i>ZNF81</i>	NS-MR	X	85 354	chrX:47696301-47781655
<i>FTSJ1</i>	NS-MR	X	10 203	chrX:48334549-48344752
<i>PORCN</i>	Focal dermal hypoplasia	X	11 831	chrX:48367371-48379202
<i>PQBP1</i>	Renpenning sd / NS-MR	X	5 225	chrX:48755195-48760420
<i>SYP</i>	NS-MR	X	12 396	chrX:49044265-49056661
<i>AA1202/SHROO1</i>	Stocco dos Santos sd	X	222 401	chrX:50334643-50557044
<i>ID1C/SMCX/KD1</i>	Microcephaly, spasticity, epilepsy, short stature, facial anomaly	X	34 101	chrX:53220503-53254604
<i>IQSEC2</i>	NS-MR	X	88 457	chrX:53262065-53350522
<i>SMC1A/SMC1L1</i>	Cornelia de Lange sd	X	48 548	chrX:53401070-53449618
<i>ADH2/HSD17B1</i>	X-linked mental retardation, choreoathetosis, and abnormal behavior	X	3 117	chrX:53458206-53461323
<i>HUWE1</i>	MR Froyen et al. 2008	X	154 610	chrX:53559063-53713673
<i>PHF8</i>	Siderius-Hamel cleft lip or palate sd	X	108 456	chrX:53963113-54071569
<i>FGD1/FGDY</i>	Aarskog-Scott sd / NS-MR	X	50 712	chrX:54471887-54522599
<i>KLF8/ZNF741</i>		X	55 500	chrX:56258822-56314322
<i>CF9=CB=COLLY</i>	MR, epilepsy, anxiety, aggression - guanine-nucleotide-exchange factor	X	150 578	chrX:62854848-63005426
<i>OPHN1</i>	Cerebellar hypoplasia or dysplasia and epilepsy	X	391 113	chrX:67262186-67653299
<i>IGBP1</i>	Graham coloboma	X	32 855	chrX:69353318-69386173
<i>DLG3</i>	NS-MR	X	60 634	chrX:69664705-69725339
<i>MED12/HOPA</i>	Opitz-Kaveggia sd	X	23 898	chrX:70338406-70362304
<i>NLGN3</i>	NS-MR	X	26 370	chrX:70364681-70391051
<i>SLC16A2/MCT8</i>	Thyroid and neurological abnormalities	X	112 667	chrX:73641085-73753752
<i>KIAA2022</i>	Cantagrel spastic paraplegia	X	192 596	chrX:73952691-74145287
<i>ZDHHC15</i>		X	155 075	chrX:74588262-74743337
<i>ATRX/XH2/XNP</i>	ATRX sd / NS-MR	X	281 363	chrX:76760356-77041719
<i>MAGT1</i>	NS-MR	X	69 203	chrX:77081862-77151065
<i>ATP7A</i>	Maladie de Menkes	X	139 698	chrX:77166194-77305892
<i>PGK1</i>	Déficit en PGK1	X	22 658	chrX:77359666-77382324
<i>BRWD3</i>	MR, macrocephaly	X	140 246	chrX:79924987-80065233
<i>ZNF711</i>	NS-MR	X	29 371	chrX:84498997-84528368
<i>PCDH19</i>	Epilepsy with or without MR : LIMITED TO FEMALES	X	118 629	chrX:99546642-99665271

<i>SRPX2</i>	Language and conition disorder	X	27 133	chrX:99899163-99926296
<i>TIMM8A/DDP</i>	Mohr-Tranebjaerg sd	X	3 313	chrX:100600644-100603957
<i>NXF5</i>	Froyen et al.2007	X	25 464	chrX:101087085-101112549
<i>PLP1</i>	Maladie de Pelizaeus-Merzbacher	X	16 108	chrX:103031439-103047547
<i>PRPS1</i>	Hyperuricémie	X	22 602	chrX:106871654-106894256
<i>ACSL4/FACL4</i>	NS-MR	X	92 057	chrX:108884564-108976621
<i>PAK3</i>	NS-MR	X	276 660	chrX:110187513-110464173
<i>DCX/Dbcn</i>	Type 1 lissencephaly	X	118 453	chrX:110537007-110655460
<i>AGTR2</i>	NS-MR	X	4 267	chrX:115301958-115306225
<i>SIZN1/ZCCHC12</i>	candidate X-linked mental retardation gene	X	3 144	chrX:117957787-117960931
<i>UBE2A</i>	MR Nascimento et al. 2006	X	9 880	chrX:118708499-118718379
<i>UPF3B</i>	S and NS-MR Tarpey et al. 2007	X	19 002	chrX:118967989-118986991
<i>NDUFA1</i>	Mitochondrial encephalomyopathy	X	4 895	chrX:119005734-119010629
<i>LAMP2</i>	Danon cardiomyopathy	X	43 201	chrX:119560003-119603204
<i>CUL4B</i>	XLMR	X	51 238	chrX:119658446-119709684
<i>GRIA3</i>	dupXq25	X	306 670	chrX:122318096-122624766
<i>OCRL1</i>	Lowe sd	X	52 278	chrX:128674252-128726530
<i>ZDHHC9</i>	X-linked mental retardation	X	40 646	chrX:128937264-128977910
<i>GPC3</i>	Simpson-Golabi-Behmel sd	X	449 897	chrX:132669776-133119673
<i>PHF6</i>	Börjeson-Forssman-Lehmann sd	X	55 480	chrX:133507342-133562822
<i>HPRT1</i>	Lesch-Nyhan sd	X	40 523	chrX:133594175-133634698
<i>SLC9A6</i>	MR, microcephaly, epilepsy, ataxia, pseudo Angelman sd	X	61 842	chrX:135067586-135129428
<i>HGEF6/alpha-P</i>	NS-MR	X	115 791	chrX:135747712-135863503
<i>SOX3</i>	Isolated GH deficiency, short stature, MR	X	2 073	chrX:139585152-139587225
<i>FMR1</i>	X fragile	X	39 178	chrX:146993469-147032647
<i>MR2/FRAXE/AFI</i>	NS-MR Fragile XE	X	500 054	chrX:147582139-148082193
<i>IDS</i>	Hunter disease	X	26 589	chrX:148560295-148586884
<i>MTM1</i>	Myotubular myopathy	X	104 569	chrX:149737047-149841616
<i>NSDHL</i>	Microcephaly, pachygyria, facial dysmorphism, seizures	X	38 396	chrX:151999511-152037907
<i>SLC6A8</i>	Creatine deficiency sd / NS-MR	X	8 296	chrX:152953752-152962048
<i>ABCD1/ALDP</i>	Adrénoleucodystrophie	X	19 893	chrX:152990323-153010216
<i>LICAM</i>	MASA sd / Hydrocéphalie liée à l'X	X	14 428	chrX:153126971-153141399
<i>F21/17/16</i>	3 régions cis enhancer MECP2	X	23 809	chrX:153213010-153236819
<i>MECP2</i>	Rett sd / NS-MR	X	75 924	chrX:153287264-153363188
<i>FLNA/FLN1</i>	Periventricular heterotopia	X	26 106	chrX:153576900-153603006

Y

<i>RPL10</i>	Autism	X	4 109	chrX:153626571-153630680
<i>GDI1</i>	NS-MR	X	6 555	chrX:153665259-153671814
<i>IKBKGNEMO</i>	Incontinentia Pigmenti	X	22 802	chrX:153770459-153793261
<i>DKCI</i>	Dyskératose congénitale	X	14 933	chrX:153991031-154005964
<i>MPP1</i>		X	26 797	chrX:154006968-154033765
<i>RAB39B</i>	Macrocephaly,seizures and autism	X	6 326	chrX:154487526-154493852
<i>NLGN4Y</i>	Autism / Asperger sd /NS-MR	Y	321 360	chrY:16634488-16955848
			51 832 878	

322 gènes

ANNEXE 4

71 CNV ne contenant aucun polymorphisme de la base DGV

	chr	start	stop	récurrence	nb sondes	ampli	del	p value
1	chr1	7448863	7449493	2	23	0,336997	0	1,62E-11
2	chr1	7724201	7724571	3	10	0	-0,670983	7,23E-14
3	chr1	245015863	245016077	1	15	0,345876	0	2,97E-10
4	chr10	97582861	97583150	1	11	0,508903	0	6,32E-14
5	chr10	97627401	97628036	1	20	0,316485	0	4,21E-14
6	chr10	97627425	97628052	3	21	0,428155	0	1,45E-13
7	chr10	97627425	97628166	1	26	0,358522	0	1,97E-13
8	chr10	97627430	97628153	3	24	0,605457	0	8,52E-20
9	chr11	70314591	70314854	3	15	0,316637	0	2,81E-11
10	chr11	87032459	87032855	1	17	0,4905	0	4,38E-15
11	chr12	13714588	13714821	1	13	0,560786	0	1,07E-12
12	chr12	13714595	13714821	2	12	0,658808	0	7,59E-14
13	chr12	13730548	13732912	1	10	0,426529	0	5,55E-11
14	chr12	66249945	66250293	1	11	0,442899	0	2,77E-12
15	chr13	32708996	32709148	1	12	0,427133	0	1,12E-11
16	chr14	89060783	89061347	2	23	0,338156	0	1,39E-14
17	chr14	89079401	89079515	2	11	0,397497	0	6,13E-13
18	chr15	24927763	24927965	2	20	0,352801	0	3,42E-13
19	chr15	25350365	25350585	1	13	0,391474	0	2,72E-11
20	chr15	27184379	27184613	1	12	0,504985	0	2,15E-11
21	chr15	27193029	27193158	1	13	0,41667	0	1,45E-13
22	chr15	51226716	51226866	1	12	1,025168	0	2,10E-38
23	chr15	76225898	76226128	2	16	0,418707	0	9,57E-13
24	chr15	83932515	83933275	2	40	0,327032	0	9,34E-15
25	chr16	9857390	9857661	3	14	0,389399	0	4,93E-12
26	chr18	51690933	51692745	1	20	0,441711	0	3,03E-12
27	chr18	52893118	52893314	1	10	0,594457	0	1,01E-16
28	chr18	59974141	59974246	1	10	0,656389	0	1,61E-11
29	chr2	106467479	106468309	1	11	0,465363	0	1,29E-12
30	chr2	106479387	106482291	1	16	0	-0,611254	7,37E-17
31	chr2	145147560	145175929	1	301	0	-0,895855	0
32	chr2	145185647	145185794	1	11	0,43316	0	4,33E-11
33	chr2	149228112	149228297	1	10	0,714576	0	1,07E-13
34	chr2	165946352	165946724	3	27	0,434927	0	1,78E-18
35	chr2	165946352	165946738	2	28	0,443198	0	4,34E-25
36	chr2	165946352	165946999	1	53	0,33024	0	1,29E-22
37	chr2	165946443	165946830	2	31	0,36964	0	9,06E-16
38	chr2	166043003	166043443	1	22	0,39881	0	6,11E-11
39	chr2	166043101	166043220	3	11	0,506487	0	5,61E-14
40	chr2	166043101	166043302	2	17	0,429025	0	1,24E-13
41	chr2	166225059	166226772	1	23	0,347952	0	1,82E-13
42	chr2	166226579	166226726	3	13	0,608087	0	2,71E-19
43	chr2	166226588	166226772	2	16	0,510135	0	1,19E-12
44	chr2	166858651	166859077	2	13	0,442805	0	1,05E-11
45	chr2	166901420	166901859	1	23	0,301443	0	3,47E-12
46	chr2	166901572	166901851	2	20	0,385065	0	2,37E-14
47	chr2	210556607	210556729	1	10	0,614162	0	2,19E-17
48	chr20	8851741	8852088	1	10	0,498011	0	2,74E-13
49	chr20	8854093	8854252	1	15	0,556263	0	1,03E-18
50	chr21	9832936	9834682	1	17	0,337025	0	1,23E-11
51	chr21	9833026	9834682	2	16	0,436939	0	3,93E-10
52	chr21	9833062	9834682	3	15	0,365718	0	1,34E-11
53	chr3	51273563	51273911	2	10	0,44805	0	2,41E-12
54	chr3	51418350	51418960	2	25	0	-0,612711	3,22E-45
55	chr4	56883554	56883997	1	18	0,386406	0	2,58E-14
56	chr5	6631912	6632136	1	12	0,426932	0	5,03E-15
57	chr5	178403611	178405459	3	13	0	-0,707581	1,63E-14
58	chr6	33986481	33990162	3	32	0,350599	0	1,19E-15
59	chr6	34023304	34024354	3	11	0	-0,796854	1,25E-23
60	chr6	34023547	34024408	3	10	0,482136	0	1,11E-12
61	chr6	133776639	133777728	1	11	0,581089	0	7,91E-12
62	chr6	146757156	146757708	1	20	0,393752	0	1,71E-14
63	chr6	146757170	146757690	2	17	0,376321	0	2,23E-10
64	chr7	77708266	77708419	1	13	0,422723	0	1,88E-12
65	chr7	145813585	145815166	1	26	0,401779	0	1,93E-15
66	chr7	148114459	148114643	1	11	0,395551	0	2,61E-11
67	chr7	148115222	148115487	1	12	0,398436	0	1,36E-13
68	chr7	148115290	148115487	2	11	0,535328	0	1,84E-14
69	chr8	77776908	77777269	1	13	0,505946	0	1,39E-13
70	chr9	130454082	130454397	3	12	0,328155	0	2,20E-17
71	chrX	47307041	47308478	3	24	0,312509	0	2,67E-14

ANNEXE 5

81 CNV touchant les régions en amont ou en aval des 435 gènes candidats ciblés

chr	start	stop	récurrence	nb sondes	ampli	del	p value	
1	chr1	43147734	43150743	2	20	0,323329	0	5,00E-12
2	chr1	107657194	107663440	1	11	0	-0,898197	3,72E-43
3	chr1	241518910	241522090	1	17	0	-0,663868	5,18E-16
4	chr1	245026013	245028113	2	12	0,904481	0	9,09E-36
5	chr1	245026031	245028113	3	11	0	-0,918233	1,88E-34
6	chr10	50818122	50819833	2	21	0,376354	0	2,30E-13
7	chr10	82879955	82891283	3	10	0	-0,806025	5,45E-30
8	chr10	82879955	82891283	3	10	0	-0,977118	1,31E-40
9	chr10	84823668	84840383	1	21	0,628949	0	1,49E-34
10	chr12	122902888	122999784	3	420	0,437914	0	0
11	chr14	43791064	43811549	1	127	0,610169	0	5,79E-42
12	chr15	22756650	23208901	1	531	0	-0,821627	0
13	chr15	24055644	24061438	1	22	0	-0,815058	1,77E-59
14	chr15	24358788	24449947	1	34	0,371034	0	5,90E-24
15	chr15	24366121	24485342	1	113	0,639761	0	1,35E-74
16	chr15	24375839	24439898	3	24	0,478329	0	8,81E-22
17	chr15	24381431	24468407	2	27	0,371074	0	2,39E-19
18	chr15	24550001	24612995	3	17	0,53154	0	1,44E-19
19	chr15	24550001	24670780	2	34	0,763542	0	5,73E-85
20	chr15	24920540	24921865	1	40	0,596978	0	6,39E-54
21	chr16	6988604	7021188	2	39	0	-0,917142	3,56E-143
22	chr17	43971337	43973793	3	24	0,338807	0	3,89E-15
23	chr17	44163884	44353753	3	648	0,47665	0	0
24	chr17	80038396	80058648	3	196	0	-0,621229	8,81E-138
25	chr18	41764280	41776742	1	22	0	-0,885372	5,89E-65
26	chr18	41976829	41981962	3	19	0	-1,085708	1,05E-78
27	chr18	53254878	53255877	2	21	0	-1,374359	6,57E-145
28	chr18	53255665	53256728	1	17	0,599573	0	2,48E-21
29	chr18	62053542	62058766	3	20	0,530876	0	4,49E-15
30	chr18	63200008	63206531	2	18	0	-0,924995	1,84E-28
31	chr18	63200008	63206531	2	18	0	-1,02329	7,17E-63
32	chr18	63200745	63207405	2	17	0,963733	0	1,72E-55
33	chr18	63723475	63732212	2	30	0,904202	0	9,10E-59
34	chr18	63723475	63732212	2	30	0,844777	0	8,72E-90
35	chr18	63905953	63911471	1	18	0	-0,929253	1,84E-27
36	chr2	146862616	146876856	2	47	0,866553	0	3,84E-153
37	chr2	146863215	146868510	3	21	0	-3,534219	0
38	chr2	148743138	148748503	1	15	0	-0,885951	1,18E-52
39	chr2	165832330	165854476	2	17	0,429527	0	1,43E-15
40	chr2	165852449	165865028	1	31	0	-0,888861	5,26E-108
41	chr2	172340492	172343556	2	38	0,332807	0	5,44E-13
42	chr2	208352156	208360090	1	11	0	-0,822912	1,34E-24
43	chr2	240626986	240635788	2	16	0,387342	0	3,53E-13
44	chr22	41487420	41489187	2	18	0	-0,985123	2,75E-39
45	chr3	45634677	45636494	3	13	0	-0,669246	1,21E-22
46	chr4	31148175	31148437	1	16	0,366809	0	6,13E-11
47	chr4	34769515	34822840	1	13	0	-0,846624	9,73E-36
48	chr4	82392474	82393940	1	10	0,81022	0	1,24E-25
49	chr4	134921321	135184199	1	69	0	-0,853859	1,05E-196
50	chr4	138090945	138100717	1	14	0	-0,8502	3,01E-17
51	chr4	138180721	138191374	1	11	0	-0,938822	1,48E-42
52	chr5	178403611	178405459	3	13	0	-0,707581	1,63E-14
53	chr6	33986481	33990162	3	32	0,350599	0	1,19E-15
54	chr6	39068899	39072841	3	14	0	-1,100872	9,85E-43
55	chr6	39068899	39072841	3	14	0	-1,163312	1,63E-33
56	chr6	101483115	101486939	1	13	0	-0,911324	4,17E-28
57	chr6	103735027	103761352	2	42	0,879833	0	5,86E-68
58	chr6	103735027	103761352	2	42	0,818477	0	8,35E-100
59	chr6	103737764	103765340	2	42	0,794545	0	3,21E-45
60	chr6	103737764	103765340	2	42	0,811844	0	7,08E-116
61	chr6	104463942	104468522	1	14	0	-0,98862	1,69E-53
62	chr6	131650282	131659823	1	30	0,663074	0	7,17E-27
63	chr7	75353997	75372797	2	118	0,39795	0	1,39E-94
64	chr7	75367863	75370231	3	10	0,398762	0	5,78E-11
65	chr7	96633627	96636951	1	16	0	-0,727297	5,59E-21
66	chr9	214827	215581	1	17	0,426185	0	1,64E-14
67	chr9	268159	472145	1	1382	0,49111	0	0
68	chr9	110251190	110257646	2	31	0	-0,697622	2,35E-19
69	chrX	5159834	5164001	3	12	0	-0,777385	3,50E-34
70	chrX	5159834	5164001	3	12	0	-0,936816	9,37E-45
71	chrX	38584613	38592886	2	15	0	-0,767829	3,41E-14
72	chrX	42995787	42999827	3	17	0	-0,804018	6,37E-31
73	chrX	43985787	43993349	2	14	0,583498	0	4,82E-11
74	chrX	56472650	56515493	2	28	0,802366	0	2,27E-87
75	chrX	62412877	62512841	2	67	0,526497	0	3,04E-90
76	chrX	67098400	67130174	2	11	0,856082	0	4,45E-23
77	chrX	101047243	101059611	2	24	0	-1,991572	1,10E-186
78	chrX	101055534	101059843	2	10	0,883182	0	3,16E-29
79	chrX	115138159	115156818	2	21	0	-0,872066	6,12E-64
80	chrY	17032920	17048609	3	16	0,792846	0	8,54E-11
81	chrY	18581106	18584711	3	15	1,01946	0	2,60E-13

ANNEXE 6

211 CNV contenant un ou une partie d'un des 435 gènes DI

	chr	start	stop	récence	nb sondes	ampli	del	p value
1	chr1	22416925	22417107	2	18	0,408459	0	1,12E-17
2	chr1	43147734	43150743	2	20	0,323329	0	5,00E-12
3	chr1	197091049	197091595	1	26	0,359773	0	5,76E-14
4	chr1	197114518	197115824	1	27	0	-0,723433	2,16E-47
5	chr1	210336550	210336917	1	18	0,350987	0	2,77E-12
6	chr1	241518910	241522090	1	17	0	-0,663868	5,18E-16
7	chr1	245015863	245016077	1	15	0,345876	0	2,97E-10
8	chr1	245026013	245028113	2	12	0,904481	0	9,09E-36
9	chr1	245026031	245028113	3	11	0	-0,918233	1,88E-34
10	chr10	50818122	50819833	2	21	0,376354	0	2,30E-13
11	chr10	83813601	83817187	1	13	0,375638	0	3,19E-10
12	chr10	83883650	83889049	2	21	0	-0,984936	1,81E-82
13	chr10	83883650	83889049	2	21	0	-0,904219	3,98E-68
14	chr10	84126979	84129460	1	10	0	-0,78356	3,42E-24
15	chr10	84409646	84431605	1	104	0,508774	0	6,57E-132
16	chr10	84712282	84717217	1	29	0	-0,970426	3,76E-105
17	chr10	97582861	97583150	1	11	0,508903	0	6,32E-14
18	chr10	97627401	97628036	1	20	0,316485	0	4,21E-14
19	chr10	97627425	97628052	3	21	0,428155	0	1,45E-13
20	chr10	97627425	97628166	1	26	0,358522	0	1,97E-13
21	chr10	97627430	97628153	3	24	0,605457	0	8,52E-20
22	chr11	7021072	7022436	1	64	0,362913	0	2,85E-21
23	chr11	70314591	70314854	3	15	0,316637	0	2,81E-11
24	chr11	87032459	87032855	1	17	0,4905	0	4,38E-15
25	chr11	88241851	88242590	3	16	0,599806	0	1,03E-24
26	chr11	88242022	88243239	3	24	0	-0,999674	1,78E-98
27	chr11	88242022	88243239	3	24	1,131893	0	3,57E-111
28	chr11	88369793	88380532	1	42	0	-0,786542	2,62E-115
29	chr11	105784017	105784254	2	19	0,348503	0	4,51E-11
30	chr11	105784017	105784254	2	19	0,46479	0	1,32E-14
31	chr11	105797447	105797586	1	12	0,454621	0	1,03E-10
32	chr11	119520444	119522841	2	11	0	-0,662405	2,24E-12
33	chr11	119535790	119536048	3	10	0,698298	0	1,96E-27
34	chr11	126694280	126697562	1	15	0,465583	0	1,08E-13
35	chr12	13714588	13714821	1	13	0,560786	0	1,07E-12
36	chr12	13714595	13714821	2	12	0,658808	0	7,59E-14
37	chr12	13730548	13732912	1	10	0,426529	0	5,55E-11
38	chr12	23685233	23685529	1	15	0,536916	0	2,85E-20
39	chr12	49432049	49433044	2	20	0,377794	0	2,94E-13
40	chr12	49432273	49433044	3	19	0,522926	0	1,58E-13
41	chr12	50032781	50033050	2	11	0,498965	0	5,55E-11
42	chr12	66249945	66250293	1	11	0,442899	0	2,77E-12
43	chr12	122902888	122999784	3	420	0,437914	0	0
44	chr13	26043206	26044260	2	11	0	-0,672485	2,64E-13
45	chr13	32708996	32709148	1	12	0,427133	0	1,12E-11
46	chr14	21868616	21868789	1	10	0,399426	0	2,59E-11
47	chr14	21899065	21899359	3	12	0	-0,721779	3,05E-16
48	chr14	42236146	42236775	1	10	0,595893	0	1,27E-12
49	chr14	89060783	89061347	2	23	0,338156	0	1,39E-14
50	chr14	89079401	89079515	2	11	0,397497	0	6,13E-13
51	chr14	102452461	102452995	3	13	0,568654	0	9,99E-24
52	chr15	22756650	23208901	1	531	0	-0,821627	0
53	chr15	23812678	23812954	2	15	0,436888	0	1,29E-10
54	chr15	24920540	24921865	1	40	0,596978	0	6,39E-54
55	chr15	24921179	24921799	3	27	0,863126	0	2,79E-80
56	chr15	24927763	24927965	2	20	0,352801	0	3,42E-13
57	chr15	51226716	51226866	1	12	1,025168	0	2,10E-38
58	chr15	51297700	51297918	1	18	0,347049	0	7,89E-11
59	chr15	74335618	74336671	3	16	0,363649	0	2,95E-14
60	chr15	75713476	75713805	3	15	0,386959	0	8,24E-13
61	chr15	101110111	101110347	1	15	0,537062	0	1,76E-22
62	chr15	101110128	101110289	3	12	0	-0,63669	9,45E-22
63	chr17	16208752	16213732	2	16	0	-1,00111	2,74E-58
64	chr17	29549576	29560132	2	81	0,30627	0	2,42E-40
65	chr17	29550528	29560140	2	78	0,41882	0	4,01E-70
66	chr17	29550894	29560637	2	74	0,357217	0	6,27E-49
67	chr17	29551492	29563259	2	92	0,310434	0	2,50E-44
68	chr17	29553674	29563094	3	82	0,353867	0	1,10E-44
69	chr17	29583457	29595044	2	69	0,323343	0	1,45E-31
70	chr17	29632274	29632457	3	12	0,542705	0	3,12E-13

211 CNV contenant un ou une partie d'un des 435 gènes DI

71	chr17	43971337	43973793	3	24	0,338807	0	3,89E-15
72	chr17	43972592	43974524	3	31	0	-0,718227	2,06E-53
73	chr17	43975382	43975638	3	14	0,634711	0	2,44E-29
74	chr17	44163884	44353753	3	648	0,47665	0	0
75	chr17	46024640	46024762	3	12	0,365191	0	5,80E-14
76	chr17	80038396	80058648	3	196	0	-0,621229	8,81E-138
77	chr17	80592521	80597457	3	16	0	-0,825214	6,30E-28
78	chr18	44559113	44559934	1	28	0,332467	0	7,67E-16
79	chr18	44559120	44559863	3	23	1,111536	0	9,49E-101
80	chr18	44559120	44559903	2	26	0,629124	0	2,99E-29
81	chr18	44559207	44560232	1	32	0,422525	0	3,72E-30
82	chr18	44559231	44560209	2	29	0,330599	0	1,29E-13
83	chr18	44559242	44560187	3	26	0,338725	0	1,01E-15
84	chr18	44559696	44560232	2	17	0,333245	0	2,63E-11
85	chr18	51690933	51692745	1	20	0,441711	0	3,03E-12
86	chr18	52893118	52893314	1	10	0,594457	0	1,01E-16
87	chr18	53254878	53255877	2	21	0	-1,374359	6,57E-145
88	chr18	53255665	53256728	1	17	0,599573	0	2,48E-21
89	chr18	59974141	59974246	1	10	0,656389	0	1,61E-11
90	chr19	51165139	51172653	3	58	0,47547	0	5,20E-52
91	chr2	1525355	1541819	3	49	0,434343	0	1,09E-37
92	chr2	1525355	1541819	3	49	0,458936	0	1,34E-49
93	chr2	1525549	1543393	1	57	0,372961	0	3,97E-20
94	chr2	1845963	1846338	1	17	0,395175	0	8,50E-13
95	chr2	97202847	97203647	3	15	0,444346	0	1,38E-15
96	chr2	97203203	97203888	3	17	0,392199	0	5,48E-12
97	chr2	106014695	106016059	1	12	0,640088	0	1,37E-20
98	chr2	106388651	106391031	1	12	0	-0,681835	2,93E-18
99	chr2	106467479	106468309	1	11	0,465363	0	1,29E-12
100	chr2	106479387	106482291	1	16	0	-0,611254	7,37E-17
101	chr2	145147560	145175929	1	301	0	-0,895855	0
102	chr2	145185647	145185794	1	11	0,43316	0	4,33E-11
103	chr2	149228112	149228297	1	10	0,714576	0	1,07E-13
104	chr2	165946352	165946724	3	27	0,434927	0	1,78E-18
105	chr2	165946352	165946738	2	28	0,443198	0	4,34E-25
106	chr2	165946352	165946999	1	53	0,33024	0	1,29E-22
107	chr2	165946443	165946830	2	31	0,36964	0	9,06E-16
108	chr2	166043003	166043443	1	22	0,39881	0	6,11E-11
109	chr2	166043101	166043220	3	11	0,506487	0	5,61E-14
110	chr2	166043101	166043302	2	17	0,429025	0	1,24E-13
111	chr2	172338123	172338390	1	19	0,440892	0	4,54E-21
112	chr2	172338130	172338398	1	19	0,414327	0	1,67E-17
113	chr2	172338137	172338655	1	31	0,315683	0	9,80E-16
114	chr2	172338148	172338597	3	24	0,392196	0	1,07E-17
115	chr2	172338227	172338642	2	21	0,64193	0	1,25E-21
116	chr2	172340391	172340562	1	15	0	-0,984377	9,16E-25
117	chr2	172340492	172343556	2	38	0,332807	0	5,44E-13
118	chr2	175425337	175425554	2	13	0,488834	0	8,85E-13
119	chr2	175425337	175425592	1	17	0,344943	0	1,77E-11
120	chr2	175436365	175437045	1	23	0,375816	0	1,83E-14
121	chr2	208461565	208461854	1	14	0,363608	0	1,67E-12
122	chr2	208462792	208463228	1	17	0,390694	0	4,36E-11
123	chr2	210556607	210556729	1	10	0,614162	0	2,19E-17
124	chr2	239970966	239971698	2	38	0,926683	0	1,44E-62
125	chr2	240055700	240056456	3	12	0,577251	0	5,42E-24
126	chr20	8851741	8852088	1	10	0,498011	0	2,74E-13
127	chr20	8854093	8854252	1	15	0,556263	0	1,03E-18
128	chr22	19745926	19749476	3	16	0,481588	0	3,10E-21
129	chr22	19751561	19756014	3	37	0	-0,601912	2,22E-16
130	chr22	22114726	22115080	2	20	0,34169	0	5,58E-16
131	chr22	22116898	22117210	2	14	0,36121	0	2,33E-11
132	chr22	23654337	23659453	2	36	0,526743	0	1,18E-10
133	chr22	41487420	41489187	2	18	0	-0,985123	2,75E-39
134	chr22	41525843	41526065	3	12	0,39796	0	1,50E-12
135	chr3	2149396	2149942	1	27	0,301882	0	1,10E-11
136	chr3	2308069	2311388	1	19	0	-1,044787	3,37E-35
137	chr3	3051577	3055350	1	15	0	-0,832516	1,09E-46
138	chr3	45634677	45636494	3	13	0	-0,669246	1,21E-22
139	chr3	51273563	51273911	2	10	0,44805	0	2,41E-12
140	chr3	51378716	51378843	3	10	0	-0,698906	1,02E-18
141	chr3	51418350	51418960	2	25	0	-0,612711	3,22E-45

211 CNV contenant un ou une partie d'un des 435 gènes DI

142	chr3	173239389	173290859	3	187	0,664814	0	6,42E-213
143	chr3	173239389	173290859	3	187	0,609121	0	1,25E-275
144	chr3	173239389	173290859	3	187	0,598699	0	1,23E-126
145	chr4	31146063	31146396	1	14	0,44345	0	1,43E-12
146	chr4	31148175	31148437	1	16	0,366809	0	6,13E-11
147	chr4	56432996	56691877	1	35	0	-0,867649	4,66E-94
148	chr4	56883554	56883997	1	18	0,386406	0	2,58E-14
149	chr4	82376033	82376258	1	10	0,681381	0	3,57E-10
150	chr4	82392474	82393940	1	10	0,81022	0	1,24E-25
151	chr4	119243721	119247113	2	13	0	-0,902877	1,01E-44
152	chr4	119243721	119247113	2	13	0	-0,979248	8,16E-36
153	chr5	6631912	6632136	1	12	0,426932	0	5,03E-15
154	chr5	36976370	36976976	1	10	0,612493	0	2,08E-11
155	chr5	58266452	58267807	1	50	0,302912	0	4,44E-19
156	chr5	58287735	58287884	2	11	0,554041	0	1,54E-15
157	chr5	58287735	58287884	2	11	0,448133	0	1,44E-10
158	chr5	58335067	58336619	2	16	0	-0,818181	2,03E-44
159	chr5	58335067	58336716	1	17	0	-0,785687	2,41E-44
160	chr5	58335858	58336716	2	14	0,96582	0	2,84E-47
161	chr5	140431903	140432087	1	10	0,689048	0	1,75E-16
162	chr5	149900185	149901260	3	27	0,403143	0	1,87E-28
163	chr5	178403611	178405459	3	13	0	-0,707581	1,63E-14
164	chr6	33986481	33990162	3	32	0,350599	0	1,19E-15
165	chr6	34023304	34024354	3	11	0	-0,796854	1,25E-23
166	chr6	34023547	34024408	3	10	0,482136	0	1,11E-12
167	chr6	102274774	102284300	1	31	0,333013	0	2,27E-10
168	chr6	114269703	114270191	1	16	0,448453	0	2,34E-10
169	chr6	114270052	114270191	3	12	0,503822	0	7,11E-14
170	chr6	124433051	124471695	1	147	0,630963	0	1,40E-124
171	chr6	133776639	133777728	1	11	0,581089	0	7,91E-12
172	chr6	146490811	146497956	1	98	0	-0,606541	5,73E-84
173	chr6	146625838	146625942	1	10	0,487817	0	6,96E-12
174	chr6	146757156	146757708	1	20	0,393752	0	1,71E-14
175	chr6	146757170	146757690	2	17	0,376321	0	2,23E-10
176	chr6	157256617	157256766	1	10	0	-0,688264	1,98E-14
177	chr7	75353997	75372797	2	118	0,39795	0	1,39E-94
178	chr7	75363094	75367670	3	50	0,3872	0	1,33E-33
179	chr7	75367863	75370231	3	10	0,398762	0	5,78E-11
180	chr7	77648228	77648523	1	10	0,377466	0	4,68E-11
181	chr7	77708266	77708419	1	13	0,422723	0	1,88E-12
182	chr7	78150781	78154785	1	29	0,338207	0	1,27E-12
183	chr7	96633627	96636951	1	16	0	-0,727297	5,59E-21
184	chr7	103266210	103268157	1	10	0	-0,996051	1,03E-42
185	chr7	114304976	114305260	1	15	0,432175	0	6,15E-12
186	chr7	143000925	143001777	1	10	0,491204	0	1,69E-13
187	chr8	77776908	77777269	1	13	0,505946	0	1,39E-13
188	chr8	100091054	100093537	1	15	0,369672	0	1,95E-11
189	chr8	140743764	140745574	2	22	0,549626	0	1,01E-26
190	chr8	140945459	140945608	2	13	0	-0,621853	1,72E-15
191	chr8	141284629	141285851	2	11	0,309752	0	1,98E-12
192	chr8	141460907	141461089	2	12	0,345371	0	3,93E-13
193	chr9	214827	215581	1	17	0,426185	0	1,64E-14
194	chr9	215226	215586	1	17	0,450718	0	2,37E-14
195	chr9	215581	215789	1	11	0	-0,788529	5,49E-14
196	chr9	268159	472145	1	1 382	0,49111	0	0
197	chr9	2147998	2151390	2	12	0	-0,988992	1,07E-48
198	chr9	2147998	2151390	2	12	0	-0,959477	2,10E-33
199	chr9	110251190	110257646	2	31	0	-0,697622	2,35E-19
200	chr9	123249580	123249755	2	10	0,749159	0	1,96E-12
201	chr9	123253493	123253870	2	18	0,316807	0	1,75E-10
202	chr9	123253616	123253776	3	15	0,382834	0	1,99E-13
203	chr9	130454082	130454397	3	12	0,328155	0	2,20E-17
204	chr9	133911466	133911752	3	10	0,72569	0	4,98E-28
205	chr9	140682179	140683110	3	23	0,414037	0	9,17E-12
206	chr9	140682731	140683556	3	22	0	-0,683113	5,33E-32
207	chr9	140725903	140730119	3	50	0,306673	0	8,52E-24
208	chrX	6144067	6145438	3	11	0	-0,963887	8,46E-33
209	chrX	47307041	47308478	3	24	0,312509	0	2,67E-14
210	chrY	16641581	16645126	2	12	0	-0,842925	7,58E-11
211	chrY	16774695	16782620	2	27	0	-0,763182	4,51E-13

ANNEXE 7

166 CNV dans des régions exoniques d'un des 435 gènes DI

	chr	start	stop	récence	nb sondes	ampli	del	p value
1	chr1	22416925	22417107	2	18	0,408459	0	1,12E-17
2	chr1	43147734	43150743	2	20	0,323329	0	5,00E-12
3	chr1	197091049	197091595	1	26	0,359773	0	5,76E-14
4	chr1	197114518	197115824	1	27	0	-0,723433	2,16E-47
5	chr1	210336550	210336917	1	18	0,350987	0	2,77E-12
6	chr1	241518910	241522090	1	17	0	-0,663868	5,18E-16
7	chr1	245015863	245016077	1	15	0,345876	0	2,97E-10
8	chr1	245026013	245028113	2	12	0,904481	0	9,09E-36
9	chr1	245026031	245028113	3	11	0	-0,918233	1,88E-34
10	chr10	50818122	50819833	2	21	0,376354	0	2,30E-13
11	chr10	84712282	84717217	1	29	0	-0,970426	3,76E-105
12	chr10	97582861	97583150	1	11	0,508903	0	6,32E-14
13	chr10	97627401	97628036	1	20	0,316485	0	4,21E-14
14	chr10	97627425	97628052	3	21	0,428155	0	1,45E-13
15	chr10	97627425	97628166	1	26	0,358522	0	1,97E-13
16	chr10	97627430	97628153	3	24	0,605457	0	8,52E-20
17	chr11	7021072	7022436	1	64	0,362913	0	2,85E-21
18	chr11	70314591	70314854	3	15	0,316637	0	2,81E-11
19	chr11	87032459	87032855	1	17	0,4905	0	4,38E-15
20	chr11	88241851	88242590	3	16	0,599806	0	1,03E-24
21	chr11	88242022	88243239	3	24	0	-0,999674	1,78E-98
22	chr11	88242022	88243239	3	24	1,131893	0	3,57E-111
23	chr11	105784017	105784254	2	19	0,348503	0	4,51E-11
24	chr11	105784017	105784254	2	19	0,46479	0	1,32E-14
25	chr11	105797447	105797586	1	12	0,454621	0	1,03E-10
26	chr11	119535790	119536048	3	10	0,698298	0	1,96E-27
27	chr12	13714588	13714821	1	13	0,560786	0	1,07E-12
28	chr12	13714595	13714821	2	12	0,658808	0	7,59E-14
29	chr12	23685233	23685529	1	15	0,536916	0	2,85E-20
30	chr12	49432049	49433044	2	20	0,377794	0	2,94E-13
31	chr12	49432273	49433044	3	19	0,522926	0	1,58E-13
32	chr12	50032781	50033050	2	11	0,498965	0	5,55E-11
33	chr12	66249945	66250293	1	11	0,442899	0	2,77E-12
34	chr12	122902888	122999784	3	420	0,437914	0	0
35	chr13	26043206	26044260	2	11	0	-0,672485	2,64E-13
36	chr13	32708996	32709148	1	12	0,427133	0	1,12E-11
37	chr14	21868616	21868789	1	10	0,399426	0	2,59E-11
38	chr14	21899065	21899359	3	12	0	-0,721779	3,05E-16
39	chr14	42236146	42236775	1	10	0,595893	0	1,27E-12
40	chr14	89060783	89061347	2	23	0,338156	0	1,39E-14
41	chr14	89079401	89079515	2	11	0,397497	0	6,13E-13
42	chr14	102452461	102452995	3	13	0,568654	0	9,99E-24
43	chr15	22756650	23208901	1	531	0	-0,821627	0
44	chr15	23812678	23812954	2	15	0,436888	0	1,29E-10
45	chr15	24920540	24921865	1	40	0,596978	0	6,39E-54
46	chr15	24921179	24921799	3	27	0,863126	0	2,79E-80
47	chr15	24927763	24927965	2	20	0,352801	0	3,42E-13
48	chr15	51226716	51226866	1	12	1,025168	0	2,10E-38
49	chr15	51297700	51297918	1	18	0,347049	0	7,89E-11
50	chr15	74335618	74336671	3	16	0,363649	0	2,95E-14
51	chr15	75713476	75713805	3	15	0,386959	0	8,24E-13
52	chr15	101110111	101110347	1	15	0,537062	0	1,76E-22
53	chr15	101110128	101110289	3	12	0	-0,63669	9,45E-22
54	chr17	29549576	29560132	2	81	0,30627	0	2,42E-40
55	chr17	29550528	29560140	2	78	0,41882	0	4,01E-70
56	chr17	29550894	29560637	2	74	0,357217	0	6,27E-49
57	chr17	29551492	29563259	2	92	0,310434	0	2,50E-44

166 CNV dans des régions exoniques d'un des 435 gènes DI

58	chr17	29553674	29563094	3	82	0,353867	0	1,10E-44
59	chr17	29583457	29595044	2	69	0,323343	0	1,45E-31
60	chr17	29632274	29632457	3	12	0,542705	0	3,12E-13
61	chr17	43971337	43973793	3	24	0,338807	0	3,89E-15
62	chr17	43972592	43974524	3	31	0	-0,718227	2,06E-53
63	chr17	43975382	43975638	3	14	0,634711	0	2,44E-29
64	chr17	44163884	44353753	3	648	0,47665	0	0
65	chr17	46024640	46024762	3	12	0,365191	0	5,80E-14
66	chr17	80038396	80058648	3	196	0	-0,621229	8,81E-138
67	chr18	44559113	44559934	1	28	0,332467	0	7,67E-16
68	chr18	44559120	44559863	3	23	1,111536	0	9,49E-101
69	chr18	44559120	44559903	2	26	0,629124	0	2,99E-29
70	chr18	44559207	44560232	1	32	0,422525	0	3,72E-30
71	chr18	44559231	44560209	2	29	0,330599	0	1,29E-13
72	chr18	44559242	44560187	3	26	0,338725	0	1,01E-15
73	chr18	44559696	44560232	2	17	0,333245	0	2,63E-11
74	chr18	51690933	51692745	1	20	0,441711	0	3,03E-12
75	chr18	52893118	52893314	1	10	0,594457	0	1,01E-16
76	chr18	53254878	53255877	2	21	0	-1,374359	6,57E-145
77	chr18	53255665	53256728	1	17	0,599573	0	2,48E-21
78	chr18	59974141	59974246	1	10	0,656389	0	1,61E-11
79	chr19	51165139	51172653	3	58	0,47547	0	5,20E-52
80	chr2	106014695	106016059	1	12	0,640088	0	1,37E-20
81	chr2	106467479	106468309	1	11	0,465363	0	1,29E-12
82	chr2	145147560	145175929	1	301	0	-0,895855	0
83	chr2	145185647	145185794	1	11	0,43316	0	4,33E-11
84	chr2	149228112	149228297	1	10	0,714576	0	1,07E-13
85	chr2	165946352	165946724	3	27	0,434927	0	1,78E-18
86	chr2	165946352	165946738	2	28	0,443198	0	4,34E-25
87	chr2	165946352	165946999	1	53	0,33024	0	1,29E-22
88	chr2	165946443	165946830	2	31	0,36964	0	9,06E-16
89	chr2	166043003	166043443	1	22	0,39881	0	6,11E-11
90	chr2	166043101	166043220	3	11	0,506487	0	5,61E-14
91	chr2	166043101	166043302	2	17	0,429025	0	1,24E-13
92	chr2	172338123	172338390	1	19	0,440892	0	4,54E-21
93	chr2	172338130	172338398	1	19	0,414327	0	1,67E-17
94	chr2	172338137	172338655	1	31	0,315683	0	9,80E-16
95	chr2	172338148	172338597	3	24	0,392196	0	1,07E-17
96	chr2	172338227	172338642	2	21	0,64193	0	1,25E-21
97	chr2	172340391	172340562	1	15	0	-0,984377	9,16E-25
98	chr2	172340492	172343556	2	38	0,332807	0	5,44E-13
99	chr2	175425337	175425554	2	13	0,488834	0	8,85E-13
100	chr2	175425337	175425592	1	17	0,344943	0	1,77E-11
101	chr2	175436365	175437045	1	23	0,375816	0	1,83E-14
102	chr2	208461565	208461854	1	14	0,363608	0	1,67E-12
103	chr2	208462792	208463228	1	17	0,390694	0	4,36E-11
104	chr2	239970966	239971698	2	38	0,926683	0	1,44E-62
105	chr2	240055700	240056456	3	12	0,577251	0	5,42E-24
106	chr22	19745926	19749476	3	16	0,481588	0	3,10E-21
107	chr22	19751561	19756014	3	37	0	-0,601912	2,22E-16
108	chr22	22114726	22115080	2	20	0,34169	0	5,58E-16
109	chr22	22116898	22117210	2	14	0,36121	0	2,33E-11
110	chr22	23654337	23659453	2	36	0,526743	0	1,18E-10
111	chr22	41487420	41489187	2	18	0	-0,985123	2,75E-39
112	chr22	41525843	41526065	3	12	0,39796	0	1,50E-12
113	chr3	45634677	45636494	3	13	0	-0,669246	1,21E-22
114	chr3	51273563	51273911	2	10	0,44805	0	2,41E-12
115	chr3	51378716	51378843	3	10	0	-0,698906	1,02E-18

166 CNV dans des régions exoniques d'un des 435 gènes DI

116	chr3	51418350	51418960	2	25	0	-0,612711	3,22E-45
117	chr4	31146063	31146396	1	14	0,44345	0	1,43E-12
118	chr4	31148175	31148437	1	16	0,366809	0	6,13E-11
119	chr4	56883554	56883997	1	18	0,386406	0	2,58E-14
120	chr4	82376033	82376258	1	10	0,681381	0	3,57E-10
121	chr4	82392474	82393940	1	10	0,81022	0	1,24E-25
122	chr5	6631912	6632136	1	12	0,426932	0	5,03E-15
123	chr5	36976370	36976976	1	10	0,612493	0	2,08E-11
124	chr5	58266452	58267807	1	50	0,302912	0	4,44E-19
125	chr5	58287735	58287884	2	11	0,554041	0	1,54E-15
126	chr5	58287735	58287884	2	11	0,448133	0	1,44E-10
127	chr5	58335067	58336619	2	16	0	-0,818181	2,03E-44
128	chr5	58335067	58336716	1	17	0	-0,785687	2,41E-44
129	chr5	140431903	140432087	1	10	0,689048	0	1,75E-16
130	chr5	149900185	149901260	3	27	0,403143	0	1,87E-28
131	chr5	178403611	178405459	3	13	0	-0,707581	1,63E-14
132	chr6	33986481	33990162	3	32	0,350599	0	1,19E-15
133	chr6	34023304	34024354	3	11	0	-0,796854	1,25E-23
134	chr6	34023547	34024408	3	10	0,482136	0	1,11E-12
135	chr6	114269703	114270191	1	16	0,448453	0	2,34E-10
136	chr6	114270052	114270191	3	12	0,503822	0	7,11E-14
137	chr6	124433051	124471695	1	147	0,630963	0	1,40E-124
138	chr6	133776639	133777728	1	11	0,581089	0	7,91E-12
139	chr6	146625838	146625942	1	10	0,487817	0	6,96E-12
140	chr6	146757156	146757708	1	20	0,393752	0	1,71E-14
141	chr6	146757170	146757690	2	17	0,376321	0	2,23E-10
142	chr6	157256617	157256766	1	10	0	-0,688264	1,98E-14
143	chr7	75353997	75372797	2	118	0,39795	0	1,39E-94
144	chr7	75367863	75370231	3	10	0,398762	0	5,78E-11
145	chr7	77648228	77648523	1	10	0,377466	0	4,68E-11
146	chr7	77708266	77708419	1	13	0,422723	0	1,88E-12
147	chr7	78150781	78154785	1	29	0,338207	0	1,27E-12
148	chr7	96633627	96636951	1	16	0	-0,727297	5,59E-21
149	chr7	143000925	143001777	1	10	0,491204	0	1,69E-13
150	chr8	77776908	77777269	1	13	0,505946	0	1,39E-13
151	chr8	140743764	140745574	2	22	0,549626	0	1,01E-26
152	chr8	141284629	141285851	2	11	0,309752	0	1,98E-12
153	chr8	141460907	141461089	2	12	0,345371	0	3,93E-13
154	chr9	214827	215581	1	17	0,426185	0	1,64E-14
155	chr9	215226	215586	1	17	0,450718	0	2,37E-14
156	chr9	215581	215789	1	11	0	-0,788529	5,49E-14
157	chr9	268159	472145	1	1 382	0,49111	0	0
158	chr9	110251190	110257646	2	31	0	-0,697622	2,35E-19
159	chr9	123249580	123249755	2	10	0,749159	0	1,96E-12
160	chr9	123253493	123253870	2	18	0,316807	0	1,75E-10
161	chr9	123253616	123253776	3	15	0,382834	0	1,99E-13
162	chr9	130454082	130454397	3	12	0,328155	0	2,20E-17
163	chr9	133911466	133911752	3	10	0,72569	0	4,98E-28
164	chr9	140725903	140730119	3	50	0,306673	0	8,52E-24
165	chrX	6144067	6145438	3	11	0	-0,963887	8,46E-33
166	chrX	47307041	47308478	3	24	0,312509	0	2,67E-14

ANNEXE 8

28 délétions exoniques

	chr	start	stop	réurrence	nb sondes	Log2ratio délétion	p value
1	chr1	197114518	197115824	1	27	-0,723433	2,16E-47
2	chr1	241518910	241522090	1	17	-0,663868	5,18E-16
3	chr1	245026031	245028113	3	11	-0,918233	1,88E-34
4	chr10	84712282	84717217	1	29	-0,970426	3,76E-105
5	chr11	88242022	88243239	3	24	-0,999674	1,78E-98
6	chr13	26043206	26044260	2	11	-0,672485	2,64E-13
7	chr14	21899065	21899359	3	12	-0,721779	3,05E-16
8	chr15	22756650	23208901	1	531	-0,821627	0
9	chr15	101110128	101110289	3	12	-0,63669	9,45E-22
10	chr17	43972592	43974524	3	31	-0,718227	2,06E-53
11	chr17	80038396	80058648	3	196	-0,621229	8,81E-138
12	chr18	53254878	53255877	2	21	-1,374359	6,57E-145
13	chr2	145147560	145175929	1	301	-0,895855	0
14	chr2	172340391	172340562	1	15	-0,984377	9,16E-25
15	chr22	19751561	19756014	3	37	-0,601912	2,22E-16
16	chr22	41487420	41489187	2	18	-0,985123	2,75E-39
17	chr3	45634677	45636494	3	13	-0,669246	1,21E-22
18	chr3	51378716	51378843	3	10	-0,698906	1,02E-18
19	chr3	51418350	51418960	2	25	-0,612711	3,22E-45
20	chr5	58335067	58336619	2	16	-0,818181	2,03E-44
21	chr5	58335067	58336716	1	17	-0,785687	2,41E-44
22	chr5	178403611	178405459	3	13	-0,707581	1,63E-14
23	chr6	34023304	34024354	3	11	-0,796854	1,25E-23
24	chr6	157256617	157256766	1	10	-0,688264	1,98E-14
25	chr7	96633627	96636951	1	16	-0,727297	5,59E-21
26	chr9	215581	215789	1	11	-0,788529	5,49E-14
27	chr9	110251190	110257646	2	31	-0,697622	2,35E-19
28	chrX	6144067	6145438	3	11	-0,963887	8,46E-33

ANNEXE 9

RUNX1T1, a chromatin repression protein, is a candidate gene for autosomal dominant intellectual disability

Minh Tuan Huynh,¹ Mylène Béri-Dexheimer,¹ Céline Bonnet,¹ Myriam Bronner,¹ Asma Ali Khan,¹ Lila Allou,¹ Christophe Philippe,¹ Jacqueline Vigneron,² and Philippe Jonveaux^{1*}

¹Laboratoire de Génétique, EA4368, Nancy Université, CHU Nancy, France

²Service de Néonatalogie-Génétique, Maternité Régionale Universitaire, Nancy, France

Manuscript Received: 29 November 2011; Manuscript Accepted: 4 March 2012

TO THE EDITOR:

Intellectual disability (ID) is a variable and heterogeneous manifestation of central nervous system dysfunction, affecting 2–3% of the Western population [Raymond, 2010]. Although several genes have been shown to be mutated in patients with ID, only a small number of mutated autosomal genes have been identified thus far. Balanced *de novo* chromosomal translocations in patients with ID are a valuable resource in the search for genes causally related to disease. Recently, the *RUNX1T1* gene at 8q21.3 was found to be disrupted in a patient with ID with a balanced translocation t(5;8)(q31;q21) [Zhang et al., 2009]. Analysis of *RUNX1T1* expression in human embryonic and fetal tissues has suggested a role in brain development and cognitive impairment [Zhang et al., 2009]. Here, we report on a patient with apparent ID of a mild degree and a *de novo* deletion within the *RUNX1T1* gene establishing defects in this transcription regulator as a likely cause of autosomal dominant mild to moderate ID.

The patient took part in a clinical diagnostic testing for genomic imbalance using array-CGH following initial testing for karyotype (result normal) thanks to the national array-CGH network funded by the French Ministry of Health. This 38-year-old female is the first child of healthy non-related parents. She has a healthy sibling with no reported learning problems. The pregnancy was reported as normal with delivery at term. Growth parameters at birth were normal and congenital malformations were not apparent. No delay in major motor milestones was reported. She had a normal speech development but her learning disability was recognized at the age of 6 years. She was diagnosed with a mild ID but full scale IQ testing was not performed. She attended special education. Non-verbal social interactions were within the normal range. At the age of 38 years, her height was 158 cm (–1 SD), her weight was 69.8 kg (+2 SD), and OFC was 52.5 cm (–1.5 SD). The cardiac physical exam was normal. Only minor facial anomalies such as broad forehead, full eyebrows with mild synophrys, a right protruding ear, and a low posterior hairline were noted (Fig. 1). She was friendly and cooperative with a good participation in daytime activities but parental guidance was mandatory for her practical life. Standard

How to Cite this Article:

Huynh MT, Béri-Dexheimer M, Bonnet C, Bronner M, Khan AA, Allou L, Philippe C, Vigneron J, Jonveaux P. 2012. *RUNX1T1*, a chromatin repression protein, is a candidate gene for autosomal dominant intellectual disability.

Am J Med Genet Part A 189A:1782–1784.

resolution G-banded chromosome analysis and *FMRI* analysis were normal. Blood samples were obtained with informed consent from the proband and her parents. Array-CGH was carried out using 180K-oligonucleotide array (Agilent, Santa Clara, CA) as described [Bonnet et al., 2010]. Quantitative PCR (qPCR) was performed on genomic DNA as described [Bonnet et al., 2010]. Primer sequences from *RUNX1T1* are available upon request. All samples were run in triplicate. The dosage of each amplicon relative to *RPPH1* (Gene ID 85495) (control amplicon) and normalized to control DNA was determined using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [Yuan et al., 2008]. Total RNA was isolated from a blood sample using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). RNA was reverse transcribed according to the manufacturer's protocol (Superscript, Invitrogen). Specific primers spanning from exons 2 to 8 of the *RUNX1T1* gene

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: French Ministry of Health; Grant sponsor: The “Fondation Jérôme Lejeune”.

*Correspondence to:

Philippe Jonveaux, MD, PhD, Laboratoire de Génétique, EA4368, Nancy Université, Centre Hospitalier Universitaire de Nancy, Hôpitaux de Brabois, rue du Morvan, 54511 Vandoeuvre les Nancy, France.

E-mail: p.jonveaux@chu-nancy.fr

Article first published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com): 29 May 2012

DOI 10.1002/ajmg.a.35386



FIG. 1. Front and lateral views of the patient: Features include broad forehead, full eyebrows, low posterior hairline and right protruding ear. Patient consent was obtained for the publication of this figure.

were designed to investigate the deleted transcript (available upon request). RT-PCR products were sequenced using BigDye Termination kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). In addition, the proband was also screened for mutations by direct sequencing of *RUNX1T1* exons amplified using flanking intronic primers (NM_001198633.1) (available upon request). PCR products were sequenced using BigDye Terminator v3.1.

Array-CGH analysis identified a 37.85 kb deletion at 8q21.3 in the proband (Fig. 2): 46,XX,arr 8q21.3(93,079,398 - 93,117,255) × 1, UCSC build 36/hg18. The deleted region included the coding sequence of the *RUNX1T1* gene. This region has not been described as a copy number polymorphism in the database of genomic variants (<http://projects.tcag.ca/variation/?source=hg18>). Except for polymorphic regions, no copy number alterations were observed elsewhere in the genome (data not shown). Quantitative PCR with a set of primers from exons 2 to 8 confirmed that the deleted region included exons 3 to 7, while the parents showed a normal result, suggesting de novo occurrence of the deletion (Supplementary Fig. 1). Sequencing analysis performed on cDNA showed an abnormal transcript with contiguity of exons 2 to 8 without a frame shift (Supplementary Fig. 2). Finally, sequence analysis excluded a point mutation within the coding exons of *RUNX1T1*.

Reporting individuals with ID who share mutations in the same gene supports a causal relationship of mutations in a gene to a disorder. We identified an apparently de novo intragenic deletion in *RUNX1T1* in a patient with apparent mild ID. The previously described patient [Zhang et al., 2009] also presented a mild to moderate ID in addition to minor craniofacial dysmorphism and a ventricular septal defect. A translocation breakpoint was found within intron 1b of the *RUNX1T1* gene, suggesting that the patient's phenotype could be due to *RUNX1T1* haploinsufficiency. Noticeably, some resemblance was noted, both patients had a broad forehead, full eyebrows, and a low posterior hairline. However,

the present patient had a normal cardiac physical examination although echocardiogram has not been performed. According to Zhang et al. [2009], only three patients with ID and isolated 8q21.3q22 deletion have been described, but the exact size of the rearrangements was not precisely determined. Since then, four patients were reported to DECIPHER (2399, 4103, 248172, and 253842) with overlapping submicroscopic deletions of 8q21.3 associated with a more complex phenotype (<https://decipher.sanger.ac.uk>). However, those genomic imbalances were larger than that of the present case (3.6, 11.13, 12.8, and 5.8 Mb, respectively) and involved numerous genes, which hamper a precise genotype–phenotype correlation. *RUNX1T1* encodes a member of the myeloid translocation gene (MTG) family, which mediates multiple complex protein interactions leading to multiprotein networks involving transcriptional corepressors, histone-modifying enzymes, and DNA-binding transcription factors [Koyano-Nakagawa and Kintner, 2005]. *RUNX1T1* is highly expressed during brain development and recent data have suggested that *RUNX1T1* is required for executing specific gene repression programs in brain [Aaker et al., 2010]. The modular structure of wild-type *RUNX1T1* protein is characterized by four evolutionarily conserved domains termed nervy homology regions (NHR1-4) [Davis et al., 2003]. Owing to the present deletion from exons 3 to 7, the expected loss of NHR1 and NHR2 domains of interaction with nuclear corepressors and chromatin-modifying enzymes may impair *RUNX1T1* function as a transcriptional corepressor.

When chromosome rearrangements affect autosomal genes, the associated disorder is generally a dominant rather than recessive form. In the present patient, sequencing analysis excluded a point mutation within the coding exons of *RUNX1T1* in favor of a dominant form of ID. In conclusion, the fact that two patients with ID have truncated copies of *RUNX1T1* is significant, and it is thus very likely that *RUNX1T1* is a valuable candidate to explain the apparent cognitive disorder.

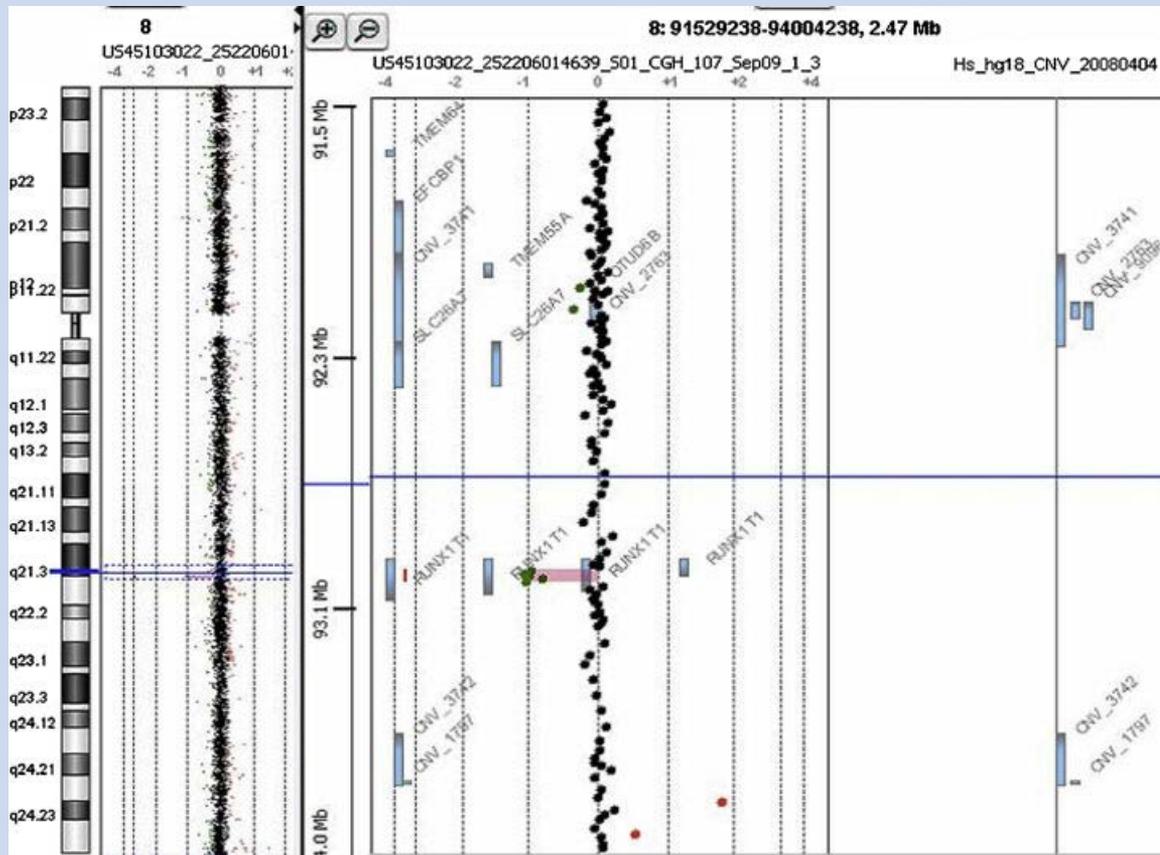


FIG. 2. Array comparative genomic hybridization results, showing the extent of *RUNX1T1* intragenic deletion (five probes).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the patient and her family for their kind cooperation. We thank the cytogenetics and molecular genetics staff at the Nancy University Hospital for their expert technical assistance. This study was supported by grants from the French Ministry of Health and the “Fondation Jérôme Lejeune”.

REFERENCES

- Aaker JD, Patineau AL, Yang HJ, Ewart DT, Nakagawa Y, McLoon SC, Koyano-Nakagawa N. 2010. Interaction of MTG family proteins with NEUROG and ASCL1 in the developing nervous system. *Neurosci Lett* 474:46–51.
- Bonnet C, Andrieux J, Béri-Dexheimer M, Leheup B, Boute O, Manouvrier S, Delobel B, Copin H, Receveur A, Mathieu M, Thiriez G, Le Caignec C, David A, de Blois MC, Malan V, Philippe A, Cormier-Daire V, Colleaux L, Flori E, Dollfus H, Pelletier V, Thauvin-Robinet C, Masurel-Paulet A, Faivre L, Tardieu M, Bahi-Buisson N, Callier P, Mugneret F, Edery P, Jonveaux P, Sanlaville D. 2010. Microdeletion at chromosome 4q21 defines a new emerging syndrome with marked growth restriction and absent or severely delayed speech. *J Med Genet* 47:377–384.
- Davis JN, McGhee L, Meyers S. 2003. The ETO (MTG8) gene family. *Gene* 303:1–10.
- Koyano-Nakagawa N, Kintner C. 2005. The expression and function of MTG/ETO family proteins during neurogenesis. *Dev Biol* 278:22–34.
- Raymond FL. 2010. Monogenic causes of mental retardation. *Genetics of Mental Retardation*. In: Knight SJL, editors: *Monogr Hum Genet Basel*, Karger. 18:89–100.
- Yuan JS, Wang D, Stewart CN Jr. 2008. Statistical methods for efficiency adjusted real-time PCR quantification. *Biotechnol J* 3:112–123.
- Zhang L, Tümer Z, Möllgård K, Barbi G, Rossier E, Bendtsen E, Møller RS, Ullmann R, He J, Papadopoulos N, Tommerup N, Larsen LA. 2009. Characterization of a t(5;8)(q31;q21) translocation in a patient with mental retardation and congenital heart disease: Implications for involvement of *RUNX1T1* in human brain and heart development. *Eur J Hum Genet* 17:1010–1018.

REFERENCES INTERNET

- 1000Genomes

<http://www.1000genomes.org>

- Agilent

<http://www.home.agilent.com>

- Applied biosystem

<http://www.appliedbiosystem.com>

- dbSNP

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>

- Decipher (DatabasE of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans)

<http://decipher.sanger.ac.uk/application/>

- DGV (Database of Genomic Variants)

<http://projects.tcag.ca/variation>

- ECARUCA

<http://www.eucaruca.net>

- ECR Browser

<http://www.ecrbrowser.dcode.org/>

- Ensembl

<http://www.ensembl.org>

- GALAXY

<https://main.g2.bx.psu.edu/>

- GENCODE

<http://www.genecodegenes.org>

- Genecard[®]

<http://www.genecards.org>

- Greenwood Genetics Center

<http://www.ggc.org/xlmr.htm>

- Illumina

<http://www.illumina.com>

- Interagen

<http://www.interagen.fr/home.php>

- NCBI (National Center for Biotechnology Information)

<http://www.ncbi.nlm.gov>

- OMIM (Online Mendelian Inheritance in Human)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>

- Primer3 v.4.0

<http://www.frodo.wi.mit.edu/>

- RefSeq

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>

- Roche life Science

<http://www.454.com>

- Sanger Institute

<http://www.sanger.ac.uk>

- SNP Check3 NGRL (National Genetics Reference Laboratory)

<http://ngrl.manchester.ac.uk/SNPCheckV3/snpcheck.htm>

- UCSC Genome Browser

<http://www.genome.ucsc.edu/>

- VEGA

<http://vega.sanger.ac.uk/index.html>

Apport de l'analyse chromosomique sur différents microréseaux d'ADN dans l'identification de nouvelles mutations et la caractérisation de gènes candidats impliqués dans la déficience intellectuelle

Parmi les causes génétiques à l'origine de la déficience intellectuelle (DI), les variations du nombre de copies (CNV) ou anomalies quantitatives du génome prennent une place de plus en plus importante. Nous avons mis à profit l'utilisation de la technique d'analyse chromosomique sur différents microréseaux d'ADN (ACM 180K et 1M) pour essayer d'identifier de nouvelles mutations et de caractériser des gènes candidats. Notre étude a permis de renforcer l'implication du gène *RUNX1T1* en tant que gène de DI autosomique dominante et d'impliquer le gène *ANKRD11* dans une présentation de l'adulte d'un syndrome KBG. L'interruption, *de novo*, de la structure du gène *KIAA1468* chez un patient et de celle du gène *FABP7* chez un autre patient, a été observé dans le cadre d'encéphalopathies convulsivantes sévères. Nous avons évalué l'implication potentielle de ces gènes dans la survenue de la DI. Nous avons par la suite mis en place et testé une ACM de haute résolution 1M, ciblée sur les gènes connus ou candidats de DI, à partir d'une cohorte de 46 individus atteints de DI idiopathique modérée à sévère. Sur les 45 analyses exploitables, un seul CNV causal a été identifié, une délétion intragénique d'une taille de 28.37 kb du gène *ZEB2* confirmant le diagnostic de syndrome de Mowat-Wilson. Ce résultat (1/45 soit 2,2%) témoigne que pour l'ensemble des gènes de DI connus, les réarrangements de grande taille (exonique) sont des mécanismes mutationnels peu fréquents. Toutefois, des CNV de petites tailles siégeant dans des régions potentiellement régulatrices devront être analysées ultérieurement. Notre travail s'inscrit aussi dans la perspective de la place du séquençage haut débit et de l'importance de la consultation des bases de données dans l'interprétation des variations génomiques et de leur implication en pathologie.

Mots clés : Array CGH, Déficience Intellectuelle, Encéphalopathie épileptique infantile, syndrome de Mowat-Wilson - KBG

Contribution of chromosome analysis on different DNA Microarrays in the identification of novel mutations and characterization of candidate genes involved in intellectual disability

Among genetic causes at the origin of the intellectual disability (ID), copy number variations (CNV) or genomic quantitative abnormalities are increasingly described. We have taken advantage using the technique of chromosome analysis on different DNA Microarrays (CMA 180 K and 1 M) to identify novel mutations and characterize candidate genes. Our study has allowed to strengthen the involvement of the *RUNX1T1* gene as an ID autosomal dominant gene and involve the *ANKRD11* gene in an adult presentation of KBG syndrome. The *de novo* interruption of *KIAA1468* gene and *FABP7* gene was observed respectively in two patients, with severe neurodevelopmental epileptic disorder. We evaluated the potential involvement of these genes in the occurrence of ID. We have implemented and tested an CMA high resolution 1 M, targeted on known or candidate genes for ID from a cohort of 46 individuals with idiopathic moderate to severe ID. On 45 actionable analysis, a single causal CNV has been identified, a 28.37 kb intragenic deletion of the *ZEB2* gene confirming the diagnosis of Mowat-Wilson syndrome. This result (1/45 or 2.2%) shows that for the sets of known ID genes, exonic rearrangements are infrequent mutational events. However, smaller CNV in potentially regulatory regions should be analysed. Our work also fits into the perspective of Next generation Sequencing and the importance of the consultation of databases in the interpretation of genomic variations and their involvement in disease.

Key words : Array CGH, Intellectual Deficiency, Candidate Genes, Infantile epileptic encephalopathy, Mowat-wilson / KBG syndrome