



**HAL**  
open science

# Etude clinique et génétique des anomalies du corps calleux chez le fœtus

Caroline Alby-Averseng

► **To cite this version:**

Caroline Alby-Averseng. Etude clinique et génétique des anomalies du corps calleux chez le fœtus. Médecine humaine et pathologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2015. Français. NNT : 2015US-PCB002 . tel-01627568

**HAL Id: tel-01627568**

**<https://theses.hal.science/tel-01627568v1>**

Submitted on 2 Nov 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# Université Paris Descartes

Ecole Doctorale : BioSorbonne Paris Cité

U1163 Génétique et embryologie des malformations congénitales

## Etude clinique et génétique des anomalies du corps calleux chez le fœtus

Par Caroline Alby-Averseng

Thèse de doctorat de Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Génétique moléculaire des maladies du développement

Dirigée par Pr Tania Attié-Bitach

Présentée et soutenue publiquement le 16 octobre 2015

Devant un jury composé de

Professeur Michel Vekemans	Président
Docteur Sonia Garel	Rapporteur
Professeur Damien Sanlaville	Rapporteur
Professeur Sylvie Odent	Examinateur
Professeur Laurent Salomon	Examinateur
Professeur Jean-Marie Jouannic	Examinateur
Professeur Tania Attié-Bitach	Directeur de thèse



**Résumé (français) :**

Le corps calleux (CC) est la principale commissure cérébrale connectant les aires corticales homologues des deux hémisphères chez les vertébrés placentaires. Les malformations du corps calleux (MCC) représentent la malformation cérébrale la plus fréquente à la naissance et sont présentes chez 5% des individus avec anomalie neuro-développementale. Une meilleure connaissance de l'ontogenèse du corps calleux et de ses causes génétiques devrait permettre d'ouvrir la voie à des corrélations cliniques pour un meilleur conseil génétique. Cet aspect constitue probablement l'enjeu de la prochaine décennie concernant les fœtus avec MCC.

Le travail de thèse a porté sur 138 fœtus avec MCC, pour lesquels nous avons fait un examen foeto-neuropathologique et une classification en plusieurs catégories.

Au total, ce travail a permis : 1/le démantèlement des causes génétiques des MCC par une triple approche de CGH array, d'exome en trio et de panels ciblés, avec une augmentation considérable des causes identifiables de MCC au sein de cette cohorte, 2/ l'identification et la caractérisation fonctionnelle d'un nouveau gène de ciliopathie dans un phénotype extrême ; 3/ l'identification de 3 nouvelles mutations de *ZBTB20*, récemment identifié comme responsable du syndrome de Primrose, démontrant que ce syndrome est une cause fréquente de MCC et permettant une description clinico-radiologique plus précise. 4/ L'identification de plusieurs gènes candidats en cours de validation.

**Mots clés (français) :**

Génétique, corps calleux, *KIAA0586*, syndrome hydrolethalus, côtes-courtes polydactylie type II et IV, voie sonic hedgehog, foetopathologie.

**Résumé (anglais) :**

**Title :**

Clinical and genetic analysis of corpus callosum anomalies in fetuses

**Abstract :**

Corpus callosum is the main cerebral commissure connecting homologous cortical areas in placental mammals. Malformations of corpus callosum (MCC) are the most frequent brain malformation at birth and are present in 5% of patients with neurodevelopmental delay. A good knowledge of genetics of corpus callosum development should pave the way to better clinical correlations for a more accurate genetic counselling. This is the challenge of the next decade.

This thesis concerns a cohort of 138 fetuses with MCCs, well classified on neuropathological examination. It allowed 1/ to unravel the genetic causes of MCC through a triple approach combining CGH array, whole exome and NGS panels sequencing, with a considerable increase in the number of causes of MCC identified ; 2/ identification of a new gene in an extreme ciliopathy phenotype; and 3/ identification of novel *ZBTB20* mutations , a gene recently identified as responsible for Primrose syndrome, showing that this syndrome is frequent among MCCs and allowing a precise clinico-radiological description of the syndrome. 4/ Several new candidate genes are under study.

**Keywords :**

Genetics, ciliopathies, corpus callosum, *KIAA0586*, hydrolethalus syndrome, short ribs polydactyly type II and type IV, sonic hedgehog pathway, fetalpathology.



*A Pierre, Clémence, Mathilde et Benjamin*

« Tout ce que je sais c'est que je ne sais rien » Socrate

« Qui n'a jamais commis d'erreurs n'a jamais tenté d'innover » Albert Einstein

« Le hasard ne sourit qu'aux esprits bien préparés » Louis Pasteur

## REMERCIEMENTS

**Au Pr Tania Attié-Bitach**, merci pour la confiance que tu m'as accordée et le soutien dont tu as fait preuve pendant cette aventure. Ton impressionnante capacité de travail, ta générosité, ta volonté de transmettre sont un bonheur. Merci. Sois assurée de ma reconnaissance, ma gratitude et mon profond respect.

**Au Pr Alain Fischer**, merci pour votre accueil dans l'Institut Imagine. Soyez assuré de ma reconnaissance.

**Au Pr Arnold Munnich**, merci pour vos lumineuses idées, votre accueil et vos conseils avisés. Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance, ma gratitude et mon profond respect.

**Au Pr Stanislas Lyonnet**, merci pour ta capacité de donner confiance en soi aux personnes que tu rencontres, et ton goût de l'action. Je tiens à t'exprimer toute ma reconnaissance, ma gratitude et mon profond respect.

**Au Pr V. Cormier-Daire**, merci pour ta générosité et ta clairvoyance. Je tiens à t'exprimer toute ma reconnaissance, ma gratitude et mon profond respect.

**Au Pr M. Vekemans**, merci pour votre accueil dans l'unité d'histologie, cytogénétique et foetopathologie. Soyez assuré de ma reconnaissance, ma gratitude et mon profond respect.

**Au Dr Sophie Thomas**, merci pour ton courage, ton énergie, ta réactivité et tout ce que tu m'as appris.

**Au Dr Ferechte Razavi**, merci pour la transmission de tes connaissances et l'intérêt porté à ce sujet.

**Aux Dr Sophie Saunier, Christine Boyle, Patrick Nitschke, et vos équipes**. Merci pour votre forte contribution à ce travail.

**Au Pr Jeanne Amiel**, tu m'as permis d'affronter les difficultés avec combativité. Merci. Sois assurée de ma reconnaissance.

**Au Pr Françoise Clerget, au Pr Laurent Abel, aux docteurs Laurence Colleaux, Marlène Rio, Céline Huber, Valérie Malan, Mathilde Nizon**: merci pour votre générosité, le temps et l'aide que vous m'avez accordés.

**A toutes les personnes merveilleuses rencontrées pendant ces années de thèse :**

César, Lucile et Alexis, merci pour votre joie sans condition. Isabelle de l'œil, et Anne ma co-thésarde, merci pour votre écoute attentive et bienveillante. Anna, merci pour ton humilité, ta constance et ton oreille attentive. Kevin, merci pour ta gaité et ton calme. Mara et Nadia, merci pour votre aide précieuse. Le rêve à la française, comme tu dis Mara, et bientôt à l'européenne tu verras, est réalisé. Pourvu que cela soit le cas pour beaucoup d'autres personnes par la suite. Xav, Lucas et Chris, merci pour vos tentatives de me faire reprendre le sport et votre énergie positive. Yi, merci pour nos échanges, le poème, et mes petites Madeleines de Proust que tu as fait revivre en moi. Toutes les équipes du 4°, merci pour votre bonne humeur, vos échanges de sourires et d'entraide.

**A tous les membres de l'équipe d'embryo, des MOUX, du diag et de cytogénétique moléculaire**, merci pour votre accueil et votre aide. Nadia, merci pour ta patience pour ma formation initiale de laboratoire. Catherine Ozilou et Amale, Judite, merci pour le temps que vous avez consacré à ce projet.

Aux Pr Dumez, Pr Ville et Pr Salomon, à Nathalie Boddaert, Pascale Sonigo et AE Millischer, à Mari Angela Marangoni, sans qui ce travail n'aurait pas pu être lancé. Soyez assurés de ma reconnaissance.

**A mes proches :**

Olivier,

Sans ton aide constante et ta compréhension, mes efforts n'auraient pas prospéré. Ta présence inconditionnelle m'a permis pendant toutes ces années de me concentrer sur mes projets professionnels. Merci.

Pierre, Clémence, Mathilde, et Benjamin, quelle joie de vous voir grandir! Vous êtes mes soleils. Merci.

Papa, maman. Merci pour tout l'amour que vous m'avez donné.

Jean-Pierre, Madou, Jacky, Nanou et Dady, merci pour tout ce que vous m'avez transmis.

Eric et Angela, Lolo et Emilie, Barbara et Benoit, mes chers neveux et nièces, Caro, Lionel, Nicolas, Nathalie, Louis, Iker, Imanol. Que ferais-je sans chacun d'entre vous ? C'est à chaque fois une joie de vous voir. Merci

Marie Christine, Anne, Marie, José, Bilou, Didier : merci pour vos chaleureuses pensées et votre aide si précieuse.

Suzanne, merci pour ta curiosité, ton intuition, ton intelligence.

Les Whowho, et en particulier Michel. Quand tu m'as tenue dans tes bras le jour de ta thèse et de mes quelques jours, tu m'as certainement transmis un petit quelque chose qui m'a menée vers cette aventure professionnelle. Merci.

Théo et Henri, je vous souhaite le meilleur sur cette route merveilleuse de la médecine. Merci.

A toutes les nounous, vous qui avez pris soin de Pierre Clémence Mathilde et Benjamin : Chantal, Carolina, Anna Maria, notre bonne étoile Déborah, Joanna, Géraldine, Salomé, Guillaume, Ida, Camélia, Madeleine. Sans vous ce travail n'aurait pas été possible. Merci.

A mes amis qui se reconnaîtront, et mes cousins. A tous les enfants que mes regards croisent de près ou de loin. Merci.

A Aspasia, Michèle, Arlette, madame Fride. Sans vous je ne serais pas là où je suis aujourd'hui. Merci.

## TABLE DES MATIERES

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>5</b>
<b>TABLE DES MATIERES.....</b>	<b>8</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS : FIGURES .....</b>	<b>10</b>
<b>TABLEAU DES ILLUSTRATIONS : TABLEAUX.....</b>	<b>11</b>
<b>ABBREVIATIONS.....</b>	<b>12</b>
<b>I. INTRODUCTION.....</b>	<b>15</b>
<b>1. LE CORPS CALLEUX .....</b>	<b>15</b>
1.1. Structure du corps calleux .....	15
1.2. Fonction du corps calleux.....	17
1.3. Mise en place du corps calleux au cours du développement.....	18
1.4. Commissures et évolution .....	26
<b>2. MALFORMATIONS DU CORPS CALLEUX.....</b>	<b>27</b>
2.1. Définition-prévalence .....	27
2.2. Causes des MCC .....	27
2.3. Pronostic neurodéveloppemental .....	33
2.4. Diagnostic prénatal.....	34
<b>3. LE CIL .....</b>	<b>34</b>
3.1. Cil primaire et cils mobiles .....	34
3.2. Ciliogenèse .....	36
3.3. Voies de signalisation du cil.....	41
<b>4. CILIOPATHIES .....</b>	<b>47</b>
4.1. Les ciliopathies avec atteinte squelettique .....	48
4.2. Les syndromes orofaciodigitaux .....	50
4.3. Syndromes hydrolethalus et acrocalleux .....	51
4.4. Syndrome de Joubert et Meckel .....	52
4.5. Nephronophtise et apparentés .....	53
4.6. Syndrome de Bardet-Biedl et apparentés .....	53
4.7. Chevauchement phénotypique et génétique entre les ciliopathies .....	54
<b>5. OBJECTIFS .....</b>	<b>56</b>
<b>II. MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>57</b>
<b>1. COHORTE .....</b>	<b>57</b>
<b>2. METHODES.....</b>	<b>58</b>
2.1. CGH array .....	58
2.2. Séquençage haut débit .....	59
2.3. Génotypage par microsatellites .....	64
2.4. Culture cellulaire .....	65
2.5. RT-PCR en temps réel.....	65
2.6. Immunocytochimie.....	66
2.7. Western-blot .....	66
<b>III. RESULTATS.....</b>	<b>67</b>
<b>1. ETUDE DE LA COHORTE PAR CGH ARRAY [Alby et al, BDRA soumis] .....</b>	<b>67</b>
1.1. Etude clinique de la cohorte .....	67
1.2. Séquençage ciblé et CGH array- diagnostics .....	67
1.3. Conclusion/perspectives .....	68
<b>2. ETUDE PAR PANEL CIBLE « CILIOME » : IDENTIFICATION D’UN NOUVEAU GENE <i>KIAA0586</i> [Alby et al., AJHG, 2015] .....</b>	<b>70</b>
2.1. Phénotypes des individus atteints.....	70
2.2. Ciliome/résultats.....	72

2.3.	Effet fondateur.....	72
2.4.	Etude fonctionnelle.....	73
2.5.	Conclusion.....	73
<b>3.</b>	<b>ETUDE PANEL CIBLE « CALLOSOME ».....</b>	<b>74</b>
3.1.	Résultats globaux .....	74
3.2.	Diagnostics .....	74
3.3.	Gènes candidats .....	78
<b>4.</b>	<b>ETUDE EN TRIO ou QUATUOR PAR WES (WHOLE EXOME SEQUENCING) .....</b>	<b>83</b>
4.1.	Diagnostics .....	83
4.2.	Gènes candidats .....	85
<b>5.</b>	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>88</b>
<b>IV.</b>	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>92</b>
<b>1.</b>	<b>Rôle du cil primaire dans le développement cérébral.....</b>	<b>92</b>
<b>2.</b>	<b>Hétérogénéité génétique des MCD .....</b>	<b>94</b>
2.1.	Microcéphalies primaires .....	94
2.2.	Troubles de migration neuronale.....	97
<b>3.</b>	<b>Réponse aux phénocopies .....</b>	<b>98</b>
<b>4.</b>	<b>Variabilité d'expression.....</b>	<b>98</b>
<b>5.</b>	<b>Avantages et limites du NGS.....</b>	<b>101</b>
5.1.	Historique : du Sanger au NGS .....	101
5.2.	Genome versus exome versus panels .....	101
<b>6.</b>	<b>Cil et réparation de l'ADN .....</b>	<b>103</b>
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONS ET PERPECTIVES.....</b>	<b>104</b>
<b>ANNEXE 1.....</b>		<b>107</b>
<b>ANNEXE 2.....</b>		<b>113</b>
<b>ANNEXE 3.....</b>		<b>140</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>		<b>158</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS : FIGURES

Figure 1 Coupe sagittale du corps calleux .....	15
Figure 2 Topographie probabiliste du corps calleux.....	16
Figure 3 Organisation générale du développement cérébral chez les vertébrés .....	18
Figure 4 Développement néo cortical .....	20
Figure 5 Modèles de migration neuronale corticale .....	21
Figure 6 Spécification moléculaire de la plaque commissurale.....	22
Figure 7 Architecture cellulaire de la ligne médiane télencéphalique et du développement calleux .....	24
Figure 8 Représentation schématique de la migration et de l'organisation en couches des neurones néocorticaux comparée aux neurones CA1 hippocampiques.....	25
Figure 9 Conservation du système commissural chez les vertébrés adultes.....	26
Figure 10 Mode d'hérédité des gènes responsables de syndromes avec MCC .....	32
Figure 11 Résumé des facteurs régulant l'assemblage et le démontage du cil.....	37
Figure 12 Modèle de la fonction de Cep164 pendant la ciliogenèse .....	38
Figure 13 Le cycle GTPase.....	39
Figure 14 Modèle résumant les rôles de Talpid3 et/ou Cep290 pendant la ciliogenèse.....	40
Figure 15 Transduction du signal de la voie <i>Shh</i> chez les mammifères .....	41
Figure 16 Morphogène Shh dans le cerveau des vertébrés.....	42
Figure 17 Bourgeon de croissance des membres.....	43
Figure 18 Phénotype cérébral et des membres chez les mutants de la voie <i>Shh</i> et du cil primaire.....	44
Figure 19 Schéma de la voie Wnt.....	46
Figure 20 Voies de signalisation Hedgehog et Wnt dans le développement des reins, des membres et du cerveau.....	47
Figure 21 Hybridation spécifique en phase liquide .....	61
Figure 22 Mutations de <i>SPTAN1</i> et domaines protéiques de la spectrine alpha-II.....	77
Figure 23 RT-PCR à partir de l'ARN extrait de poumon du fœtus porteur de la mutation homozygote dans <i>mTOR</i> et d'un témoin de même terme .....	79
Figure 24 : Schéma du rôle de FARP2 dans l'initiation de la voie de signalisation Sema3A-PlexinA1 .....	87
Figure 25 Nombre en pourcentage et moyens des diagnostics réalisés dans la cohorte de MCC fœtal .....	88
Figure 26 : Organigramme des diagnostics de la cohorte foetale.....	89
Figure 27 Etiologies retrouvées en fonction du phénotype foeto/neuropathologique .....	90

## TABLEAU DES ILLUSTRATIONS : TABLEAUX

Table 1 : Réarrangements chromosomiques avec une malformation du corps calleux comme signe possible. D'après Schell-Apacik et al. (24). .....	29
Table 2 : Syndromes génétiques complexes associés à des anomalies du corps calleux .....	30
Table 3 : Ciliopathies avec dysplasie squelettique .....	49
Table 4 : syndromes oro-facio-digitaux .....	51
Table 5 : Chevauchement phénotypique des ciliopathies .....	54
Table 6 : Chevauchement génétique des ciliopathies .....	55
Table 7 : Amorces des gènes <i>GLII</i> , <i>PTCHI</i> et <i>GAPDH</i> utilisées pour la real time RT-PCR. 65	65
Table 8 : Les deux syndromes les plus fréquemment diagnostiqués dans la cohorte .....	74
Table 9 : Autres diagnostics réalisés par callosome .....	78
Table 10 : Génotypage du cas index et des parents .....	80
Table 11 : Diagnostics faits par exome .....	84
Table 12 : Gènes candidats pointés par exome .....	85
Table 13 : Gènes responsables de microcéphalies primaires/ syndrome de Seckel .....	95



**ABBREVIATIONS**

ADN	Acide désoxyribonucléique
3V	3° ventricule
AC	Anterior commissure
ACC	Agénésie du corps calleux
ACLS	Acrocallosal syndrome
AHI1	Abelson helper integration site 1
ANR	anterior neural ridge
ARL	ADP-ribosylation factor like 13B
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ATXN	Ataxin
B9D1	B9 protein domain
BAF	BRG1 associated complex
BBS	Bardet Biedl Syndrome
bcl2	B-cell lymphoma 2
BMP	Bone morphogenic protein
C2CD3	C2 calcium-dependant domain-containing protein3
C2ORF	chromosome 2 open-reading frame
Cb	cerebellum
CC	Corps calleux
CC2D2A	coiled-coil and C2 domain containing 2A
CCP	Côtes courtes polydactylie
ccv	capped ciliary vesicle
CE	Convergence extension
CEP/cep	Centrosomal protein
CGH array	Hybridation génomique comparative
Cib	commissura interbulbaris
CNV	Copy number variant
COACH	Hypoplasie du vermis Cérébelleux, Oligophrénie, Ataxie cérébelleuse, Colobome, fibro
CP	cortical plate
cp	commissure postérieure
cpal	commissure palliale
cv	ciliary vesicle
dbSNP	Single Nucleotid Polymorphism Database
DCC	Dysmorphie du corps calleux
DDX59	dead box polypeptide 59
dHand	Deciduum, heart, autonomic nervous system, neural crest derived
DK	dysplasie kystique
DLX2	distal-less homeobox2
DR	Dysrtrophie Rétinienne
dti	diffusion tensor images
Dv	Dishevelled
DYNC2H1	Dynein, cytoplasmic2, heavy chain 1
E	Embryonic day

EIEE5	Encéphalopathie épileptique infantile précoce de type 5
EVC	Ellis Van Creveld
FGF	Fibroblast growth factor
Fz	Frizzled
GBX2	gastrulation brain homeobox
GLI	Glioma associated oncogen homolog
Gli	Glioma associated oncogen homolog
GLIA	Forme activatrice de Gli
GLIR	Forme répressive de Gli
GLIS2	glis family zinc finger protein 2
GTPase	Guanine triphosphate hydrolase
HAS	haute autorité de santé
HARDI	High Angular Resolution Diffusion Imaging
hbc	habenular commissure
hc	hippocampal commissure
HCC	Hypoplasie du corps calleux
HH	Hedgehog
HLS	syndrome hydrolethalus (ou locus)
hox	homeobox
HP	hippocampal plate
htz	hétérozygote
IFT	intraflagellar transport
IMG	interruption médicale de grossesse
INPP5E	inositol polyphosphate-5-phosphatase
INVS	inversin
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
IRX3	iroquois homeobox protein 3
IsO	organisateur isthmique
isoc	isocortex
IZ	intermediated zone
J	jours post fécondation
JBTS	syndrome de Joubert (ou locus)
Jnk	c-Jun N-terminal kinase
kif7	kinesin family member
KIF7	Kinesin family member
LCA	Leber congenital amaurose
LEF	lymphoid-enhancer-binding factor
MARK4	microtubule affinity-regulating kinase 4
MAZ	multipolar cell accumulation zone
MCC	Malformation du corps calleux
MCD	Malformation of cortical development
MKS	syndrome de Meckel (ou locus)
MZ	marginal zone
NCBI	National Centre for Biotechnology Information
NEK8	never in mitose gene A-related kinase 8
NGS	Next generation sequencing
NMD	Nonsens mediated decay

NPHP	Néphronophtise
OB	olfactory bulb
oc	optic chiasm
OFD	Oro-facio-digital
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PCP	planar cell polarity
pcv	primary ciliary vesicle
pdgfralpha	platelet derived growth factor receptor
poc	post optic commissure
PP	preplate
Ptch1	Patched 1
RCIU	retard de croissance intra utérin
Rho	Ras homolog gene family
Rock	Rho associated coiled-coil containing protein kinase 1
RP	rétinite pigmentaire
RPGRIP1L	Retinis Pigmentosa GTPase Regulator Interacting Protein 1-like protein
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SA	Semaines d'Aménorrhée
SCLT1	sodium channel and clathrin linker 1
SHH	sonic Hedgehog
SIFT	Scale-invariant feature transform
siRNA	small interfering Ribonucleic acid
SLM	stratum lacunosum-moleculare
Smo	Smoothened
SNP	single nucleotid polymorphism
SO	stratum oriens
SP	stratum pyramidale
SPTAN1	Spectrine non-érythroïde, sous-unité alpha 1
SR	stratum radiatum
SUFU	Suppressor of fused
SWI/SNF	Switch Sucrose Non Fermentable
TCF	T cell transcription factor
TCTN	Tectonic
tel	télencéphale
th	thalamus
tm	tectum mesenphali
TMEM	trans membrane proteine
TTBK2	Tau tubulin kinase 2
VZ	ventricular zone
WDPCP	WD repeat-containing planar cell polarity effector
WM	white matter
WNT	Wingless integration site
ZLI	zona limitans interthalamica
ZPA	zone of polarising activity

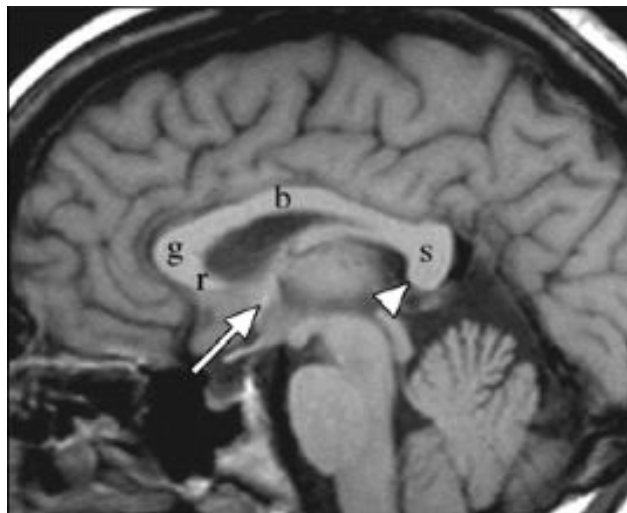
# I. INTRODUCTION

## 1. LE CORPS CALLEUX

Le corps calleux (CC) est un grand paquet de fibres qui font communiquer les aires corticales homologues des deux hémisphères cérébraux, permettant un dialogue entre cerveau droit et cerveau gauche.

### 1.1. Structure du corps calleux

Le corps calleux est constitué d'environ 200 millions d'axones. Il est appelé ainsi du fait de sa consistance compacte. Il est divisé en quatre segments anatomiques : de l'avant vers l'arrière, respectivement le rostrum, le genou, le corps et le splénium (Figure 1), avec de subtiles différences entre gauchers et droitiers et en fonction du sexe (1). On appelle le CC antérieur l'ensemble rostrum, genou et corps (2). Il contient les fibres frontales. Le genou constitue le forceps mineur. L'isthme correspond à un rétrécissement et se trouve à l'endroit où le fornix rejoint le corps calleux. Il reçoit les fibres rolandiques. Enfin le splénium reçoit les fibres pariétales, occipitales et temporales médiales, ainsi que les fibres subiculaires (le subiculum est une zone de transition entre les six couches du neocortex et l'archicortex, en prolongement du CA1) et para hippocampiques. Il constitue le forceps majeur et se termine au niveau du plancher du troisième ventricule. Sous le splénium se trouve la commissure hippocampique. Au-dessus du CC se trouve l'indusium griseum, constitué de cortex vestigial.

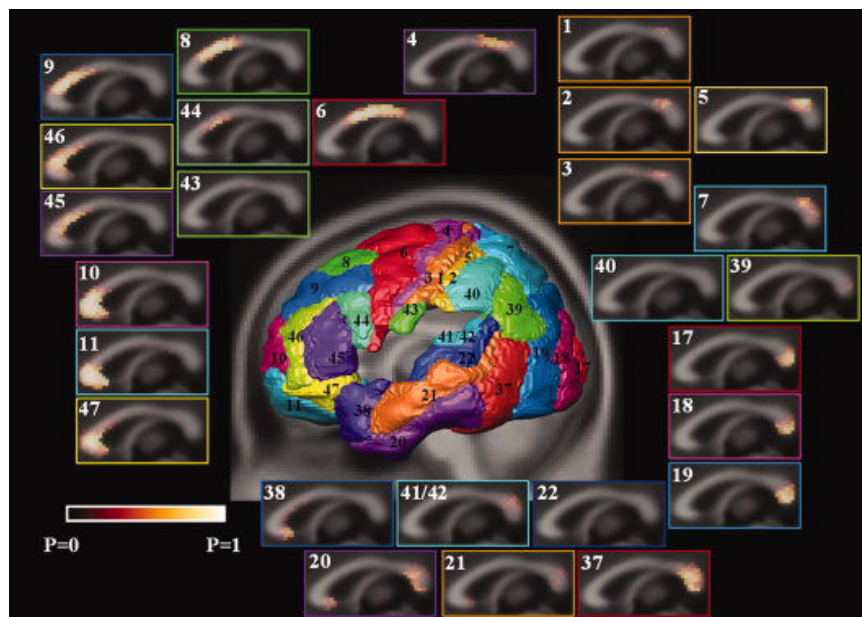


**Figure 1 Coupe sagittale du corps calleux**

IRM cérébrale-T1-coupe sagittale montrant les commissures cérébrales dont le corps calleux avec son rostrum (r), genou (g), corps (b=body) et son splénium (s). La flèche montre la commissure antérieure et la tête de flèche montre la commissure hippocampique. D'après Hetts et al. (3)

Grâce aux progrès de l'imagerie, et en particulier de l'IRM et de la tractographie, avec reconstruction HARDI, la microstructure de la substance blanche peut être explorée de manière non invasive (4). Ainsi, la structure fine du corps calleux a pu être établie (5): son organisation dorso-ventrale suit la position médio-latérale des corps cellulaires correspondants. La cible contro- latérale est atteinte surtout en période post natale, avec une arborisation dans l'ère primaire et dans l'aire secondaire correspondante. Ce ciblage peut être modulé en post natal comme l'ont montré des expériences de lésions thalamiques induites; donc pendant une période critique par une modification des afférences de signaux visuels par exemple. Chez des témoins, les études par tractographie montrent que les fibres de substance blanche passant par le corps calleux relient les aires corticales homologues de manière homotopique. Ces connections sont organisées le long de l'axe antéro-postérieur. Il n'y a pas de connections hétérotopiques larges. Chaque partie du corps calleux chez les individus normaux peut être directement liée à sa connectivité corticale car chaque région du corps calleux est organisée de manière somatotopique (Figure 2).

Le corps calleux est un des éléments de la ligne médiane. Celle-ci est constituée du 3<sup>e</sup> ventricule, du chiasma optique, de l'hypophyse, du tronc cérébral, du vermis, et des autres commissures que sont les commissures antérieure et postérieure ; les commissures hippocampique et habénulaire. Toutes les commissures chez l'homme prennent leur origine en position rostro-ventrale par rapport au trou de Monroe. La majorité des fibres calleuses proviennent des cortex associatifs.



**Figure 2 Topographie probabiliste du corps calleux**

Le corps calleux a été subdivisé en aires correspondant aux connections entre différentes aires de Brodmann. L'échelle de couleur en bas à gauche correspond à la probabilité qu'un voxel donné du corps calleux corresponde à une aire de Brodmann donnée. D'après Chao et al.(5)

## 1.2. **Fonction du corps calleux**

Le CC permet une synchronisation des informations motrices et sensorielles de chaque hémicorps droit et gauche, permettant une intégration des fonctions exécutrices, des relations sociales et du langage. Il est impliqué dans le raisonnement abstrait.

Sa fonction a pu être étudiée chez les patients ayant eu une ablation chirurgicale du corps calleux, indiquée comme traitement ultime d'épilepsie réfractaire. Ces patients ont permis d'étudier la spécificité de chaque hémisphère cérébral (ce qui a valu à R. Sperry le Prix Nobel de physiologie ou médecine en 1981: "le grand plaisir et les grandes sensations dans mon cerveau droit sont plus que ce que mon cerveau gauche n'a de mots pour le dire"). Chez ces patients apparaît un syndrome de déconnection appelé "split-brain". Ce syndrome a peu d'impact sur les fonctions cognitives nécessaires à la vie de tous les jours. Par contre, il provoque une non unité comportementale et représentationnelle (6). Lorsqu'une information visuelle -un objet par exemple- est projetée dans le champ visuel gauche d'une personne avec syndrome de déconnection, celle-ci ne peut pas exprimer verbalement ce qu'elle a vu; pourtant avec sa main gauche elle dessinera l'objet correctement sans comprendre pourquoi elle a dessiné cet objet qu'elle n'a pas su nommer. C'est comme si la communication entre les deux cerveaux passait par la feuille de papier au lieu d'être intériorisée dans sa conscience.

Les enfants nés avec une agénésie du corps calleux- par contre- ne présentent pas ce syndrome. Ce paradoxe est resté longtemps inexpliqué jusqu'à récemment où l'imagerie nous a donné quelques éléments de réponse. Des circuits compensateurs sont visibles par tractographie comme par exemple les bandelettes sigmoïdes (7): les axones dont le corps cellulaire est au niveau occipital se dirigent vers l'aire corticale frontale controlatérale. Deux autres tractus sont visibles : un ventral et un médian. Ils sont visibles dès 22 SA. Ces structures font communiquer structurellement et fonctionnellement les deux aires pariétales postérieures (39) de manière homotopique. Ces aires sont impliquées dans la reconnaissance tactile des objets. Ces circuits pourraient constituer des compensations à la dysruption du corps calleux, contre balancant les circuits aberrants hétérotopiques supposés des patients avec MCC. Des études d'imagerie fonctionnelle suggèrent que la taille du genou du corps calleux est corrélée à la connectivité fonctionnelle entre les régions frontale et pariétale (8).

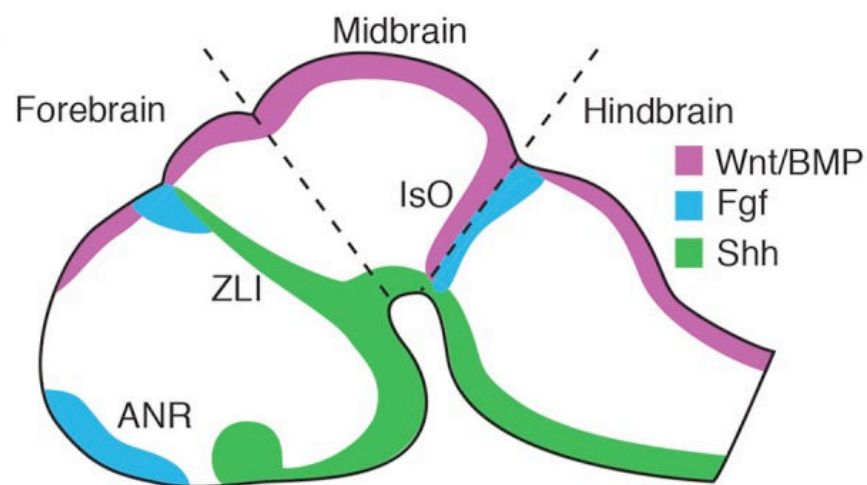
Dans les anomalies développementales du CC, les fibres ne sont pas interrompues. Elles sont entières mais différemment orientées. Autrement dit, le CC reflète les connections corticales complexes entre cerveau droit et gauche, soit la plasticité neuronale à longue distance.

### 1.3. Mise en place du corps calleux au cours du développement

Le développement du CC se fait à partir du télencéphale et implique une séquence d'évènements : spécification par différents morphogènes, différenciation cellulaire, interactions entre glie et neurones, production et réception de molécules de guidance axonale, croissance axonale et établissement des connections contro-latérales par l'activité extrinsèque.

#### 1.3.1. Induction du prosencéphale et mise en place de la plaque commissurale

La détermination des territoires du prosencéphale est précoce, conservée chez tous les vertébrés, et implique l'expression de morphogènes dans des régions bien définies qui spécifient la différenciation cellulaire et la formation des commissures. Après la fermeture du tube neural, à E11.5 chez la souris et J28 chez l'homme, plusieurs centres organisateurs déterminent des gradients morphogènes : un centre dorsal du pallium médian exprimant Wnt/Bmp, un centre ventral exprimant Sonic Hedghog (Shh), ainsi qu'un centre exprimant Fgf qui déterminera la plaque commissurale au niveau de l'ANR (Figure 3).



**Figure 3 Organisation générale du développement cérébral chez les vertébrés**

Il y a conservation des morphogènes organisateurs chez les vertébrés. Il existe chez la souris au stade E11 trois centres organisateurs secondaires : l'ANR : anterior neural ridge avec expression de FGF ; la ZLI : zona limitans interthalamica avec expression de Shh ventralement et Wnt BMP/Fgf dorsalement ; et l'IsO : organisateur isthmique exprimant Wnt BMP et Fgf. D'après Suarez R et al., (9)

### 1.3.2. *Spécification : neurogenèse/gliogenèse*

Toutes les fonctions cognitives spécifiques de l'espèce humaine dépendent du néocortex. Celui-ci est divisé en différentes aires qui ont des fonctions distinctes comme la motricité, la sensibilité ou le langage en fonction des connexions afférentes, efférentes et des réseaux intercellulaires. Chaque aire de ce néocortex est constituée de neurones organisés en 6 couches et maintenus par la glie.

Tous les neurones et la macroglie sont dérivés des cellules progénitrices totipotentes neuro épithéliales qui longent les ventricules cérébraux. Les signaux organisateurs décrits précédemment (Wnt/Bmp ; Shh ; Fgf) restreignent de manière région dépendante le caractère pluripotent des cellules progénitrices (neuro-épithéliales et de la glie radiaire) via de nombreux facteurs de transcription (Pax6, Nkx2.2, Dlx, Gli3....). La précision des domaines aux frontières est accrue par des interactions croisées entre plusieurs molécules comme entre Pax6 et Nkx2.2 qui s'inhibent mutuellement.

Les cellules pyramidales excitatrices glutamatergiques migrent vers la partie dorsale en direction orthogonale à la surface du cerveau (Figure 4). **C'est la migration radiaire**. Elle démarre à E10-E12 correspondant environ à la 6 à 7 semaines de développement chez l'homme. Elle se fait en colonnes clonales ; Il y a deux types de migration radiaire (Figure 5): tout d'abord la migration par translocation nucléaire (somale) pendant la phase précoce de la neurogenèse. Ce type de migration est nécessaire pour les premiers neurones avant l'apparition des cellules gliales. Puis apparaît la migration par locomotion le long des cellules de la glie radiaire. Ce mode de migration a lieu un peu plus tard dans le développement, lorsque la plaque corticale est plus épaisse. Les principales molécules impliquées dans la migration radiaire sont : Reelin; cdk5, p35, Dab1, le récepteur Ldl. Lis1, Pafah1b1, l'actine, la dynéine, et la filamine Fln1. Les molécules impliquées dans le dialogue entre cellule gliale et neurone en migration sont par exemple la neuroréguline et ses récepteurs Erbb2, 3,4.

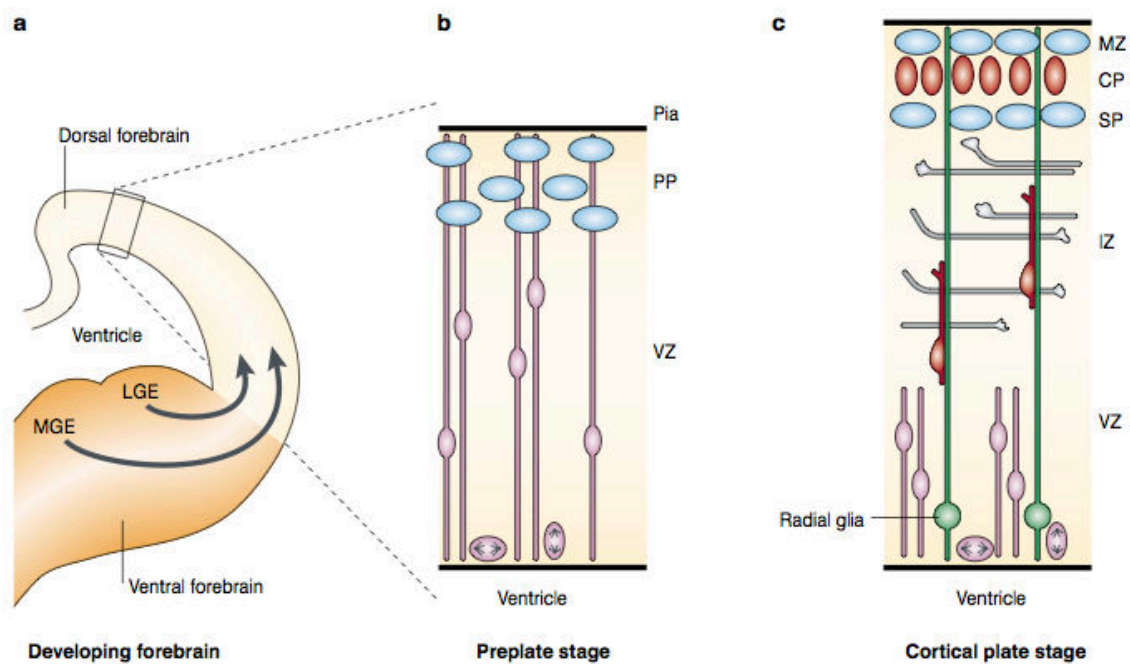
Les cellules inhibitrices gabaergiques migrent, elles, vers les régions ventrales. C'est la **migration tangentielle**, parallèle à la surface (Figure 4). Elle concerne les neurones des noyaux gris centraux et les interneurons. Elle constitue une transgression par rapport à la spécification neuronale. Elle se fait grâce à des molécules de guidance axonale comme les Slit;Neuropilin, et les Sémaphorines de class 3 (10).

Les anomalies de migration neuronale à l'échelle cellulaire sont hétérogènes et peuvent être secondaires à un défaut de transport ou de stabilisation des microtubules, du positionnement du centrosome, du transport nucléaire, du trafic ou de la fusion intravésiculaire.

L'organisation du cortex en 6 couches est essentielle à la mise en place du corps calleux. En effet, les corps cellulaires des axones calleux sont dans les couches intermédiaires,

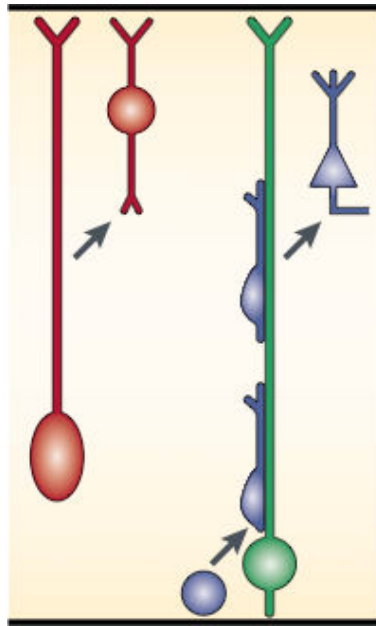


principalement la couche III mais aussi les couches II, V et VI du néocortex. Les troubles de production et de migration de ces neurones et des astrocytes sont à l'origine de malformations du CC par troubles du **développement cortical**. Les axones calleux émergent pendant la migration radiaire des neurones pyramidaux du cortex. Les neurones calleux sont spécifiés par le facteur de transcription *satb2* qui en régulant la chromatine à distance inhibe le destin du faisceau moteur cortico-spinal (par répression transcriptionnelle de *Ctip2*) et promeut la spécification cortico-corticale, régulant ainsi la connectivité corticale pendant le développement (11).



**Figure 4 Développement néo cortical**

a/ Schéma d'une section du télencéphale de souris. Les flèches représentent la migration tangentielle des neurones des ganglions de la base et des interneurones. MGE : éminence ganglionnaire médiane du télencéphale ventral. LGE : éminence ganglionnaire latérale du télencéphale ventral. b/ stade de la pré-plaque : migration radiaire des neurones pyramidaux du néocortex, depuis la zone ventriculaire (VZ) vers la pie-mère (pia). c/ stade de la plaque corticale : la plaque corticale (CP) est entourée de la sous plaque (SP) et la zone marginale (MZ). D'après Nadarajah B. et Parnavelas J.G. (10)



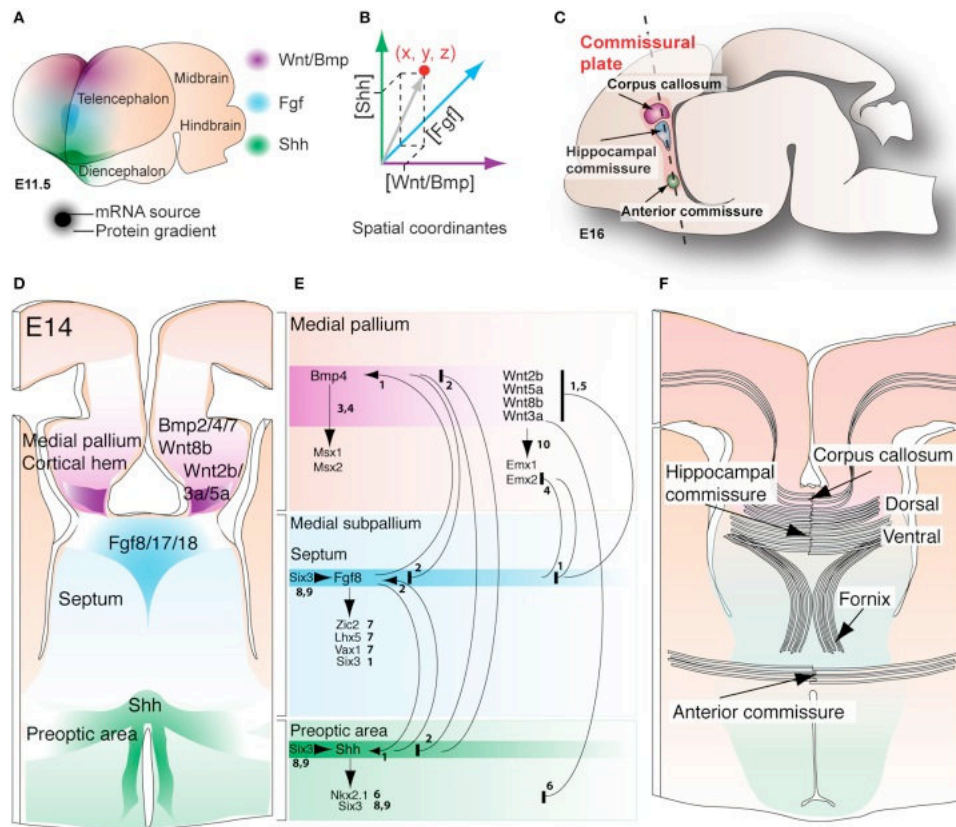
**Figure 5 Modèles de migration neuronale corticale**

En rouge: migration par translocation nucléaire ou translocation somale. En vert : cellule gliale. En bleu : neurones en cours de migration par locomotion, guidé par les cellules gliales. D'après Nadarajah B. et Parnavelas J.G. (10)

### ***1.3.3. Spécification moléculaire de la plaque commissurale***

A E14, soit la 8<sup>e</sup>-9<sup>e</sup> semaine de développement chez l'homme, les morphogènes de l'induction vont agir sur des facteurs de transcription tissu spécifiques qui vont spécifier chacune des 3 régions de la plaque commissurale : pallium médian, septum et aire préoptique (Figure 6). Le pallium médian est défini par l'expression des facteurs Emx1 et Emx2 régulés par Wnt et Msx1 et Msx2 régulés par Bmp. Le septum est défini par les facteurs Zic2, Vax1, and Lhx5 induits par Fgf8. Et enfin l'aire pré optique exprime Six3 and Nkx2.1 régulés par Shh.

A E14 chez la souris, Shh et Wnt ont une répression réciproque alors que Shh et Fgf ont une réciprocité inductive (Figure 6E). Gli3 intègre plusieurs signaux morphogéniques. Il est un effecteur de Shh, et régule les facteurs de transcription Wnt dépendants que sont Emx1 et 2. Il régule également l'expression de Fgf8.



**Figure 6 Spécification moléculaire de la plaque commissurale**

A/ Chez la souris à E11.5, gradient d'expression de Shh, Wnt/Bmp et Fgf dans le télencéphale, révélées par hybridation *in situ*. B/ La concentration différente de chaque morphogène en un point donné de l'espace génère un destin cellulaire unique. C/ Coupe sagittale d'un cerveau embryonnaire de souris montrant le plan de coupe passant par la plaque commissurale à E14./ L'expression des différents morphogènes définit 3 domaines : pallium, septum et aire pré optique E/ Interactions réciproques des différents facteurs de transcription de chaque domaine commissural. F/ 3 Commissures visibles sur un plan de coupe. D'après Suarez R et al. (9)

### 1.3.4. *Guidance axonale et connexion controlatérale*

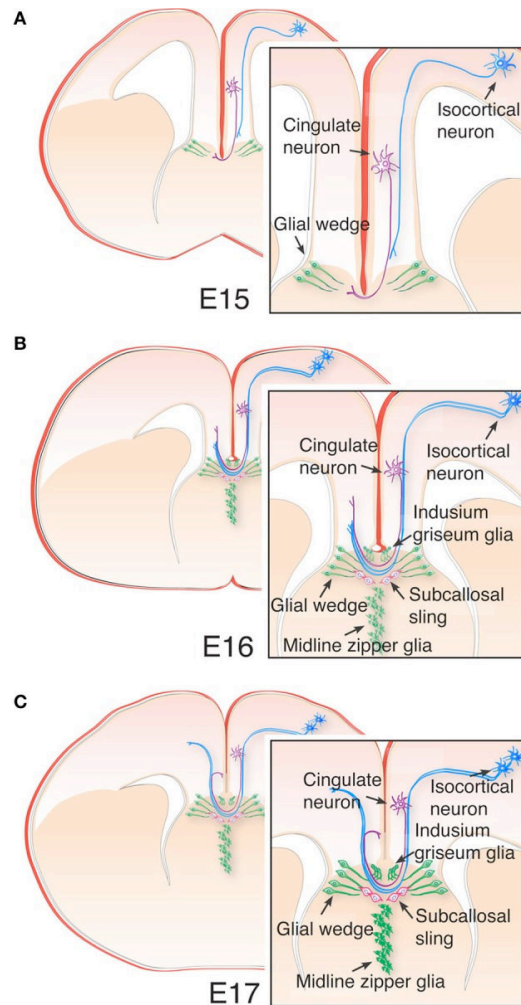
La ligne de fusion interhémisphérique chez l'homme est constituée de la lamina terminalis et de la lamina reunians. Les 3 commissures principales que sont la commissure antérieure, hippocampique et le CC sont issues d'un épaissement de la lamina reunians, dorsale à la lamina terminalis qui elle reste fine. Cet épaissement commence dès 6-8 semaines du développement chez l'homme (12). C'est l'endroit à partir duquel vont de développer latéralement les vésicules télencéphaliques, les éminences ganglionnaires et les bulbes olfactifs. Les hémisphères cérébraux à proprement parler ne participent pas à la formation de cette structure. L'aire septale et la commissure antérieure sont issues de la partie antérieure de cette plaque commissurale alors que la commissure hippocampique et le CC sont issus de la partie postérieure de ce renflement. La commissure antérieure apparaît dès 11 semaines. Le lieu de croisement des fibres calleuses est distinct temporellement (12°-13° semaine) et spatialement (partie dorsale de la lamina reunians) du lieu de croisement des fibres de la

commissure hippocampique et de la commissure antérieure (10<sup>e</sup> semaine et partie ventrale de la lamina reunians) (12).

Deux phénomènes concomitants sont nécessaires à la mise en place de la commissure médiane : un processus de fusion de la ligne médiane, qui opère selon un gradient ventral à dorsal et caudal à rostral chez l'humain et chez les rongeurs (12) et fait intervenir de manière concomitante des phénomènes de prolifération et de mort cellulaire ; et la mise en place de cordages de cellules gliales et neuronales nécessaires à la décussation des neurones calleux (13). Cette structure est transitoire et disparaît en post natal. Elle est composée de cellules gliales et neuronales glutama et gabaergiques.

Les cellules gliales (7; 10) sont issues des éminences ganglionnaires médianes (13) et migrent pour s'organiser selon des territoires bien définis et visibles en microscopie (Figure 7): le « glial wedge » marquant la frontière cortico-septale (cortico-septal boundary), l'indusium griseum dorsalement formant un manchon qui par la sécrétion de molécules répulsives comme slit2, Wnt5a et Draxin vont guider des axones, et la « midline zipper glia ». Les neurones gaba et glutamaergiques proviennent de la zone sous ventriculaire (15) médiane et migrent vers la ligne médiane pour former de manière transitoire un manchon. Ils sécrètent des molécules attractives des axones pionniers comme Sema3C et son récepteur Nrp1.

Le lieu de croisement des axones calleux est la frontière corticoseptale. Des axones pionniers issus du cortex cingulaire croisent la ligne médiane un jour avant les axones calleux et leur servent de guide. Les cônes de croissance des axones calleux sensibles à différents signaux peuvent ainsi croiser la ligne médiane. Les mécanismes d'interaction glie-neurones sont plus complexes que lors de la migration radiaire car il s'agit ici d'un mouvement bi-directionnel alors qu'il est uni-directionnel pour la mise en place du néo-cortex.



**Figure 7 Architecture cellulaire de la ligne médiane télencéphalique et du développement calleux**

A/ E15 : apparition du glial wedge qui limite le corps calleux ventralement. Décussation des neurones pionniers issus du cortex cingulaire et début de décussation des neurones isocorticaux suivant le trajet des neurones pionniers. B/ E16 : apparition de l'indusium griseum qui délimite le corps calleux dorsalement et de la midline zipper glia. C/ E17 : l'axone cingulaire a atteint sa cible contro-latérale alors que l'axone isocortical a croisé la ligne médiane et continuera sa route jusqu'en post natal. D'après Suarez R et al. (9)

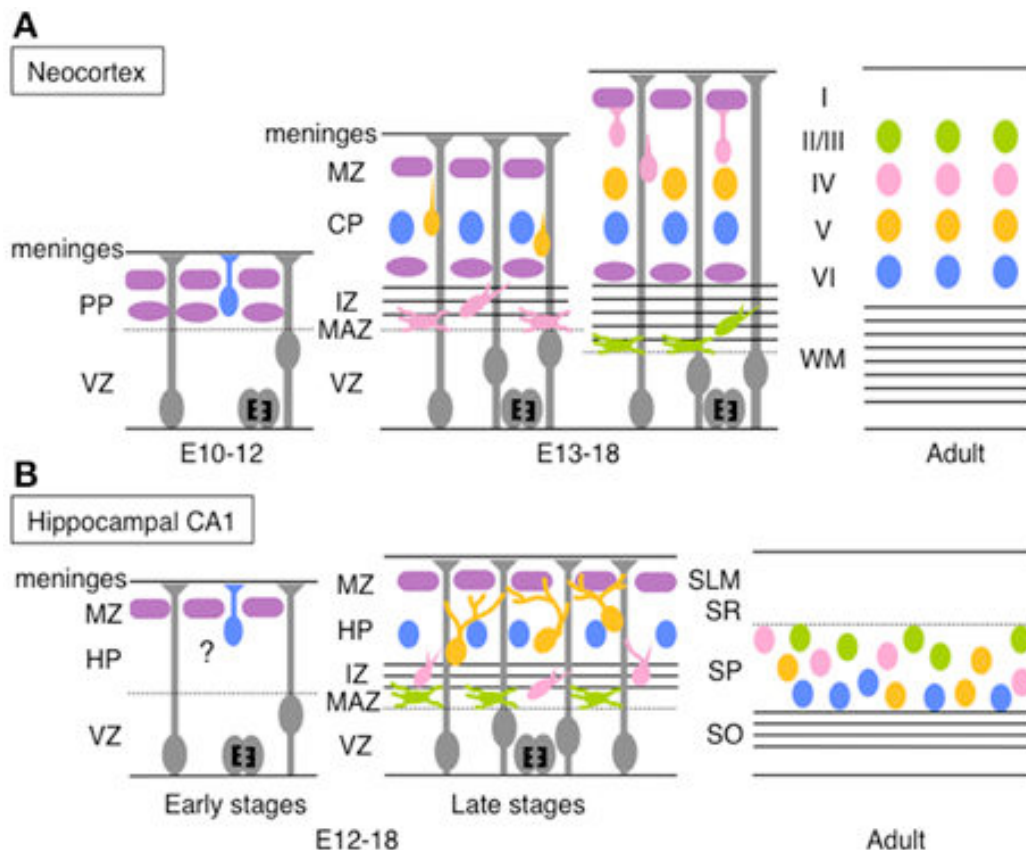
Chez l'homme, les premières fibres calleuses commencent à apparaître histologiquement vers 11 semaines. Le CC apparaît macroscopiquement dès les 13<sup>e</sup>-14<sup>e</sup> semaines du développement en quelques jours, et le splenium devient complet et bien renflé vers 18 semaines. Le rostrum (également appelé lamina rostralis) est présent dès la 14<sup>e</sup> semaine.

Le splenium et la commissure hippocampique se forment en avant au niveau de la lamina reunians, puis sont translétés vers l'arrière du fait de la croissance plus importante des fibres frontales qui formeront toute la partie antérieure du corps calleux. Il y a donc une translation d'avant en arrière du splenium du fait de l'expansion de l'arrière vers l'avant des lobes frontaux. La forme du CC est établie à 20 semaines (2).

### 1.3.5. Neurogenèse de l'hippocampe

La commissure hippocampique qui draine des axones subiculaires et para hippocampiques fusionne au niveau de l'isthme du CC ventralement par rapport au corps calleux. D'où l'intrication probable des mécanismes régulant les deux structures. Il a été montré qu'un délai au moment du croisement des fibres hippocampiques empêche les axones cingulaires pionniers de croiser la ligne médiane (16) et est à l'origine d'agénésie du CC dans des modèles murins.

A l'inverse des neurones néo corticaux, les neurones pyramidaux CA1 de l'hippocampe font leur migration en zigzag le long de diverses cellules de glie radiaire, en mode « climbing cells », plus lentement, probablement à cause de la densité cellulaire plus élevée que dans le néocortex, et les neurones migrent ainsi en clones horizontaux (17) contrairement aux cellules sœurs pyramidales du néocortex qui migrent en clones en colonnes verticales (Figure 8).



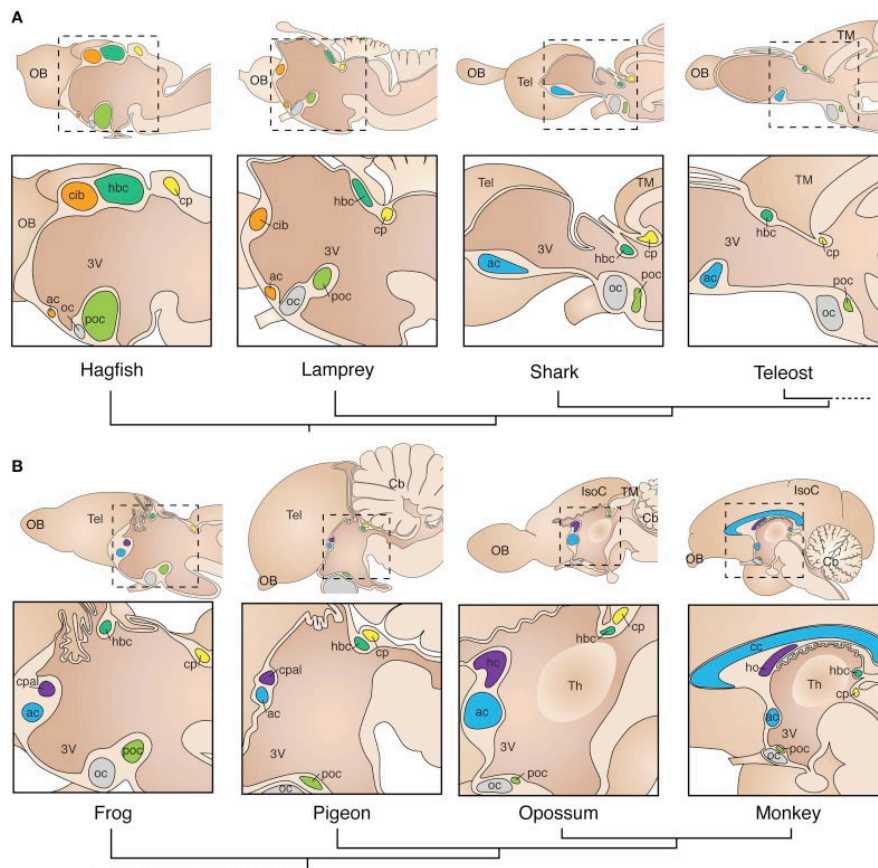
**Figure 8 Représentation schématique de la migration et de l'organisation en couches des neurones néocorticaux comparée aux neurones CA1 hippocampiques**

A/ Les neurones néo corticaux entre E10 et E12 migrent de manière radiaire par translocation somale. Les neurones nés plus tard ont une migration par locomotion, et multipolaire, formant les couches selon un gradient « inside-out », des neurones nés le plus tôt aux neurones nés ultérieurement. B/ Les neurones CA1 de l'hippocampe entre E10 et E12 ont un mode de migration encore inconnu. Les neurones nés plus tard ont une migration multipolaire en « climbing mode » avec un gradient « inside-out » également, mais en clones horizontaux. PP : preplate ; VZ ventricular zone ; MZ marginal zone ; CP cortical plate ; IZ intermediated zone ; MAZ : multipolar cell accumulation zone ; WM white matter ; HP hippocampal plate ; SLM stratum lacunosum-moleculare ; SR stratum radiatum ; SP stratum pyramidale ; SO stratum oriens. D'après Hayashi et al. (17)



#### 1.4. Commissures et évolution

Les vertébrés sont caractérisés par un axe de symétrie en plus de la présence d'un squelette. L'intégration des informations de chaque côté du corps, cruciale pour une meilleure coordination des mouvements, est assurée par des connections axonales entre le système nerveux droit et gauche appelées commissures. Elles sont agencées selon un plan développemental conservé (Figure 9). La commissure antérieure est la plus ancienne phylogénétiquement. Elle est issue du paléocortex et fait communiquer les aires olfactives. Puis, chez les vertébrés tétrapodes ayant un isocortex en 6 couches, deux commissures supplémentaires sont apparues : la commissure hippocampique issue de l'archicortex, impliquée dans la mémoire, et enfin le CC spécifique des mammifères eutériens (placentaires), issu du néocortex. La « glial sling » est l'exemple d'un changement fondamental dans l'évolution de la topologie de voies axonales du système nerveux central (18).



**Figure 9 Conservation du système commissural chez les vertébrés adultes**

A/ Commissures des espèces non tétrapodes. On note la conservation des positions des commissures les unes par rapport aux autres dans les différentes espèces. B/ Commissures des espèces tétrapodes avec apparition d'une commissure supplémentaire : la commissure palliale homologue de la commissure hippocampique des mammifères. Le corps calleux est une innovation des mammifères placentaires. Cib: commissura interbulbaris, ac: anterior commissure, cpal: commissure palliale, hc: hippocampal commissure, cc: corps calleux, cp: commissure postérieure, hbc: habenular commissure, poc: post optic commissure. 3V: 3° ventricule. Cb: cerebellum. IsoC: isocortex. OB: olfactory bulb. Oc: optic chiasm. Tel: télencéphale. Th: thalamus. TM: tectum mesenphali. D'après Suarez R et al. (9)

## **2. MALFORMATIONS DU CORPS CALLEUX**

Les malformations du corps calleux (MCC) représentent un modèle de compréhension des mécanismes impliqués dans les connections corticales.

### **2.1. Définition-prévalence**

Les malformations du CC sont une malformation cérébrale fréquente qui peut survenir soit de manière isolée, soit de manière associée à d'autres malformations, constituant parfois un syndrome congénital. Les individus ayant une malformation congénitale du CC ont des troubles cliniques très variables avec parfois des troubles du spectre autistique sévères.

Les progrès récents de l'imagerie ont montré que dans les agénésies partielles du corps calleux, les connections révélées par la tractographie changent d'un individu à l'autre pour une même malformation du CC et que la partie présente du CC ne connecte pas forcément les aires corticales attendues d'un CC normal ; autrement dit, la localisation anatomique et la taille du fragment présent ne sont pas de bons indicateurs de la connexion corticale sous-jacente ; et ont été détectées plus de connections hétérotopiques en cas d'agénésie partielle du corps calleux.

La prévalence de cette caractéristique anatomique est de 1/4000 naissances ; et 3 à 5% d'individus avec un trouble neuro-développemental (19). L'agénésie isolée est beaucoup plus rare avec un taux de 0.5/10000.

Il est à noter que la pénétrance de ces malformations est incomplète. Ces MCC apparaissent de façon sporadique dans 95% des cas.

### **2.2. Causes des MCC**

Les étiologies des MCC sont hétérogènes, et comportent des causes exogènes et génétiques.

#### **2.2.1. Causes environnementales**

L'exposition in utero à certaines drogues telles que l'alcool, la cocaïne ; et un diabète gestationnel sont autant de tératogènes pouvant altérer le développement du CC (20). Les infections materno fœtales à CMV (21), VZV, rubéole, toxoplasmose et HSV sont aussi responsables de MCC, souvent associées à d'autres signes. Enfin des lésions hypoxiques peuvent causer des MCC, par exemple des complications de grossesses mono-choriales bi-amniotiques. Une phénylcétonurie maternelle pouvait donner également des MCC, ce qui est



devenu exceptionnel depuis le dépistage systématique de la phénylcétonurie dans de nombreux pays. Toutes ces causes représentent moins de 5% des causes de MCC.

### 2.2.2. Causes génétiques

Les causes génétiques sont nombreuses et diverses. Parmi les 25000 gènes du génome humain, environ 84% ont été exprimés dans au moins une région du cerveau pour son développement et ou son fonctionnement ce qui explique l'extrême hétérogénéité génétique des MCC (22, 23).

#### a) Anomalies chromosomiques

Les anomalies chromosomiques sont une cause fréquente d'anomalies du corps calleux. Il s'agit d'anomalies de nombre (aneuploïdies) ou de structure telles que duplications, délétions, inversions ou translocations. Elles peuvent être homogènes, c'est à dire dans toutes les cellules de l'organisme, et le plus souvent issues d'une non disjonction méiotique avec perte (monosomie) ou gain de matériel (trisomie) ; ou hétérogènes lorsqu'elles sont dans certains types cellulaires seulement. Les anomalies de structure apparaissent à la suite de cassures chromosomiques suivies par un ou plusieurs réassemblages et affectent un ou plusieurs chromosomes, homologues ou non. Elles sont équilibrées lorsqu'elles n'entraînent pas de perte ou gain de matériel, auquel cas elles n'entraînent pas de phénotype particulier, sauf si le point de cassure interrompt un gène et/ou altère son expression. Par contre, ces anomalies de structure équilibrées peuvent être à l'origine de gamètes déséquilibrés qui peuvent compromettre les grossesses futures. Par ailleurs, par opposition à ces anomalies de structure héritées, des anomalies de structure déséquilibrées peuvent apparaître *de novo*. Le caryotype standard permet d'identifier des anomalies de taille et de structure par analyse au microscope des chromosomes en métaphase allant jusqu'à 10 Mb. La FISH (Fluorescence *in situ* hybridisation) a rendu possible la visualisation d'anomalies chromosomiques bien plus petites jusqu'à 4Mb. Cette technique de biologie moléculaire est une technique qui cible une région en fonction d'un phénotype bien particulier évocateur d'un syndrome connu.

Dans les années 2000, l'avènement de la technique d'analyse comparative sur puce à ADN ou CGH array a rendu possible la mise en évidence de remaniements déséquilibrés sub microscopiques non visibles sur caryotype appelés CNVs (copy number variants) avec une résolution de quelque kb. Cette technique permet une étude pangénomique. L'application de cette technique a permis d'identifier des remaniements chromosomiques déséquilibrés avant

l'identification d'un syndrome précis ; démarche inverse par rapport à ce qui était fait précédemment. De nombreux nouveaux loci ont été identifiés dans les MCC (Table 1) (24).

Plusieurs anomalies chromosomiques de petite taille sont récurrentes car un même mécanisme en est à l'origine et l'architecture du génome explique ce constat. Des séquences d'ADN répétées de 10 à 400 kb appelées LCR (low copy repeats) sont présentes en plusieurs copies dans le génome humain, espacées de 500 kb à 4 Mb et présentent plus de 90% d'homologie. L'homologie de ces séquences favorise les recombinaisons homologues non alléliques (NAHR) lors de la méiose entraînant une duplication ou une délétion des régions comprises entre deux duplions de même orientation avec des réarrangements possibles en interchromosomes, interchromatides ou intrachromatides. Ces syndrome microdélétionnels sont dits récurrents car les points de cassure observés sont toujours les mêmes, et donc relativement fréquents. Ils ont été pour certains associés fréquemment à des MCC. C'est le cas des syndromes de Miller-Dieker, de Potocki-Lupski et de Koolen-De Vries.

**Table 1 : Réarrangements chromosomiques avec une malformation du corps calleux comme signe possible. D'après Schell-Apacik et al. (24).**

Duplication	Triploidy (mosaicism)	Region	Karyotype, SRO = smallest region of overlap
Triploidy	SRO	Deletions and translocations	
5p13.1p15.3	der(15),t(5;15)(p11;p12)	1q44qter	SRO
5p11pter	inv dup(5)(p13.1p15.3)	1q43	del(1)(q43)
5p13.1p15.3	SRO	1q43qter	del(1)(q43) <sup>P</sup>
6p25pter	der(3),t(3;6)(q29;p21.1)mar	1q44qter	-21,der(1),t(1;21)(q44;q22.11)
6p25pter	dup(6)(p25)	2q14	SRO
6q25qter	dup(6)(q25qter)	2q12q14	del(2)(q12q14)
8p21p23	SRO	2q14q21	del(2)(q14q21)
8	Trisomy 8 mosaicism	2q31	SRO
8p11pter	i(8p)mos	2q22q31	del(2)(q22q31)
8p11pter	der(15),t(8;15)(p11;p15)pat	2q31q33	del(2)(q31q33)
8p21pter	dup(8)(p21pter)	3p25pter	del(3)(p25pter)
8p21pter	der(10),t(8;10)(p21;p15)	4p16	SRO
8p21pter	dup(8)(p21)/del(8)(p21)	4p16	del(4)(pterp16.1)
8p11p23.1	dup(8)(p11p23.1)	6q23qter	SRO
8p11.2p23.1	dup(8)(p11.2p23.1)(?)	6q23qter	del(6)(q23)
8p23qter	-8,+idic(8)(p23)	6p2/q2	r(6)/(p2q22)
8p11p22	dup(8)(p11p22)	7q32qter	del(7)(q32qter)
11q23qter	SRO	15q13	SRO
11q14.2qter	der(18),t(11;18)(q14.2;p11.31)	15q13	t(2;15)(p21;q13)
11q21.1qter	der(4),t(4;11)(q35;q21.1)	15q13q15	del(15)(q13q15)
11q23qter	der(13),t(11;13)(q13;q32-34)	16q22qter	rec(16),dup p, inv(16)(p12.1q22)
11q23.1qter	der(4),t(4;11)(q35;q32.1)mat	18q21qter	del(18)(q21qter)
14q23q24	SRO	21q11q21	SRO
14pterq24	+der(14),t(3;14)(p26;q24)	21	Monosomie 21 Mosaik
14q23q32	-5,+der(5),ins(5;14)(q13;q23q32)	21pterq22.1	-21,der(1),t(1;21)(q44;q22.11)
19q13.2qter	der(13),t(13;19)(p13;q13.2)	21pterq21	-21,der(20),t(20;21)(q13;q21)
		Xp22.3	SRO
		Xp22.3	del(X)(p22.3)
		Xq13q21	del(X)(q13q21.3)

Enfin, les disomies uniparentales (DUP) correspondent à la présence chez un individu de 2 chromosomes d'une même paire provenant d'un seul de ses parents. On distingue les

hétérodisomies (deux chromosomes différents du même parent) des isodisomies (deux chromosomes identiques du même parent). Ces dernières sont détectables par SNP array et sont susceptibles de révéler des maladies récessives.

### b) Causes Mendéliennes

Les causes mendéliennes comportent des syndromes dont le mode d'hérédité est variable : autosomique dominant, récessif ou lié à l'X. Les syndromes polymalformatifs sont nombreux, avec plus de 300 entités répertoriés dans les bases OMIM ou LMDb, pour lesquels certains gènes responsables ont déjà été identifiés. La liste des syndromes avec MCC est donc longue, et quelques principaux syndromes sont listés ci-dessous (Table 2).

**Table 2 : Syndromes génétiques complexes associés à des anomalies du corps calleux**

Syndrome	Chromosomale region	Gen	OMIM#
<b>Autosomal-dominant</b>			
Apert syndrome	10q26	FGFR2	#101200
Basal cell nevus syndrome	9q22.3	PTCH	#109400
Greig cephalopolysyndaktyly syndrome	7p13	GLI3	#175700
Miller-Dieker syndrome	17p13.3	LIS1	#247200
Mowat-Wilson syndrome	2q22	ZFHX1B	#235730
Opitz GBBB syndrome	22q11.2		%145410
Rubinstein-Taybi syndrome	16p13.3 22q13	CREBBP EP300	#180849
<b>Autosomal-recessive</b>			
Acrocallosal syndrome	7p13	GLI3	#200990
Andermann syndrome	15q13-q14	SLC12A6	#218000
Coffin-Siris syndrome			135900
Dincsoy syndrome			601016
Fryns syndrome			%229850
Fukuyama congenital muscular dystrophy	9q31	FCMD	#253800
Hydrolethals syndrome	11q23-q25 9q34.3		%236680 %213300
Joubert syndrome	6q23.2-q23.3	AHI1	#608629
Lowry-Wood syndrome			%226960
Lyon syndrome			225740
Marden-Walker syndrome			%248700
Meckel-Gruber syndrome	17q22-q23		%249000
Microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism, type 1			%210710
Microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism, type 3			%210730
Muscle-eye-brain disease	1p34-p33	POMGNT1	#253280
Neu-Laxova syndrome			%256520
Ocular motor apraxia (Cogan-syndrome)	2q13		%257550
Peters-Plus syndrome			%261540
Septo-optic dysplasia	3p21.2-p21.1	HESX1	#182230
Toriello-Carey syndrome			%217980
Vici syndrome	9q34.1 14q24.3	POMT1 POMT2	%242840
Walker-Warburg syndrome	9q31	FCMD	#236670
Warburg-Mikro syndrome	2q21.3	RAB3GAP	#600118
<b>X-linked</b>			
ACC in combination with ectodermal dysplasia (hypohidrotic)			225040
Aicardi syndrome	Xp22		%304050
ATR-X syndrome	Xq13	ATRX	#301040
FG syndrome	Xq12-q21.31		%305450
X-linked aqueductal stenosis or hydrocephalus/MASA syndrome	Xq28	L1CAM	#307000
Craniofrontonasal syndrome	Xq12	EFNB1	#304110
Lujan-Fryns syndrome			%309520
MLS syndrome	Xp22.31		%309801
Opitz GBBB syndrome	Xp22	MID1	#300000
Oro-facial digital syndrome type 1	Xp22.3-p22.2	CXORF5	#311200
Proud syndrome	Xp22.13	ARX	#300004
X-linked lissencephaly	Xq22.3-q23	DCX	#300067

**c) Stratégies d'identification de gènes morbides**

Certains réarrangements chromosomiques sont des pistes pour identifier des gènes responsables de formes dominantes de MCC. En effet, des remaniements déséquilibrés chez des patients avec une pathologie commune permettent d'identifier un locus d'intérêt. Les gènes contenus dans la région aneusomique sont candidats chez d'autres patients ayant la même maladie mais sans déséquilibre génomique. Par exemple, *TCF4*, *CHD7* ont été identifiés à l'aide de cette approche. La cytogénétique est donc la première discipline qui a permis l'identification des premiers gènes de cause AD de MCC.

Les MCC étant très hétérogènes, tant sur le plan clinique que génétique, plusieurs stratégies d'identification de gène responsable de MCC étaient envisageables de par le passé :

-l'approche « gène candidat » de par sa fonction : orientation du séquençage par un résultat biochimique compromettant une voie de synthèse bien connue par exemple.

-l'approche « gène candidat » de par le phénotype cellulaire.

-la cartographie par autozygotie : étude de familles consanguines multiplex avec identification de régions candidates par rapport de vraisemblance calculé par la méthode des lod-scores (logarithme de vraisemblance entre deux hypothèses : hypothèse de liaison génétique entre les marqueurs et le gène de la maladie et hypothèse de non liaison au marqueur). Cette technique est d'application simple avec les puces SNP. Le plus souvent, la mutation survient chez un ancêtre commun et est portée à l'état hétérozygote chez chacun des deux parents. Les enfants malades héritent de deux copies de l'allèle muté et sont identiques au locus. On parle de régions identiques par descendance (IBD identical by descent). En cas de familles multiplex non apparentées, 2 mutations sont présentes à l'état hétérozygote composite chez les malades; chacune étant portée respectivement à l'état hétérozygote par chaque parent dans une région dont on définit l'haplotype. On cherche les régions haplo-identiques chez tous les malades. Au total, toutes ces approches ont permis d'identifier un certain nombre de gènes impliqués dans la mise en place du corps calleux chez l'humain.

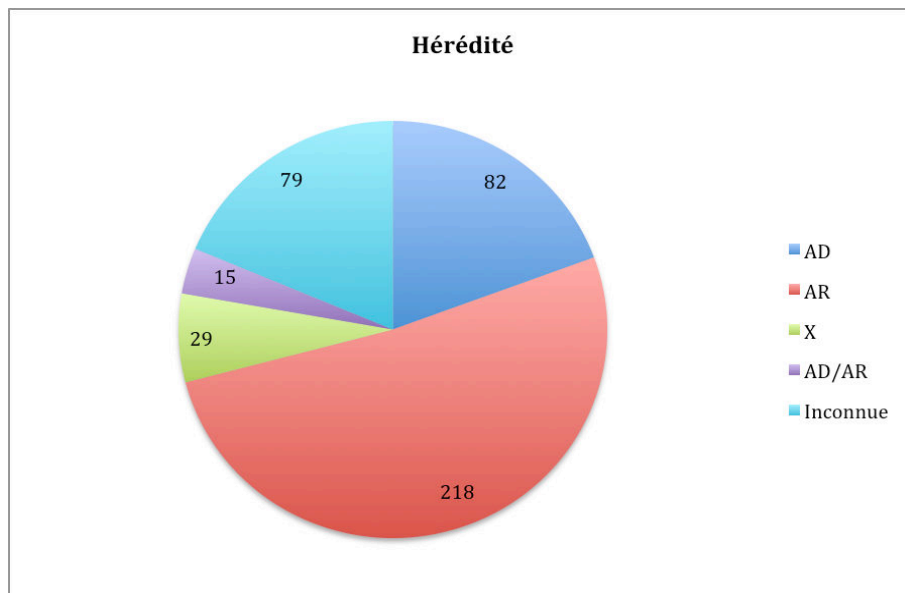
Récemment, les analyses génomiques par séquençage nouvelle génération permettent de séquencer plusieurs gigabases rapidement. Ces techniques ont permis de s'affranchir des études de liaison et des approches gène candidat. Désormais, un petit nombre de patients suffit pour identifier de nouveaux gènes par la méthode de whole exome sequencing (WES)(25,26). C'est désormais la technique de choix, d'autant plus lorsque l'hypothèse de transmission n'est pas tranchée puisque toutes les hypothèses peuvent être testées. Les

exomes en trio sont particulièrement intéressants pour les maladies d'hérédité dominante ou sporadique. On s'intéresse alors aux variants survenus *de novo*.

Dans le cadre de ce projet nous avons réalisé un travail de recherche bibliographique et des bases de données et avons recherché :

- 1/ les gènes connus en pathologie humaine conduisant à une MCC
- 2/ dont l'inactivation entraîne une MCC chez la souris et donc candidats pour les MCC humaines
- 3/ candidats par leur fonction du fait de leur appartenance à des voies de signalisation clés pour la mise en place du corps calleux.

Nous avons ainsi recensé 421 gènes et 2 ARN non codants (Annexe 1). Leur hérédité est variable (Figure 10).



**Figure 10 Mode d'hérédité des gènes responsables de syndromes avec MCC**

En bleu foncé: nombre de gènes à hérédité autosomique dominante (AD)  
 En rouge : nombre de gènes à hérédité autosomique récessive (AR)  
 En vert : nombre de gènes à hérédité liée à l'X (X)  
 En violet : nombre de gènes à hérédité AD/AR  
 Inconnue : gènes candidats animaux, par sa fonction ou par exome, d'hérédité inconnue  
 On peut constater que parmi les gènes de MCC impliqués en pathologie humaine, le mode d'hérédité est variable. Il y a une majorité de gènes avec une hérédité autosomique récessive.

La localisation cellulaire, les processus biologiques, et la fonction moléculaire des protéines correspondant aux 423 gènes sélectionnés sont extrêmement variés d'après les données de Geneontology (GO). Il s'agit principalement de gènes codant pour des protéines de localisation intracellulaire, impliqués dans des processus métaboliques, à activité catalytique ou se liant à d'autres protéines. La distribution est équivalente à celle des 18 331 gènes du génome humain, montrant ainsi que les gènes impliqués dans les MCC ne se concentrent pas dans une catégorie particulière. Cette observation est à rapprocher du fait que la grande

majorité des gènes sont exprimés dans le cerveau en développement ou en post natal, et montre l'extrême hétérogénéité génétique des MCC. Ainsi, l'étude des MCC par une approche globale par GO ne semble pas une méthode à retenir. Ceci avait été montré pour les déficiences intellectuelles (27).

### 2.3. Pronostic neurodéveloppemental

Le devenir neuro-développemental des individus avec MCC est variable, allant de la déficience intellectuelle sévère (QI inférieur à 70) à un pronostic normal, fréquent en cas de MCC isolée. Le plus souvent, les difficultés à résoudre des problèmes et les difficultés d'interactions sociales tombent dans le spectre autistique (25,26). Autisme et théorie de sous connectivité (8) ont fait émettre l'hypothèse d'une implication du corps calleux dans ce spectre clinique. De nombreuses études suggéraient une taille plus petite du corps calleux proportionnellement au cerveau, ce qui a été récemment démenti par une méta analyse ayant une puissance largement supérieure aux études précédentes (30), du moins pour les autistes de haut niveau. Par ailleurs, les troubles bipolaires sont associés à des anomalies de la substance blanche, dont le corps calleux.

Le pronostic est d'autant meilleur que la MCC est isolée, auquel cas les patients peuvent être asymptomatiques. Ils ont cependant souvent des difficultés scolaires d'apparition tardive, des troubles du comportement et de l'attention, ou des difficultés de raisonnement. Au total, 72% des enfants diagnostiqués comme ayant une ACC isolée en prénatal ont un devenir normal, 15% seulement ont un retard psychomoteur ou une épilepsie, et 13% ont un pronostic intermédiaire. Soulignons l'importance de l'IRM qui permet de diagnostiquer 22% d'anomalies supplémentaires par rapport à l'échographie anténatale. Parmi celles-ci, les plus importantes à chercher sont les anomalies de gyration et infratentorielles car elles grèvent le pronostic. A noter que les anomalies de gyration apparaissent après 24 SA, terme légal d'IMG dans de nombreux pays. Ces chiffres sont basés sur 16 études avec 132 cas de diagnostic prénatal d'ACC isolée (19). Devant l'incertitude pronostique, de nombreux couples s'orientent vers une demande d'interruption médicale de grossesse, en moyenne 60% des couples (19), et les MCC restent la cause la plus fréquente d'IMG pour anomalies cérébrales après 24 SA en France (31). Ces études sont constituées de séries très restreintes allant de 10 à 20 patients uniquement. D'où l'importance de réaliser des études prospectives avec un plus grand nombre de cas avec un suivi jusqu'à 6 ans minimum du fait de l'apparition de la majorité des symptômes grévant le pronostic à cet âge (32). Les difficultés de ce type d'études

sont les suivantes : d'une part, le suivi à long terme est d'autant plus difficile que la majorité des enfants vont bien; d'autre part, les évaluations cliniques du caractère isolé ou non de l'ACC et du devenir neurocomportemental des individus sont souvent disparates en fonction des centres ; enfin, le nombre de patients est souvent trop petit rendant difficile l'ajustement au bagage culturel de l'enfant et à la qualité de son suivi, et au caractère total ou partiel d'une agénésie.

#### 2.4. **Diagnostic prénatal**

Depuis la fin des années 1980, le diagnostic prénatal des agénésies du corps calleux est possible par échographie. Les signes sont soit directs, soit indirects comme l'élargissement de la fissure inter hémisphérique, l'oblitération du cavum du septum pellucidum, une colpocephalie (33), une élévation et une dilatation du 3<sup>o</sup> ventricule ou un trajet aberrant de l'artère péri-calleuse ; avec un intérêt récent pour la reconstruction tri-dimensionnelle. Les anomalies de la substance blanche associées ne sont pas visibles par échographie. C'est pourquoi l'IRM est indispensable en complément d'exploration devant la découverte échographique d'une MCC. Elle permettra d'évaluer avec plus de précision les anomalies de gyration et infra-tentorielles.

### 3. **LE CIL**

Le rôle du cil primaire dans le développement du corps calleux a récemment été montré dans des modèles murins. En particulier, le cil régule la voie Shh, qui elle-même régule le ratio des isoformes longue et courte de Gli3. Ce ratio est important dans la détermination du territoire où s'exprime Fgf8. Et une morphogenèse perturbée de ce territoire a pour conséquence un trouble de la détermination de la frontière cortico-septale avec une mauvaise distribution des neurones de cette zone, lesquels servent à guider les axones calleux (31,32). C'est pourquoi nous avons voulu évaluer le rôle du cil primaire dans la mise en place du corps calleux chez l'homme.

#### 3.1. **Cil primaire et cils mobiles**

Les cils primaires sont des organelles composées de microtubules qui permettent la transduction de signaux extracellulaires dans de nombreuses cellules pendant la phase

quiescente G0/G1 du cycle cellulaire. Il existe deux types de cils qui diffèrent de par leur structure et leurs fonctions : les cils mobiles et les cils immobiles.

### **3.1.1. Structure du cil**

La base de ces cils est formée par le corps basal, constitué de 9 triplets de microtubules, structure à partir de laquelle se forme la structure centrale du cil appelée axonème. Le cil est recouvert de membrane plasmique.

Les cils mobiles sont composés d'un axonème de type « 9+2 » : ils possèdent 9 doublets de microtubules périphériques et un doublet central. Les doublets périphériques sont reliés entre eux par des bras de dynéine internes et externes alors qu'ils sont reliés au doublet central par des rayons radiaires. Cette structure confère la mobilité au cil.

Les cils primaires quant à eux sont composés d'un axonème de type « 9+0 » paires de microtubules. Ils n'ont pas de microtubules centraux ni de bras de dynéine externes contrairement aux cils mobiles.

Il existe quelques exceptions : les cils de la cochlée ont une structure « 9+2 » alors que les cils ne battent pas (ces cils bougent en rangées selon le mouvement de la vague déclenché dans le liquide de l'oreille interne par les vibrations venant de l'extérieur). Et inversement, les cellules nodales de l'embryon ont un cil ayant une structure « 9+0 » alors qu'ils sont mobiles, permettant de générer par rotation en sens horaire un flux directionnel impliqué dans l'axe gauche-droite. Ces cellules se situent dans le nœud de Hensen, terminaison rostrale de la ligne primitive de l'embryon en cours de gastrulation.

Les protéines du cil sont synthétisées dans le cytoplasme puis doivent être transportées dans le cil.

### **3.1.2. Fonction ciliaire**

Alors que les cils mobiles sont multiples par cellule, les cils primaires sont immobiles et uniques.

#### ***Cils mobiles***

Ils battent de manière synchronisée de manière à générer un flux. Ils sont présents dans certains types cellulaires comme au niveau de l'épendyme cérébral où ils permettent la circulation du liquide céphalorachidien ; au niveau de l'épithélium respiratoire où ils permettent l'expectoration de mucus ; et au niveau des trompes de Fallope où ils permettent le



déplacement des ovocytes. Le flagelle des spermatozoïdes a une structure identique aux cils mobiles, et permet leur déplacement.

### ***Cils primaires***

Ils sont immobiles et jouent le rôle de chémo, mécano, photo ou osmosenseur pour contrôler le développement tissulaire grâce à des canaux ioniques et des récepteurs trans-membranaires. Ainsi ils captent un signal extra-cellulaire qu'ils transduisent secondairement dans la cellule. A titre d'exemple de signal reçu : les signaux lumineux reçus par les photorécepteurs de la rétine, le flux mécanique circulant rénal : les molécules chimiques odorantes reçues par les cellules des nerfs olfactifs. Ils ont un rôle fondamental dans le développement embryonnaire comme cela sera développé ultérieurement.

### ***Cil primaire et cycle cellulaire***

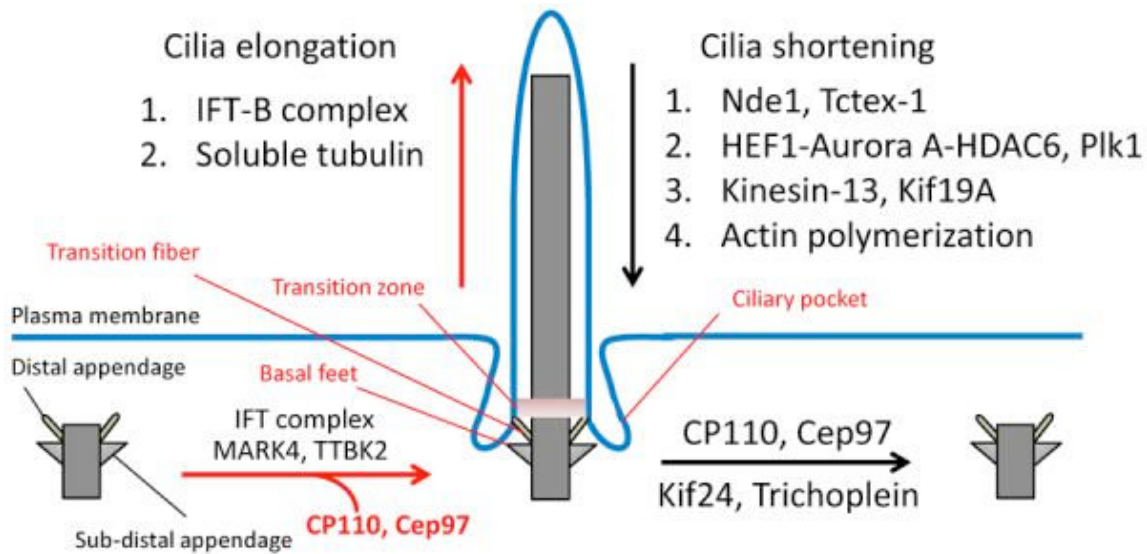
Le cil primaire est une structure dynamique. Il n'est présent qu'en interphase. Durant la mitose, il disparaît car le corps basal redevient un centrosome qui est nécessaire à la formation du fuseau mitotique. De plus, la forme cellulaire et l'architecture du réseau d'actine sont des régulateurs majeurs du processus de formation du cil. Ainsi, seules les cellules au repos et confinées dans l'espace assemblent un cil primaire qui doit se désassembler avant l'entrée de la cellule dans le cycle cellulaire : les microtubules doivent avoir la capacité de se stabiliser et de se déstabiliser. La stabilisation se fait par l'acétylation de l'alpha-tubuline alors que la déstabilisation se fait par la tyrosylation de l'alpha-tubuline. Cette liaison entre le cycle cellulaire et le cil primaire, a permis d'impliquer le cil primaire sur le contrôle de la prolifération / différenciation des cellules et mettre en évidence un dysfonctionnement ciliaire dans certains cancers que nous n'aborderons pas ici.

## **3.2. Ciliogenèse**

### ***3.2.1. Le transport intra-flagellaire***

Le cil primaire est allongé et maintenu par le transport de particules le long de l'axonème, médié par la machinerie IFT (intra flagellar transport). Le transport antérograde -de la base au sommet du cil- est médié par le complexe IFT-B et les kinésines alors que le transport rétrograde est médié par le complexe IFT-A et les dynéines (Figure 11). Les perturbations du

transport antérograde entraînent une absence de cil (31,33,34) alors que les perturbations du transport rétrograde entraînent des cils courts avec un renflement terminal (35,36).



**Figure 11** Résumé des facteurs régulant l'assemblage et le démontage du cil

Pendant l'élongation du cil, (flèche rouge), les composants de l'IFT, MARK4 et TTBK2 sont recrutés au corps basal. Au même moment les inhibiteurs de la formation du cil sont démobilisés du corps basal: Cep110, Cep97, KIF24 et la trichoplein. L'assemblage du cil est permis par la mobilisation du complexe IFT-B et la disponibilité de tubuline soluble, précurseur axonémal. Les appendices distaux et sub-distaux se transforment en fibres de transition et pieds basaux; et apparaissent la zone de transition et la poche ciliaire nécessaires au trafic ciliaire. Au contraire, pendant le démontage du cil (flèche noire), Cep110, Cep97, KIF24 et la trichoplein sont mobilisés au corps basal, avec d'autres composants du complexe IFT-A, de déacétylation de l'axonème, et dépolymérisation des microtubules et de polymérisation d'actine. D'après Kim and Dynlacht (40)

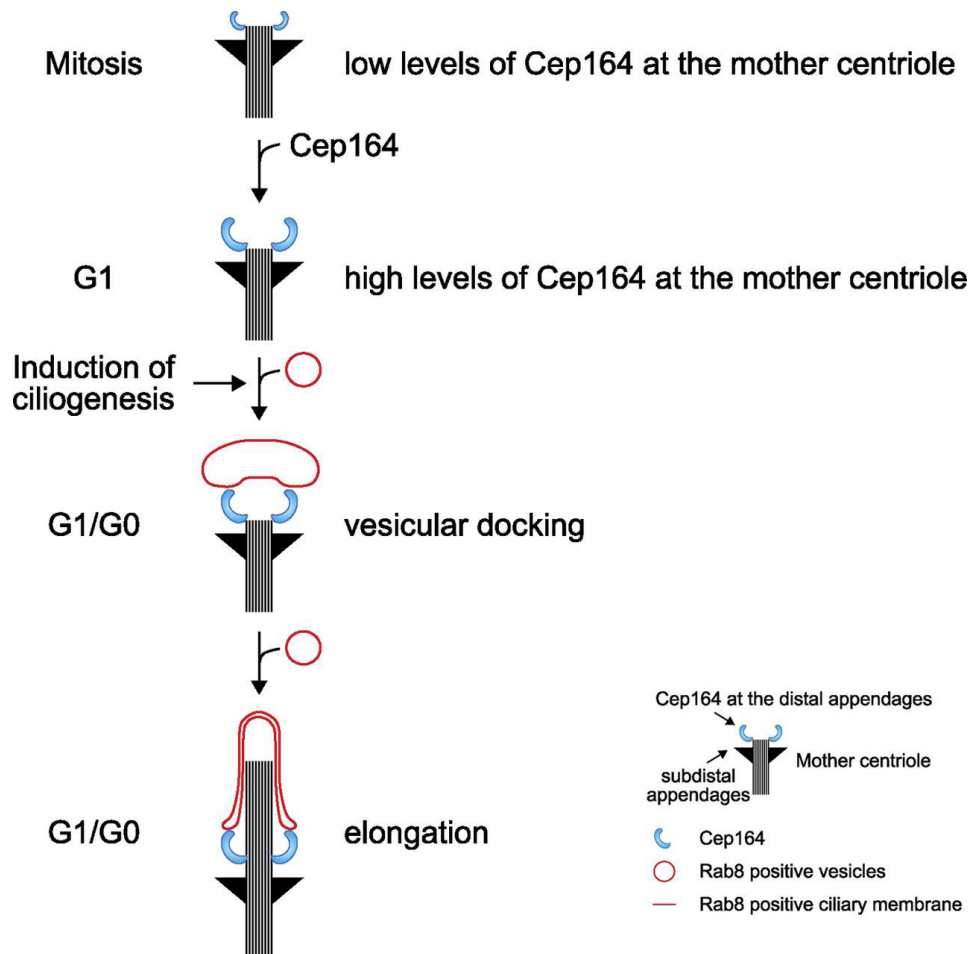
### 3.2.2. *Le corps basal*

La nucléation du cil se fait par le corps basal, issu du centriole mère et de protéines péri-centriolaires.

Les centrosomes sont constitués de deux centrioles cylindriques, appelés centriole mère et centriole fille, et de matériel péri-centriolaire. Ils fonctionnent comme un centre organisateur de microtubules. Pendant le cycle cellulaire, les centrioles forment le fuseau mitotique. Mais quand les cellules entrent en quiescence, le centriole mère se transforme en corps basal et en association avec les protéines péri-centriolaires il permet la formation du cil primaire.

Certaines protéines du corps basal sont nécessaires à la formation du cil. Elles recrutent les protéines cargo du Golgi vers la membrane du cil ou vers l'axonème. La transformation du centriole mère en corps basal se fait par l'apparition des pieds basaux à partir des appendices sub-distaux ancrés aux microtubules cytoplasmiques et des fibres de transition en forme de moulinette issues des appendices distaux.

Le composant majeur de ces fibres de transition est Cep164 (Figure 12), qui est nécessaire à la ciliogenèse qu'il assure d'une part par la stabilisation de ces fibres de transition et d'autre part par la fusion aux composants du trafic vésiculaire (41).



**Figure 12** Modèle de la fonction de Cep164 pendant la ciliogenèse

A la fin de la mitose, il y a augmentation de la quantité de Cep164 au niveau du centriole mère, atteignant sa concentration maximale en interphase. Au moment de l'induction de la ciliogenèse, Cep164 est nécessaire au recrutement de Rab8a et à l'ancrage des vésicules au centriole mère pour initier la formation du cil. D'après Kerstin N. Schmidt et al. (41)

A un stade très précoce de la ciliogenèse, une vésicule ciliaire couvre la partie distale du centriole mère. Cette vésicule fusionne ensuite avec des vésicules secondaires pour finalement former la membrane ciliaire. Ceci se fait par l'intermédiaire des vésicules ciliaires via l'interaction avec Rab8a (42), une guanine nucleotide exchange factor (GEF) qui interagit avec la GTPase Rabin8 (Figure 13). Ainsi Rab8a s'intègre à la membrane ciliaire.

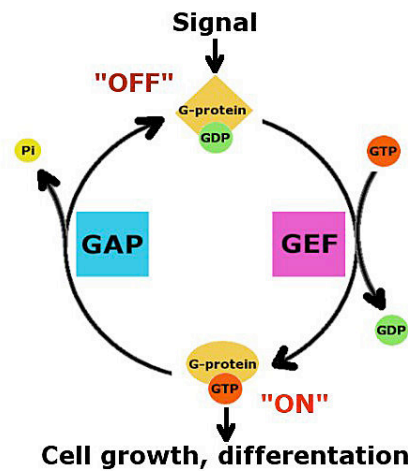


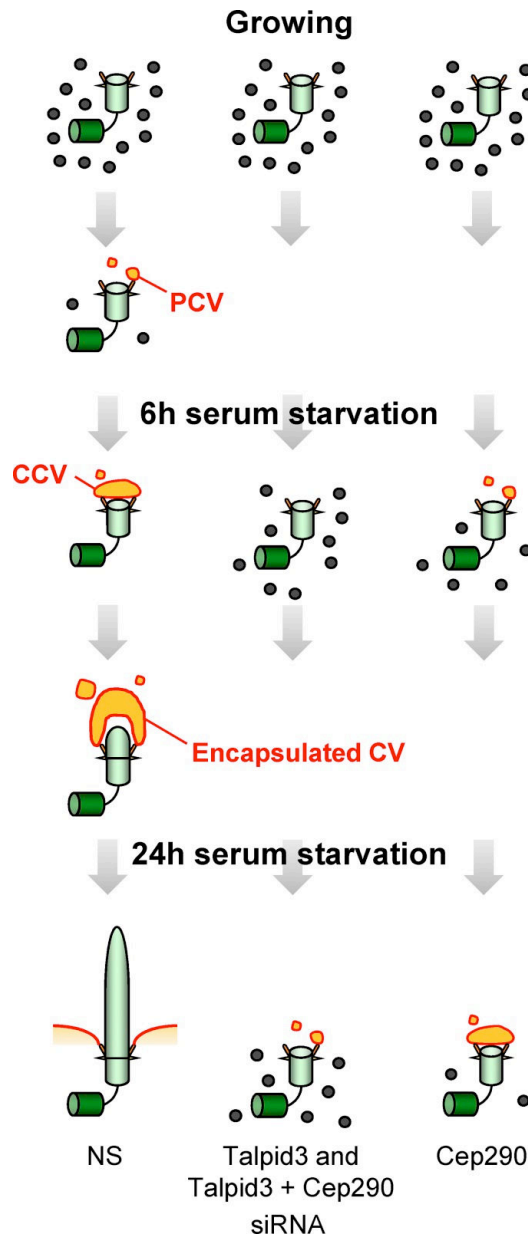
Figure 13 Le cycle GTPase

Les protéines de la superfamille Ras fonctionnent comme des interrupteurs permettant un état « on » (lié au GTP)/et « off » (lié au GDP). Les GEF (guanine nucleotide exchange factor) facilitent l'état « on » alors que les GAP (GTPases activating proteins) au contraire facilitent l'état « off ».

Image provenant de [http://www.mpi-dortmund.mpg.de/37324/GTPase\\_Cycle](http://www.mpi-dortmund.mpg.de/37324/GTPase_Cycle)

Les satellites centriolaires sont des particules denses aux électrons qui entourent le centriole. Ils sont composés de protéines comme Cep290. Cette protéine joue un rôle dans l'intégration de Rab8a à la membrane ciliaire et est nécessaire à la ciliogenèse (43). Elle est localisée au centrosome et dans les satellites péri-centriolaires. Une autre protéine, Cep110, empêche la ciliogenèse en recouvrant la partie la plus distale du centriole mère et en remodelant les microtubules, en interagissant avec Cep290 et Rab8a (44). Parmi les protéines interagissant avec Cep110 se trouve Talpid3. Elle est connue chez le poulet, la souris et le poisson-zèbre, et chez l'homme sous le nom de KIAA0586. Elle interagit fortement avec Cep110 (45). Talpid3 est localisée au centrosome, à l'extrémité distale du centriole dans les cellules quiescentes et pendant le cycle cellulaire. Elle forme un anneau autour de Cep110. Les domaines impliqués dans la localisation de Talpid3 au centrosome chez l'homme sont la partie centrale comprenant le domaine coil-coiled (AA466-500) et un domaine en N terminal de la protéine. Talpid3, en modèle cellulaire humain, est spécifique de la ciliogenèse, et non pas par une modification de l'architecture du centriole/corps basal (45). D'un point de vue mécanistique, et dans ces modèles cellulaires, Talpid3 joue sur la localisation au centrosome de Cep290. En l'absence de Talpid3, Cep290 se délocalise du centrosome et se concentre au niveau des satellites autour du centrosome ; et ainsi le cil ne peut plus être construit (Figure 14) (45). Talpid3 permet à Rab8a de se localiser proche du centrosome avant l'assemblage de l'axonème ciliaire et d'agir, et ce en amont de Rab8a activé (lié au GTP) ; en permettant le turnover via la dispersion des satellites péri centriolaires. A l'échelle cellulaire, Talpid3 agit

en amont de Cep290 et permet d'abord la dispersion correcte des satellites péri centriolaires, puis la formation initiale de la vésicule ciliaire. Elle se fait par la transition de la vésicule ciliaire primitive (PCV) en vésicule ciliaire plafonnée (CCV capped ciliary vesicle), étapes précédant la mise en place du corps basal (Figure 14).



**Figure 14** Modèle résumant les rôles de Talpid3 et/ou Cep290 pendant la ciliogenèse

Au fur et à mesure que le cil se construit, il y a une dispersion des satellites péri centriolaires puis la formation de vésicules à l'extrémité distale du centriole mère au niveau des appendices distaux, fusion puis agrandissement de cette vésicule primaire en une vésicule de plus grande taille. Talpid3 serait nécessaire à la dispersion des satellites péri centriolaires et à la formation de la toute première vésicule péricentriolaire, via une interaction indirecte avec l'ancrage de Rab8a aux fibres de transition du corps basal.  
 PCV : vésicule ciliaire primaire (primary ciliary vesicle) ; CCV : vésicule ciliaire capped ciliary vesicle ; CV : ciliary vesicle. D'après Kobayashi et al. (45)

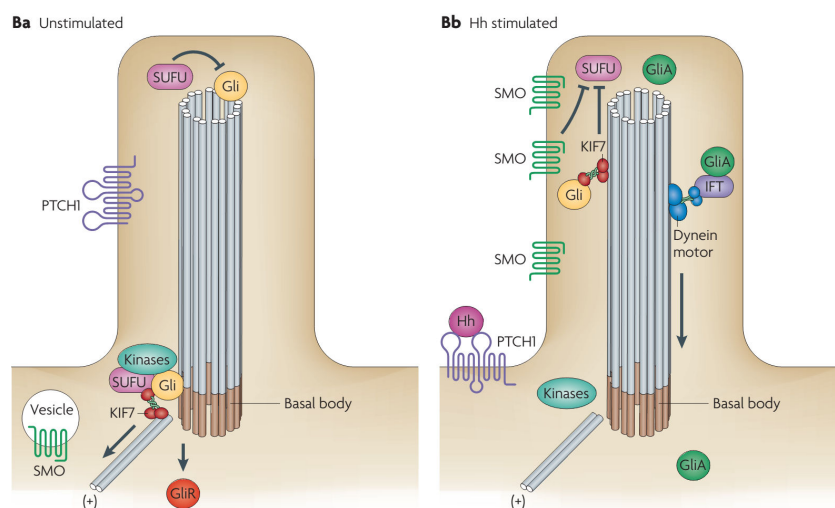
### 3.3. Voies de signalisation du cil

L'une des complexités de la fonction ciliaire vient de la diversité des voies de signalisation dans lesquelles le cil primaire est impliqué.

#### 3.3.1. La voie de signalisation hedgehog (Hh)

*Fonctionnement :*

Les protéines Hh se lient au récepteur transmembranaire Ptch chez les mammifères (Figure 15). Cette liaison est clé pour l'activation de Smo, autre récepteur transmembranaire, transducteur universel de l'activité de la voie Hh. Les effecteurs de la voie Sonic Hh (Shh) sont les facteurs de transcription Gli. Chez les vertébrés, 3 protéines Gli sont impliquées dans la réponse transcriptionnelle à la voie sonic Hh. Les protéines Gli2 et Gli3 possèdent deux domaines : un domaine activateur et un domaine répresseur qui flanquent un domaine de liaison à l'ADN. En l'absence de signalisation hedgehog, Gli3 subit un clivage protéique qui mène à une protéine tronquée qui fonctionne comme un répresseur des gènes cibles de la voie. L'activation de la voie mène à une suppression de ce clivage et à l'apport dans le noyau de la forme active non clivée (full length) de la protéine Gli3 entraînant l'expression des gènes cibles, alors que d'autres gènes cibles deviennent actifs du fait de la déplétion de la forme répressive de Gli3.



**Figure 15 Transduction du signal de la voie *Shh* chez les mammifères**

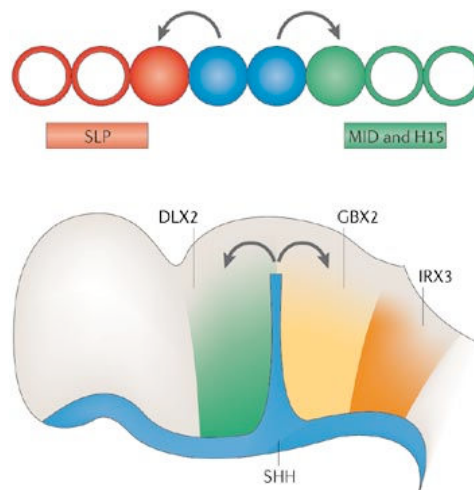
Figure de gauche: en l'absence de ligand, Ptch1 inhibe Smo et se localise dans le cil. KIF7 forme un complexe à la base du cil avec Gli (facteur de transcription) maintenu sous sa forme répressive clivée par des kinases et SUFU. Figure de droite: en présence de ligand Shh, Smo est transloqué à la membrane du cil, et le complexe est libéré : KIF7 est déplacé vers le cil, libère SUFU et les kinases permettant l'activation de Gli. Gli activé est transporté via l'IFTA hors du cil vers le noyau. D'après Goetz and Anderson (46).

Les gènes cibles des facteurs de transcription Gli sont des gènes impliqués dans la morphogénèse, en particulier des gènes *Hox* (*Homeobox*), des gènes codants pour des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire comme Bcl2, la Cycline D1 ou Pdgfr. La voie Shh est active ou inactive en fonction des tissus. Les Ift et les protéines du corps basal jouent sur la synthèse des Gli-A, et sur la synthèse des Gli-R. Ainsi, pour une invalidation donnée d'une protéine Ift ou d'une protéine du corps basal, il y aura un patron tissu spécifique de perte de Gli-A ou de Gli-R. Ce patron diffère d'une espèce à l'autre pour une même protéine ciliaire.

*Rôles dans le développement embryonnaire:*

La voie de signalisation Shh est déployée pour orchestrer la morphogénèse du système nerveux central et des membres dans de nombreuses espèces, et en particulier chez l'homme (voir premier chapitre).

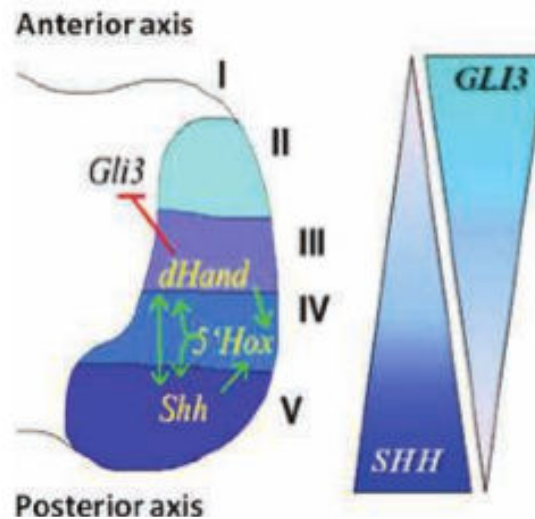
Au niveau cérébral, dans le diencéphale, il existe une zone limitans intrathalamica (ZLI) où les cellules expriment Shh (Figure 16). La compétence des cellules adjacentes à la réponse du signal Shh dépend de l'expression de facteurs de transcription autres (Dlx2, Gbx2, Irx3). Ceci montre que la complexité du SNC chez les vertébrés est orchestrée par des différences régionales de réponse des cellules à la signalisation Shh.



**Figure 16 Morphogène Shh dans le cerveau des vertébrés**

La morphogénèse du cerveau des vertébrés est établie par le signal Shh de la zona limitans intra thalamica (ZLI) et une réponse à ce signal spatio-dépendante des cellules alentour. D'après P. W. Ingham and M. Placzek. (47)

Au niveau des membres, la voie Shh est déterminante pour l'établissement du nombre de doigts et leur identité, en interaction avec le facteur de transcription Gli3 (27). Le bourgeon de membre se développe dans un renflement cellulaire de la plaque mésodermique latérale couvert par une gaine de cellules d'origine ectodermique. Trois centres organisateurs interviennent : la crête apicale ectodermique, l'ectoderme de surface et la zone d'activité polarisante (ZPA). Shh est exprimé au niveau de la ZPA selon un gradient antéro postérieur (Figure 17). Les concentrations fortes de Shh sont au niveau postérieur et les zones correspondantes formeront le cinquième doigt. A l'inverse les cellules les moins exposées à Shh formeront le pouce. Il existe un gradient inverse de la protéine Gli3, antagoniste de Shh. L'identité des doigts va également dépendre du ratio entre les formes actives et répressives de Gli3.



**Figure 17 Bourgeon de croissance des membres**

A gauche, 5 zones correspondront ultérieurement aux 5 doigts. A droite, schématisation du gradient Shh et Gli3 avec antagonisme au niveau des membres. Shh est activée par les gènes dHand et HoxD. D'après Malik et al., (49).

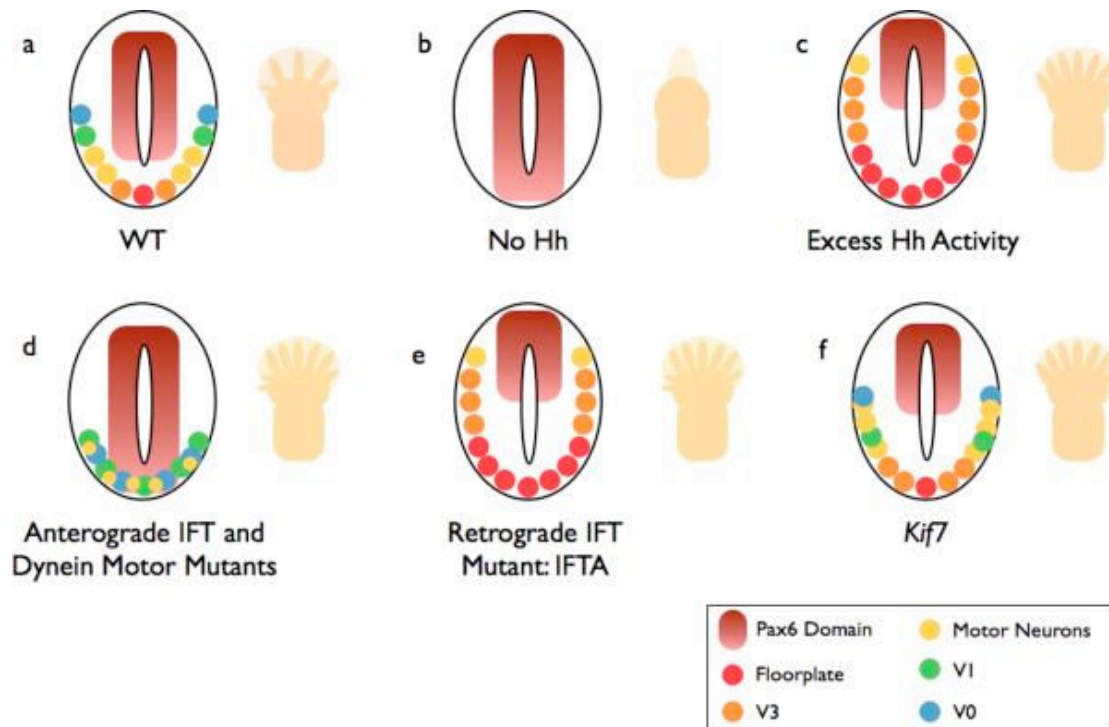
#### *Lien entre voie Shh et cil :*

Le phénotype des vertébrés ayant une voie Sonic Hedgehog (Shh) perturbée est bien connu. En l'absence de Shh, le phénotype comprend une perte de ventralisation des cellules du tube neural et une perte de doigts. L'excès de sonic donne un phénotype inverse (Figure 18). A partir d'embryons de souris ayant un phénotype compatible avec un défaut de signalisation Shh, une recherche de mutation a permis de montrer que les gènes du cil primaire, et en particulier du complexe Ift (50), ou du corps basal (51) étaient impliqués. Ceci a établi le lien entre cil et voie Hedgehog. Sur la base de ces découvertes, on a pu montrer que tous les composants clés de la voie Hedgehog sont localisés ou plus exactement enrichis dans le cil primaire. Par exemple, Smo et Ptch1, deux récepteurs protéiques à 7 domaines



transmembranaires, circulent dans le cil de manière ligand dépendante. : Ptc1 est localisé au niveau de la membrane du cil en l'absence de ligand (52) et inhibe Smo, En présence de ligand, il y a levée de l'inhibition de Ptc1 sur Smo, et Smo se retrouve dans le cil (53).

De même les facteurs de transcription Gli sont enrichis dans le cil. Cet enrichissement des molécules de la voie Shh au cil facilite leurs interactions et permet une mobilité orchestrée de chacune d'entre elles.



**Figure 18 Phénotype cérébral et des membres chez les mutants de la voie *Shh* et du cil primaire**

a. Chez les embryons murins sauvages, les cellules ventrales neurales se spécifient selon un gradient de Shh. Le nombre et l'identité des doigts sont établis par un gradient antéro-postérieur de Shh, les cellules postérieures étant le plus exposées à Shh et formant le 5<sup>e</sup> doigt. Au niveau antérieur, la forme répressive de Gli3 inhibe Shh. b. en l'absence de Shh, il y a perte des cellules ventrales neurales, et une oligodactylie. c. En cas d'hyperactivation de la voie Shh, il y a une hyperventralisation des cellules neurales et une polydactylie. d. les mutants Ift-B. (Ift88 ou Ift172) n'ayant pas de cil primaire ont une diminution de l'activité Shh entraînant une dorsalisation du tube neural. La balance entre Gli3R et Gli3A est perturbée et résulte en une polydactylie. e. Les mutants Ift-A (Ift139) ont un équivalent d'excès d'activation de la voie, comme les mutants Kif7 avec pour conséquence une expansion des cellules requérant des niveaux modérés de Shh. D'après Goetz and Anderson, (46).

### 3.3.2. La voie de signalisation *wnt*

La plupart des cellules ont un cil et pourtant peu d'entre elles répondent à la voie Shh. Ceci a fait émettre l'hypothèse que d'autres voies de signalisation pouvaient dépendre du cil primaire, comme la voie Wnt. Le cil pourrait participer au switch entre la voie canonique et la voie non canonique de Wnt, et inversement, la formation du cil est régulée par certaines voies de signalisation dont la voie Wnt.

La voie de signalisation Wnt est hautement conservée chez les vertébrés et les invertébrés. Elle est composée de ligands Wnt et de récepteurs Frizzled (Fz) dont il existe de nombreux types. Il existe deux branches de cette voie (Figure 19): la voie canonique dépendante de la bêta-caténine, et la voie non-canonique indépendante de cette dernière. Le switch de l'une vers l'autre se fait par la protéine dishevelled (Dvl), qui se trouve localisée à la membrane plasmique pour la voie canonique et dans le noyau pour la voie non canonique.

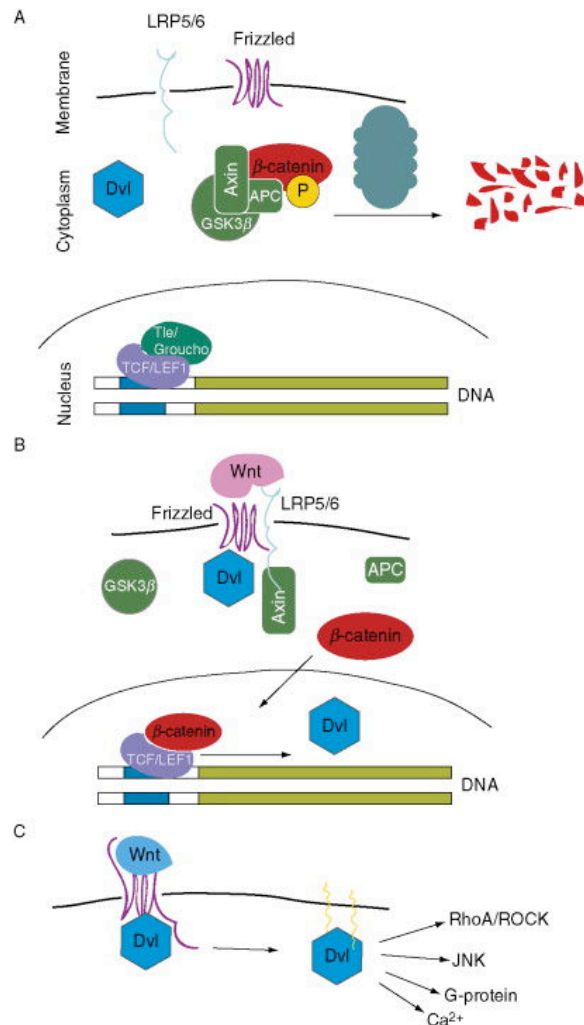
*Voie canonique :*

En l'absence de ligand, la bêta-caténine cytoplasmique est phosphorylée puis dégradée. La répression transcriptionnelle des gènes cibles de la voie se fait par le complexe Tle/Groucho fixé aux éléments transcriptionnels TCF (T-cell transcription factor) et LEF1 (lymphoid-enhancer-binding factor 1).

En présence de ligand, le complexe de dégradation de la bêta-caténine est dissocié, et la bêta-caténine active entre dans le noyau pour retirer le complexe Tle/Groucho et permettre la transcription des gènes cibles de la voie.

*Voie non-canonique ou PCP*

Le ligand Wnt se fixe au récepteur Frizzled et active Dvl associé à la membrane. Celui-ci active les voies non canoniques Rho, Jnk, la protéine G ou le signal Ca<sup>2+</sup>. L'une des voies est exclusive de l'autre. Autrement dit il existe un système de switch éteignant la voie canonique en cas de signalisation non canonique. Par exemple Wnt5a de la voie non canonique antagonise Wnt3a de la voie canonique (54).



**Figure 19 Schéma de la voie Wnt**

A/ En l'absence de ligand Wnt extracellulaire, la bêta-caténine est phosphorylée de manière constitutive par le complexe de destruction de la bêta-caténine et adressée pour une dégradation par le protéasome. Les facteurs de transcription TCF/LEF1 forment un complexe avec les protéines Tle/Groucho pour réprimer la transcription des gènes cibles de bêta-caténine/TCF/LEF1.

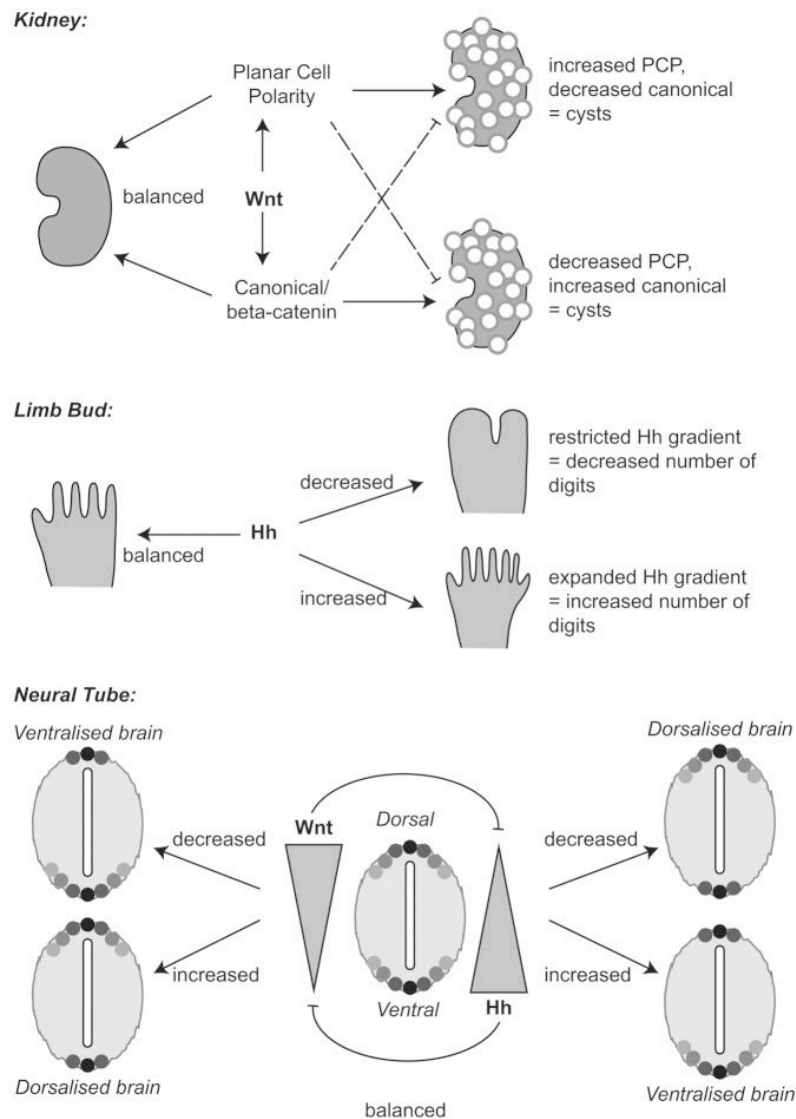
B/ Dans la voie Wnt canonique bêta-caténine dépendante, le ligand Wnt se lie au récepteur hétérodimérique frizzled (Fz) et son co-récepteur LRP5/6 provoquant la dissociation du complexe de destruction de bêta-caténine. La bêta caténine et Dishevelled (Dvl) sont localisés dans le noyau ou ils déplacent Tle/Groucho permettant la transcription des gènes cibles de la voie.

C/ Le ligand Wnt se lie au récepteur Fz et active Dvl qui se lie à la membrane et active les gènes cibles de la voie non canonique : RhoA/ROCK, JNK, protéine G ou la signalisation Ca<sup>2+</sup>. D'après Gerdes et al.(54)

La voie Wnt est impliquée dans la polarité cellulaire planaire (PCP), processus par lequel les cellules deviennent polarisées dans le plan d'un épithélium. Il permet à la cellule d'orienter ses divisions selon un axe bien précis. Ce mécanisme est essentiel aux mouvements morphogénétiques **d'extension convergence** permettant la mise en place des trois feuilletts embryonnaires pendant la gastrulation : mésoderme, ectoderme et endoderme ; à la fermeture du tube neural, et à l'allongement des tubules rénaux.

Les voies Wnt canonique et non canonique sont essentielles à la **néphrogenèse** : induction du mésenchyme métanéphrique et tubulogénèse. Un défaut de ces voies provoque la formation de kystes rénaux (55)(56) (Figure 20).

La voie de signalisation Wnt régule également la **latéralité gauche droite** mise en place dans le nœud de Hensen, par l'intermédiaire de *Cerl2* qui joue sur l'activité *Nodal* (57).



**Figure 20** Voies de signalisation Hedgehog et Wnt dans le développement des reins, des membres et du cerveau

Dans les reins, l'équilibre entre la voie de signalisation Wnt canonique et non canonique doit être maintenu. Une dérégulation dans un sens ou dans l'autre provoque le développement de kystes rénaux. Dans les membres c'est la voie Shh qui est en jeu avec polydactylie en cas d'hyperactivation de la voie. Dans le tube neural, les deux voies déterminent la spécification axiale du tube neural avec des gradients opposés l'un à l'autre. La voie Wnt a aussi un rôle important dans la migration neuronale. D'après A.R. Barker et al., (122)

#### 4. CILIOPATHIES

Le cil primaire est impliqué dans de nombreux processus de l'embryogenèse comme la mise en place du tube neural, l'asymétrie gauche-droite, la mise en place des membres, du squelette, de la tubulogenèse rénale. La présence d'un cil primaire à la surface de quasiment

toutes nos cellules explique qu'un défaut de biogenèse ou de la fonction du cil primaire puisse avoir un effet pléiotropique, touchant principalement le cerveau, la rétine, les membres, le squelette, les reins, le foie. Le regroupement de certains signes entre eux définissent des syndromes, regroupés sous le terme de ciliopathies. Un défaut de ciliogenèse entraîne entre autre un défaut de transduction de la voie Shh, en aval de Smo et en amont des protéines Gli. Les ciliopathies sont des maladies complexes. La première identifiée a été la dyskinésie ciliaire primitive par défaut des cils mobiles de l'épithélium respiratoire, associée à un *situs inversus* dans le cadre d'un syndrome de Kartagener (OMIM 244400). Depuis 2006, de nombreux syndromes ont été attribués à un défaut du cil primaire comme la néphronoptise (OMIM 256100) et le syndrome de Senior Loken, la polykystose rénale autosomique dominante (OMIM 173900), le syndrome de Bardet-Biedl (OMIM 209900), les syndromes orofaciodigitaux, les syndromes de Joubert (OMIM 213300) et Meckel (OMIM 249000), le syndrome de Jeune (OMIM 208500) et autres syndromes côtes-courtes polydactylies , et certaines rétinoopathies (amaurose congénitale de Leber, OMIM 204000).

#### 4.1. Les ciliopathies avec atteinte squelettique

Elles sont constituées du groupe des côtes courtes-polydactylies (CCP) et du syndrome de Sensenbrenner d'hérédité autosomique récessive, de la dysostose acrofaciale de Weyers (58) autosomique dominante et du syndrome de Mainzer-Saldino (Table 3).

Le groupe des CCP comprend 7 conditions: les CCP type I à V létales, et les syndromes d'Ellis Van Creveld (EVC) et de Jeune viables. Il est caractérisé par un thorax étroit, des côtes courtes, des os courts tubulés, et un toit acétabulaire en trident. La polydactylie est fréquemment observée dans les CCP type I à III et EVC et plus rarement dans les CCP de type IV et le syndrome de Jeune. Il existe un chevauchement phénotypique entre les différentes formes de CCP qui diffèrent selon l'aspect métaphysaire et les malformations viscérales.

La fonction des protéines impliquées est variable. Il peut s'agir de protéines des complexes IFT-A et B, des moteurs de dynéine, ou du corps basal. La conséquence peut être soit une hyper soit une inactivation de la voie Shh.

Table 3 : Ciliopathies avec dysplasie squelettique

CCP et syndromes apparentés	OMIM	Localisation	Hérédité	Gènes	Principaux Signes cliniques	Références
<b>CCP type I Saldino Noonan</b>	263530		AR		Os extrêmement courts- défaut d'ossification des vertèbres, pelvis, mains, pieds, reins polykystiques, transposition des gros vaisseaux Très rare	Saldino et Noonan, 1972 ; Elçioglu et Hall, 2002
<b>CCP type II Majewski</b>	263520	4q33 11q22.3	AR	<i>NEK1</i> <i>DYNC2H1</i> ( <i>digenisme</i> )	os courts, tibia plus court que fibula, polysyndactylies pré et postaxiales fréquentes, reins polykystiques, fente labiopalatine, malformation du larynx et de l'épiglotte, rénales, génitales, intestinales	Majewski 1971 Chen 1980 Merill et al., 2009 ; Thiel et al., 2011 ; Cooper et al., 1982 Shalom et al., 2008
<b>CCP type III Verma Naumoff</b>	263510	11q22.3 3q25.33 9q34.11 7q36.3	AR	<i>DYNC2H1</i> <i>IFT80</i> <i>WDR34</i> <i>WDR60</i>	ATD létale	Naumoff et al., 1977; Meizner et Barnhard 1995 Wu et al. 1995 Dagoneau et al., 2009 Cavalcanti et al., 2011
<b>CCP type IV Beemer-Langer</b>	269860		AR		Type II avec tibia plus long que péroné et anomalies cérébrales, sans polydactylies post axiale	Beemer et al. 1983 Cideciyan et al. 1993 Kovacs et al., 2006
<b>CCP type V</b>	614091	2p24.1	AR	<i>WDR35</i>	anomalies faciales semblables au CCP type III, cotes courtes polysyndactylie, reins polykystiques, anomalies de la latéralité, hypominéralisation acromésomélique et campomélie	Mill et al., 2011
<b>Syndrome de Jeune (ATD)</b>	208500	2p23.3 3q25.33 11q22.3 2q24.3 4p14 9q34.11 7q36.3 16p13.3 3q29	AR	<i>IFT172</i> <i>IFT80</i> <i>DYNC2H1</i> <i>TTC21B</i> <i>WDR19</i> <i>WDR34</i> <i>WDR60</i> <i>IFT140</i> <i>TCTEX1D2</i> <i>CEP120</i>	Signes squelettique des CCP, décès précoces, anomalies rénales hépatique et de la rétine	Jeune et al. 1955 Morgan et al., 2003; Davis et al., 2011 ; Dagoneau et al., 2009 Beales et al., 2007; Schmidts et al. 2013
<b>EVC</b>	225500	4p16.2 4p16.2	AR	<i>EVC1</i> <i>EVC2</i> <i>DYNC2L1I</i>	Polydactylie post axiale, cardiopathie congénitale, anomalies des ongles et des dents, et labio gingivales	Ruiz-Perez et al., 2000 Galdzicka et al., 2002 Blair et al., 2011 ;
<b>Dysplasie cranio-ectodermique / Sensenbrenner</b>	218330 613610 614099 614378	3q21q22 2p24.1 14q24.3 4p14	AR	<i>IFT122</i> <i>WDR35</i> <i>IFT43</i> <i>WDR19</i>	Anomalies squelettiques cranio-faciales, craniosténose, thorax étroit, anomalies dentaires et des cheveux, anomalies variables des reins, du cerveau et de la rétine	Sensenbrenner et al 1975 Walczak-Sztulpa et al., 2010 ; Gillissen et al., 2010
<b>Dysostose acrofaciale de Weyers</b>	193530	4p16.2	AD	<i>EVC2</i>	Polydactylie post axiale, anomalies de la machoire inférieure, de la dentition (incisives) et du vestibule oral, dysplasie des ongles, petite taille.	Weyers et al. 1952 Curry and Hall, 1979 Roubiceck and Spranger 1984
<b>Saldino-Mainzer</b>	266920	2p23.3 16p13.3	AR	<i>IFT172</i> <i>IFT140</i>	LCA, néphronophtise juvénile familiale et épiphyses en cône des mains	McInerney et al. 2014 Perrault et al. 2012

#### 4.2. Les syndromes orofaciodigitaux

Les syndromes orofaciodigitaux (OFD, OMIM 311200) constituent un ensemble de syndromes qui partagent une atteinte orale faciale et digitale. D'autres organes peuvent être atteints définissant spécifiquement chaque type d'OFD. Jusqu'à ce jour 14 types ont été définis en se basant principalement sur les caractéristiques cliniques.

Dans le syndrome OFDI de Papillon Leage-Psaume (59), les anomalies de la face sont les suivantes : un hypertélorisme, un épicanthus, des fentes palpébrales obliques en bas et en dehors, une fente labiale. Les anomalies de la cavité orale sont des fentes palatines, des hamartomes linguaux, des freins multiples, une langue bifide et ou de anomalies des dents. Les anomalies des extrémités comportent des brachy-poly-syn-clinodactylies (60,61). Il est caractérisé par une hérédité dominante liée à l'X avec une létalité embryonnaire chez les garçons (62,63). Il est dû à des mutations du gène *OFDI*. Les signes associés fréquents sont une agénésie du corps calleux dans 40% des cas, une polykystose rénale progressive (64,65), et des anomalies de la peau et des phanères à type d'alopecie, de xérose cutanée et de granules au niveau de la face (66,67). C'est le plus fréquent des syndrome OFD avec une incidence de 1/50000 naissances (60). Il est habituellement diagnostiqué pendant l'enfance mais parfois chez l'adulte devant la découverte de reins polykystiques (68). Le pronostic est à la défaillance rénale ou à l'épilepsie. La pénétrance est variable et il y a une grande variabilité phénotypique au sein d'une même famille par biais d'inactivation de l'X (69). OFD1 est une protéine régulatrice de la longueur du centriole par une interaction avec C2CD3. En effet, une hyper-expression de C2CD3 provoque un allongement du centriole, antagonisée par OFD1. Les deux protéines co-localisent à l'extrémité distale du centriole et interagissent physiquement l'une avec l'autre (70). OFD1 est nécessaire à la formation des appendices distaux, au recrutement d'IFT88 et à la formation du cil primaire. OFD1 est également localisée au niveau des satellites péri-centriolaires où elle interagit avec PCM-1 et Cep290. La perte d'OFD1 au niveau des satellites péri-centriolaires pour des cellules en interphase est nécessaire à la formation du cil et se fait par un mécanisme appelé autophagie (71).

Les autres types d' OFD sont résumés ci-dessous (Table 4).

Table 4 : syndromes oro-facio-digitaux

Type	OMIM	Localisation	Gène	Signes cliniques caractéristiques	Hérédité	Références
<b>OFDI-Syndrome de papillon-Leage-Psaume</b>	311200	Xp22.2	<i>OFD1</i>	absence de dents, fente labiale, lésion de la peau, alopecie, reins polykystiques	DLX	Ferrante et al., 2001 ; Guerrieri et al., 2007 ; Coene et al., 2009
<b>OFDII -syndrome de Mohr</b>	252100			surdité de transmission	AR	Gustavson et al., 1971 ; Gurrieri et al., 2007 ;
<b>OFDIII- syndrome de Sugaman</b>	258850	16q23.1	<i>TMEM231</i>	strenum court, pectum excavatum, syphose	AR	Smith et al., 1993 ; Gurrieri et al., 2007 ;
<b>OFDIV- syndrome de Mohr-Majewski</b>	258860	10q24.1	<i>TCTN3</i>	dysplasie tibiale, petite taille	AR	Baraitser et al., 1983 ; Gurrieri et al., 2007
<b>OFDV- syndrome de Thurston</b>	174300			freins buccaux multiples	AR	Munke et al., 1990 ; Gurrieri et al., 2007
<b>OFDVI- syndrome de Varadi</b>	277170	5p13.2 11q12.2	<i>C5Orf42</i> <i>TMEM216</i>	anomalie métacarpe en Y, polydactylie centrale, anomalies cérébelleuses	AR	Doss et al., 1998 ; Gurrieri et al., 2007 Valente et al., 2010
<b>OFDVII-syndrome de Whelan</b>	508518			hydronéphrose	AR	Whelan et al., 1975 ; Gurrieri et al., 2007
<b>OFDVIII-syndrome d'Edwards</b>	300484			hypoplasie de l'épiglotte, non létale chez les garçons	RLX	Edwards et al., 1988 ; Gurrieri et al., 2007
<b>OFDIX- syndrome de Guerrieri</b>	258865	4q28.2 6q22.31	<i>SCLT1</i> <i>TBC1D32</i>	orteils bifides et anomalies rétinienne	AR/RLX	Gurrieri et al., 1992 ; Gurrieri et al., 2007
<b>OFDX- syndrome de Figuera</b>	165590			agénésie du péroné , et radius court	AR	Figuera et al., 1993 ; Gurrieri et al., 2007
<b>OFDXI- syndrome de Gabrielli</b>	612913			anomalies cranio-vertébrales	AR	Gabrielli et al., 1994 ; Gurrieri et al., 2007
<b>OFDXII-syndrome de Moran-Barroso</b>				anomalies cardiaques avec myéломéningocèle et sténose de l'aqueduc de Sylvius	AR	Morán-Barroso et al., 1998 ; Gurrieri et al., 2007
<b>OFDXIII-syndrome de Degner</b>				leukoaraiosis et anomalies neuropsychiques avec épilepsie	AR	Degner et al., 1999 ; Gurrieri et al., 2007
<b>OFDXIV</b>	615944	11q13.4	<i>C2CD3</i>	microcéphalie	AR	Thauvin-Robinet et al. 2014

#### 4.3. Syndromes hydrolethalus et acrocalleux

Le syndrome hydrolethalus (HLS) est constamment létal. Il associe des anomalies majeures du système nerveux central, une polydactylie post-axiale des membres supérieurs et pré-axiale des membres inférieurs, un micrognathisme, des sténoses trachéales et ou laryngées, et des anomalies de la lobulation pulmonaire. Les anomalies cérébrales possibles sont une



hydrocéphalie obstructive par fusion des thalami, une absence de structures médianes dont le corps calleux, une polymicrogyrie et un défaut de l'os occipital en trou de serrure en regard du foramen magnum. Un hydramnios est fréquent (par sténose trachéale et défaut de commande centrale). D'autres signes moins fréquents existent comme les fentes labio-palatines, les anomalies linguales.

Le premier gène identifié dans le syndrome HLS est *HYLS1* (OMIM 610693). En 2011, des mutations du gène *KIF7* ont été identifiées chez des fœtus avec HLS, ainsi que des patients présentant un syndrome acrocalleux caractérisé par une macrocéphalie, une dysmorphie, une polydactylie, une agénésie du corps calleux et un déficit intellectuel, démontrant que le syndrome HLS était l'extrême phénotype du syndrome acro-calleux viable.

#### 4.4. **Syndrome de Joubert et Meckel**

##### *Le syndrome de Joubert*

Le syndrome de Joubert (JBTS) a une prévalence de 1/100 000 (72). Il comprend une déficience intellectuelle ou un retard de développement psychomoteur, une hypotonie (73) et un signe pathognomonique à l'IRM : le signe de la dent molaire (74)(75), qui reflète une aplasie ou une hypoplasie vermienne, une anomalie du 4<sup>e</sup> ventricule, une élongation et une horizontalisation des pédoncules cérébelleux supérieurs et une fossette interpédonculaire marquée. Au niveau neuropathologique (76), la « dent molaire » résulte d'un manque de décussation au niveau des pédoncules supérieurs et au niveau des faisceaux pyramidaux, qui laissent suspecter une anomalie de guidance axonale unique au syndrome de Joubert parmi les ciliopathies, dont le substratum physiologique reste inconnu à ce jour. Pourtant les anomalies du corps calleux sont rares dans ce syndrome. Ce défaut de décussation a pu être confirmé par imagerie DTI (77). D'autres signes cliniques peuvent être associés comme des irrégularités respiratoires à type d'apnée ou tachypnée, une apraxie oculomotrice ou des mouvements oculaires anormaux. Une dysmorphie et une polydactylie (dans 10 à 15% des cas) sont souvent associées (78). D'autres signes cliniques peuvent être associés dans les syndromes COACH (colobome-oligophrénie-ataxie-hypoplasie cérébelleuse- fibrose hépatique) et CORS (cérébelleux-oculo-rénal). Le pronostic du syndrome de Joubert est variable. Certains enfants meurent dans l'enfance alors que d'autres vivent avec une déficience intellectuelle variable (78). La moitié des enfants acquerront la marche avec une démarche ataxique. La prise en charge de ces enfants doit être pluri-disciplinaire. La fonction rénale et hépatique doit être surveillée (79). Les progrès récents du NGS ont permis d'identifier 28 gènes responsables de ce syndrome à ce jour, tous impliqués dans la fonction ciliaire.

### *Le syndrome de Meckel*

Le syndrome de Meckel (MKS) est l'extrême phénotype létal du syndrome de Joubert. Il est caractérisé par des anomalies de la fosse postérieure de type encéphalocèle occipitale le plus souvent, de gros reins polykystiques bilatéraux, une polydactylie et des anomalies hépatiques de la plaque ductale menant à une fibroadénomatose (80). Son incidence est très rare comparable à celle du JBTS. Les anomalies cérébrales sont constantes mais variables allant d'anomalie du vermis, des malformations du corps calleux à une anencéphalie. La triade anomalies cérébrales, rénales et hépatiques est nécessaire au diagnostic de MKS (81). Une polydactylie post-axiale, des os longs courts et incurvés, une cardiopathie, un colobome, une hypoplasie pulmonaire ou un *situs inversus* sont des signes associés plus rares (81). 24 gènes responsables de syndrome de Joubert et/ou Meckel sont connus à ce jour.

#### 4.5. Néphronophtise et apparentés

La néphronophtise (NPHP) est une maladie tubulo-interstitielle chronique c'est à dire une anomalie localisée initialement au niveau des tubes rénaux et du tissu interstitiel se manifestant dont le début d'apparition est variable, allant de l'enfance à l'âge adulte (OMIM 256100). A un stade avancé de la maladie, des kystes peuvent se former dans la médullaire du rein. Plusieurs gènes sont responsables de la néphronophtise, le plus fréquent est le gène *NPHP1* qui code pour la néphrocystine, et la moitié des patients ont une délétion homozygote de ce gène. Des signes extra-rénaux peuvent être associés à la NPHP. Ainsi, l'association à une atteinte rétinienne définit le syndrome de Senior-Loken (OMIM 266900). Les patients présentant un syndrome de Joubert ou une ciliopathie squelettique peuvent également avoir une NPHP, avec un important chevauchement génétique entre les différentes entités.

#### 4.6. Syndrome de Bardet-Biedl et apparentés

Le syndrome de Bardet-Biedl (BBS, OMIM209900) est une ciliopathie définie par la combinaison d'une obésité, une rétinopathie pigmentaire, une polydactylie post-axiale, une atteinte de la fonction rénale, un hypogénitalisme et des difficultés d'apprentissage. L'expression clinique est très variable d'un individu à l'autre, et de signes mineurs peuvent être associés de façon moins constante comme un diabète, une hypertension artérielle, une cardiopathie congénitale ou une maladie de Hirschsprung. Comme les autres ciliopathies ; il existe une grande hétérogénéité génétique avec 14 gènes identifiés à ce jour, et un mode de

transmission autosomique récessif, et parfois, un déterminisme oligogénique. Le diagnostic différentiel inclut d'autres syndromes avec obésité et rétinopathie comme le syndrome d'Alström (OMIM 203800), le syndrome de Cohen (OMIM 216550) ou le MORMS (OMIM 610156).

#### 4.7. Chevauchement phénotypique et génétique entre les ciliopathies

En parallèle de l'hétérogénéité et du chevauchement clinique, il existe donc aussi un chevauchement génétique entre les différentes ciliopathies. Les tableaux ci-dessous résument les principaux signes cliniques et gènes impliqués à ce jour illustrant ainsi ces deux concepts (Table 5 et Table 6).

**Table 5 : Chevauchement phénotypique des ciliopathies**

Pathologie :	SRTD	NPHP	BBS	JBTS	OFD	HLS	MKS
<b>Signes cliniques</b>							
<b>Atteinte rénale</b>		NPH	Variable	NPH	Kystes	-	Kystes
<b>Atteinte hépatique</b>		Fibrose	Fibrose	Fibrose	-	-	Fibroadénomatose
<b>Atteinte neurologique</b>				Dent molaire	Dent molaire Agénésie du corps calleux	Hydrocéphalie Anencéphalie	Encéphalocèle Anencéphalie Dent molaire Dilatation du V4
<b>Polydactylie</b>			+	+	+	+	+
<b>Malformations osseuses</b>							RCIU- Incurvations os longs
<b>Atteinte oculaire</b>		Senior-Loken	RP	Nystagmus-Cogan			Microphthalmie
<b>Situs inversus</b>		+/-	+/-	+/-			+/-
<b>Malformations orales</b>					Fente palatine Tumeurs langues Freins	Micrognathie	Fente palatine
<b>Déficience intellectuelle</b>			+	+	+/-	NA	NA
<b>Obésité</b>			+	+/-			
<b>Pathologie :</b>	<b>SRTD</b>	<b>NPHP</b>	<b>BBS</b>	<b>JBS</b>	<b>OFD</b>	<b>HLS</b>	<b>MKS</b>

Table 6 : Chevauchement génétique des ciliopathies

Gène	Locus						
	SRTD	NPHP	BBS	JBTS	OFD	HLS	MKS
<i>NPHP1</i>		<i>NPHP1</i>		<i>JBTS4</i>			
<i>INVS</i>		<i>NPHP2</i>					
<i>NPHP3</i>		<i>NPHP3</i>					<i>MKS7*</i>
<i>NPHP4</i>		<i>NPHP4</i>					
<i>IQCB1</i>		<i>NPHP5</i>					
<i>CEP290</i>		<i>NPHP6</i>	? <i>BBS14</i>	<i>JBTS5</i>			<i>MKS4</i>
<i>GLIS2</i>		<i>NPHP7</i>					
<i>NEK8</i>		<i>NPHP9</i>					
<i>TMEM67</i>		<i>NPHP11</i>	? <i>BBS14</i>	<i>JBTS6</i>			<i>MKS3</i>
<i>RPGRIP1L</i>		<i>NPHP8</i>		<i>JBTS7</i>			<i>MKS5</i>
<i>SDCCAG8</i>		<i>NPHP10</i>	<i>BBS16</i>				
<i>ARL13B</i>				<i>JBTS8</i>			
<i>TTC21B</i>	<i>SRTD4</i>	<i>NPHP12</i>		<i>JBTS11</i>			
<i>WDR19</i>	<i>SRTD5, CED4</i>	<i>NPHP13</i>					
<i>ZNF423</i>		<i>NPHP14</i>		<i>JBTS19</i>			
<i>CEP164</i>		<i>NPHP15</i>					
<i>BBS1</i>			<i>BBS1</i>				
<i>BBS2</i>			<i>BBS2</i>				<i>BBS2*</i>
<i>ARL6</i>			<i>BBS3</i>				
<i>BBS4</i>			<i>BBS4</i>				<i>BBS4*</i>
<i>BBS5</i>			<i>BBS5</i>				
<i>MKKS</i>			<i>BBS6</i>				<i>BBS6*</i>
<i>BBS7</i>			<i>BBS7</i>				
<i>TTC8</i>			<i>BBS8</i>				
<i>PTHB1</i>			<i>BBS9</i>				
<i>BBS10</i>			<i>BBS10</i>				
<i>TRIM32</i>			<i>BBS11</i>				
<i>BBS12</i>			<i>BBS12</i>				
<i>MKS1</i>			<i>BBS13</i>				<i>MKS1</i>
<i>WDPCP</i>			<i>BBS15</i>		<i>OFD</i>		
<i>LZTFL1</i>			<i>BBS17</i>				
<i>BBIP1</i>			? <i>BBS18</i>				
<i>IFT27</i>			? <i>BBS19</i>				
<i>INPP5E</i>				<i>JBTS1</i>			
<i>TMEM216</i>				<i>JBTS2</i>	<i>OFD6</i>		<i>MKS2</i>
<i>AHI1</i>				<i>JBTS3</i>			
<i>CC2D2A</i>				<i>JBTS9</i>			<i>MKS6</i>
<i>B9D1</i>				<i>JBTS</i>			<i>MKS7</i>
<i>TCTN2</i>				<i>JBTS</i>			<i>MKS8</i>
<i>TCTN1</i>				<i>JBTS13</i>			
<i>ATXN10</i>		<i>NPHP*</i>					
<i>OFD1<sup>h</sup></i>				<i>JBTS10</i>	<i>OFD1</i>		
<i>TCTN3</i>				<i>JBTS18</i>	<i>OFD4</i>		<i>MKS</i>
<i>TMEM231</i>				<i>JBTS20</i>	<i>OFD3</i>		<i>MKS11</i>
<i>TMEM237</i>				<i>JBTS14</i>			<i>MKS</i>
<i>TMEM107</i>				<i>JBTS</i>	<i>OFD</i>		<i>MKS13</i>
<i>CEP41</i>				<i>JBTS15</i>			
<i>TMEM138</i>				<i>JBTS16</i>			
<i>C2CD3</i>					<i>OFD14</i>		
<i>TBC1D32</i>					<i>OFD9</i>		
<i>cSORF42</i>				<i>JBTS17</i>	<i>OFD6</i>		
<i>CSPP1</i>				<i>JBTS21</i>			
<i>PDE6D</i>				<i>JBTS22</i>			
<i>SCLT1</i>					<i>OFD9</i>		
<i>DDX59</i>					<i>OFD5</i>		
<i>HYLS1</i>						<i>HLS1</i>	
<i>KIF7</i>				<i>JBTS12</i>		<i>HLS2</i>	
<i>EVC</i>	<i>EVC</i>						
<i>EVC2</i>	<i>EVC2</i>						
<i>IFT80</i>	<i>SRTD2</i>						
<i>DYNC2H1</i>	<i>SRTD3</i>						
<i>NEK1</i>	<i>SRTD6</i>						
<i>WDR35</i>	<i>SRTD7, CED2</i>						
<i>WDR60</i>	<i>SRTD8</i>						
<i>IFT140</i>	<i>SRTD9, MZSDS</i>						
<i>IFT172</i>	<i>SRTD10</i>						
<i>WDR34</i>	<i>SRTD11</i>						
<i>CEP120</i>	<i>SRTD13</i>						
<i>KIAA0586</i>	<i>SRTD</i>			<i>JBTS</i>		<i>HLS</i>	

SRTD : côtes courtes-polydactylie, NPH : néphronophtise, BBS : syndrome de Bardet-Biedl, JBTS : syndrome de Joubert, OFD : syndromes oro-facio-digitaux, HLS : syndrome hydrolethalus . + : présent, - : absent, ? : gène modificateur, DK : dysplasie kystique, DR : dystrophie rétinienne, NA : non applicable, RCIU : retard de croissance intra-utérin, RP : rétinite pigmentaire.\* : MKS « like »

## 5. OBJECTIFS

J'ai entrepris, avec l'aide du Dr F. Razavi, neuropathologiste, l'étude rétrospective sur 10 ans d'une cohorte de 138 fœtus ayant un diagnostic anténatal d'anomalie du corps calleux référés au centre pluri-disciplinaire de diagnostic prénatal (CPDPN) Necker-Enfants Malades, afin de décrire et réaliser leur classification neuropathologique en 4 classes : I défaut de décussation des fibres calleuses ; II hypoplasie lorsque le corps calleux est complet mais trop fin ou trop court ; III dysmorphie en cas d'anomalies de forme, IV en cas d'anomalie associée du ruban cortical ou de la substance blanche sous-jacente. Parallèlement j'ai déterminé la proportion de formes associées à d'autres anomalies cérébrales ou extra-cérébrales. L'examen foeto-neuropathologique avait permis d'évoquer un certain nombre de diagnostics qui avaient été confirmés moléculairement. Cette classification permettra d'établir des corrélations phénotype-génotype.

Le Dr Valérie Malan a entrepris une analyse par CGH array à la recherche de microremaniements déséquilibrés à l'origine de la MCC pour les cas restés sans diagnostic au terme de l'étude clinique et chromosomique par les techniques de caryotype standard. Cette démarche a permis d'identifier de nouveaux loci impliqués dans la mise en place du corps calleux et permet de pointer vers de nouvelles régions candidates.

Enfin, j'ai analysé les données du séquençage nouvelle génération appliquées à cette cohorte avec une triple approche : exomes en trio pour les fœtus pour lesquels l'ADN des parents était disponible, et deux panels ciblés. L'un des panels appelé ciliome a permis d'évaluer la contribution du cil primaire dans les anomalies du corps calleux. L'autre panel est appelé callosome. J'ai participé à sa conception pendant ma thèse. Il cible 423 gènes impliqués dans la mise en place du corps calleux, tant chez l'humain que dans des modèles murins ou de par leur fonction.

Ce travail a permis le démantèlement des causes génétiques des MCC, l'identification et la caractérisation fonctionnelle d'un nouveau gène de ciliopathie dans un phénotype extrême ; et l'identification de nouveaux gènes candidats en attente de validation.

Une meilleure connaissance du développement du corps calleux constitue un enjeu en médecine fœtale et devrait permettre d'améliorer l'évaluation pronostique et la prise en charge médicale des patients avec anomalies du corps calleux.

## II. MATERIEL ET METHODES

### 1. COHORTE

J'ai étudié une cohorte fœtale référée à l'hôpital Necker – Enfants Malades depuis 15 ans. Entre 2000 et 2015, 179 fœtus ont été documentés comme ayant une malformation du corps calleux diagnostiquée en anténatal, qu'elle soit totale ou partielle, isolée ou associée à un syndrome polymalformatif. Dans 25 cas, la grossesse a été poursuivie. 9 fœtus n'ont pas eu d'examen neuropathologique soit du fait d'un refus d'autopsie de la part des parents, soit parce qu'il s'agissait d'une interruption sélective de grossesse dans le cadre d'une grossesse gémellaire. Enfin, 7 fœtus ont été exclus car il s'agissait d'une « pseudo-agénésie » dans le cadre d'une holoprosencéphalie. La grande majorité des cas sont sporadiques. 4 cas sont familiaux avec une ou plusieurs récurrences. Cinq familles sont composées de couples apparentés.

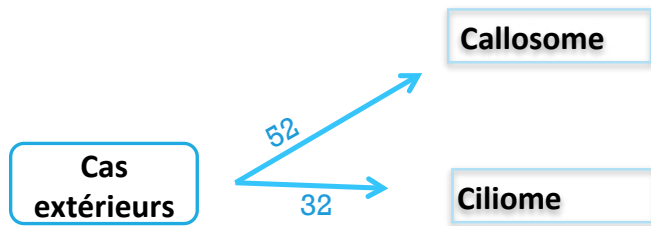
Le ratio fœtus masculins/fœtus féminins est en faveur des garçons (74/64). La majorité des interruptions médicales de grossesse avaient lieu après 26 SA. La grande majorité (134) des fœtus était sans diagnostic au moment de l'IMG.

Les autopsies ont été réalisées selon les recommandations de l'HAS. Pour chaque fœtus, des photos, des radiologies, des mesures biométriques, et un examen externe et interne ont été entrepris. Un examen histologique de chaque organe a été réalisé, ainsi qu'un examen neuropathologique précis après 6 semaines de fixation.

Tous les fœtus ont eu une échographie pré natale et 50 fœtus ont eu une IRM, faite sur une machine de 1.5-Tesla (Signa; GE, Milwaukee, Wisconsin). Le protocole d'IRM comprenait: (i) une séquence anatomique de tout le fœtus dans 3 plans orthogonaux; (ii) Une séquence FIESTA 2D: TR 3.7 ms, TE 1.6 ms; matrix 512 x 512; FA: 60°, épaisseur de section, 6 mm; (iii) une analyse anatomique du cerveau fœtal avec une séquence pondérée T2 dans trois plans de coupe orthogonaux; (iv) T2 Fast Spin Echo: TR 10000ms, TE 120ms; matrix 256 x 256; cm; FA: 90°, épaisseur de section: 4 mm.

Cette cohorte a fait l'objet de la publication dans Birth Defect Research part A. A noter que je me suis également intéressée aux analyses par des méthodes de séquençage nouvelle

génération appliquées à des cas extérieurs à cette cohorte fœtale comprenant des fœtus et des cas pédiatriques.



## 2. METHODES

### 2.1. CGH array

Le principe de la technique consiste à co-hybrider la même quantité d'ADN d'un patient et d'un témoin, marqués chacun par un fluorochrome différent, sur une lame de verre sur laquelle sont déposées des sondes d'ADN (jusqu'à 2 millions). Au niveau de chaque sonde, un rapport de fluorescence est calculé. Si ce rapport varie dans un sens ou dans l'autre, le graphique correspondant indiquera un gain ou une perte de matériel. Cette technique permet d'identifier des remaniements déséquilibrés de petite taille allant jusqu'à 10 kb en fonction du nombre de sondes utilisées.

Pour notre étude, nous avons utilisé la puce Human Genome CGH array 60K (55077 oligonucléotides ; Agilent technologies Santa Clara, CA, USA) pour l'analyse des ADNs extraits d'amniocytes ou de tissus fœtaux. Un design à façon de cette puce a été réalisé (PreCytoNEM). En effet, cette puce est désenrichie en oligonucléotides au locus des CNVs fréquents à pénétrance incomplète et/ou expressivité variable, et enrichie sur certaines régions du génome qui correspondent à des syndromes microdélétionnels récurrents pathogènes. Le seuil de détection a été fixé à 6 oligonucléotides consécutifs, soit 400 kb en moyenne sur l'ensemble du génome, et environ 200 kb dans les régions riches en gènes. Ce seuil de détection correspond à un choix du cytogénéticien qui permet un compromis entre le taux de détection des CNVs pathogènes et celui des VOUS (Variant of Uncertain Significance). En effet, la CGH array permet la mise en évidence des déséquilibres génomiques dont la signification clinique reste à déterminer. Un CNV peut être bénin sans conséquence phénotypique, pathogène c'est à dire à l'origine des anomalies congénitales du fœtus, ou de signification incertaine (VOUS). Ces derniers posent des problèmes de conseil génétique car il est difficile de prédire leur impact clinique. Ainsi, un seuil de détection trop élevé (aux

alentours de 50 kb par exemple) augmentera de façon importante la détection de VOUS sans améliorer significativement le taux de CNVs pathogènes (82).

La stratégie de classification des CNVs est basée principalement sur la taille, la nature (délétion ou duplication), le contenu génique, les informations présentes dans les bases de données (<http://decipher.sanger.ac.uk>), les données de la littérature, et le caractère *de novo* ou hérité du CNV (82).

Les déséquilibres génomiques pathogènes surviennent le plus souvent *de novo* et ont une taille généralement supérieure à 400 kb. Par ailleurs, le phénotype est d'autant plus sévère que la taille du déséquilibre chromosomique est grande et comprend de nombreux gènes. Dans environ 70 % des cas, les CNV associés à une DI et/ou des malformations congénitales correspondent à des délétions. On admet qu'à partir de 1,5 Mb, un CNV est quasiment toujours à l'origine de la pathologie observée (83).

Dans notre étude, chaque CNV identifié par CGH array a été confirmé par FISH, sur noyaux interphasiques ou sur métaphases, en utilisant une sonde de type BAC (Bacterial Artificial Chromosome) localisée dans la région remaniée. L'étude parentale a également été effectuée par FISH sur chromosomes métaphasiques afin de déterminer le caractère *de novo* ou hérité du CNV détecté. Pour les duplications de petite taille, il est nécessaire d'analyser les noyaux interphasiques afin de confirmer l'anomalie. Cependant, pour des duplications d'une taille inférieure à 500 kb, une étude par qPCR peut être nécessaire si celle-ci n'est pas visible par la technique de FISH.

## 2.2. Séquençage haut débit

### 2.2.1. Les différentes étapes du NGS

D'une façon générale, le processus de séquençage est divisé en 4 étapes, quelle que soit la technologie NGS: préparation de la banque/librairie, séquençage, imagerie et analyse des données (84).

La technologie Illumina/Solexa utilisée est basée sur le principe de l'amplification clonale sur un support plan qui servira à l'amplification en pont "Bridge PCR", puis séquençage des fragments par la méthode terminateur de chaîne réversible (TRC).

L'ADN amplifié va être dénaturé, puis déposé dans des cellules spécialement conçues pour assurer la fixation au support de chaque molécule au niveau d'un des adaptateurs.

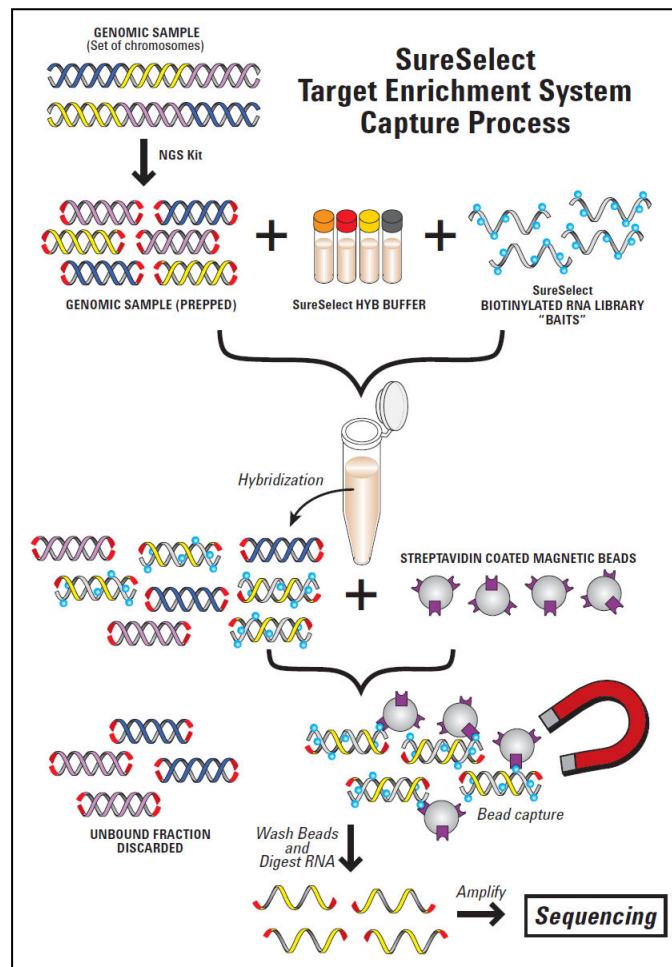
Par cette approche, les deux amorces de PCR (oligonucléotides complémentaires au fragment que l'on veut amplifier) sens et anti-sens sont hybridées sur un support solide et non dans une



solution. La molécule d'ADN simple brin va se replier et s'hybrider sur une amorce complémentaire située à la proximité sur le support, formant ainsi un pont (Bridge PCR). La Taq polymérase va ensuite synthétiser le brin complémentaire sur le pont. Les deux brins complémentaires obtenus se séparent pendant la phase de dénaturation qui suit et chacun d'eux sera alors disponible pour former de nouveaux ponts au cours du cycle suivant (85,86). Le séquençage se fait par une méthode de synthèse par TRC basée sur la lecture de courts fragments d'environ 35 à 50 bases initialement. L'incorporation réversible des nucléotides fluorescents va permettre la révélation des séquences, suivie de la lecture optique de la fluorescence. Le séquençage TRC est une technique qui ressemble à la technique de Sanger, il s'agit d'une terminaison de synthèse basée sur l'utilisation d'un terminateur qui interrompt la synthèse d'ADN. Cependant dans le séquençage TRC la terminaison est transitoire, c'est à dire le terminateur utilisé est fluorescent et contient un groupement de protection qui peut être éliminé du nucléotide par photoclivage (grâce à la lumière ultraviolette >300nm). Ce processus de clivage est bénéfique car il restaure la capacité du brin d'ADN à être utilisé à nouveau comme matrice par l'ADN polymérase, par l'enlèvement du fluorochrome. La détection de la fluorescence se passe en temps réel. Dans cette approche les nucléotides utilisés sont marqués : chacun des 4 dideoxynucléotides réversibles porte un fluorophore spécifique. La très haute densité de la puce (plus de 100 millions de molécules par centimètre carré) permet de séquencer environ 100.000 paires de bases par seconde, ce qui permet la lecture des séquences de plusieurs dizaines de paires de bases avec plus de 99% de précision.

### ***2.2.2. Les techniques d'enrichissement ciblé***

C'est l'étape qui permet de séquencer des régions d'intérêt. Il existe plusieurs techniques : la PCR multiplex ou en micro-gouttes, la circularisation de fragments d'ADN (MIP) et la capture d'hybrides en phase solide ou liquide. La capture d'hybrides permet d'obtenir le nombre le plus important de régions cibles, jusqu'à 50 Mb. C'est la technique de choix utilisée dans ce manuscrit (Figure 21).



**Figure 21** Hybridation spécifique en phase liquide

La capture des séquences d'intérêt est effectuée en phase liquide grâce à des banques de capture (exome ou à façon ; Sureselect, Agilent). L'ADN génomique est fragmenté mécaniquement (Covaris-ultrasonicateur), puis des adaptateurs spécifiques sont ligués et serviront de sites universels d'amorçage pour les étapes d'amplification et de séquençage. Cette banque « whole genome » est dénaturée puis hybridée à un panel de sondes ARN biotinylées correspondant aux séquences que l'on veut capturer. Les hybrides formés sont capturés par des billes magnétiques de streptavidine qui se fixent à la biotine. Les sondes ARN biotinylées sont alors digérées et l'ADN ainsi capturé est amplifié et séquençé. D'après <http://www.genomics.agilent.com>

### 2.2.3. Les différents panels

Les séquences codantes représentent environ 1 à 2% de notre génome, et la plupart des mutations des maladies génétiques mendéliennes se trouvent dans ces régions codantes. La méthode d'enrichissement ciblé utilisée dans ce manuscrit a été décrite en 2009 (87).

Pour l'exome, la capture a été faite en simplex. Les sondes de capture biotinylées sont fournies par Agilent (Agilent SureSelect All Exon kit ; 51 Mb, ~180 000 exons).

Cependant, cette technique est encore trop coûteuse pour être utilisée en routine et certaines régions ne sont pas suffisamment couvertes. C'est pourquoi, nous avons développé un panel à façon permettant le séquençage ciblé de gènes impliqués dans la mise en place du corps

callex (callosome) d'une part ; et utilisé un panel « maison » existant ciblant les gènes associés à la biogenèse ou à la fonction du cil primaire (ciliome) d'autre part. Pour ces panels, la pré-capture a été réalisée en multiplex, avec 16 échantillons code-barrés, poolés de manière équimolaire constituant une banque génome entier. Ces 16 échantillons ont été capturés en une fois par les sondes ARN biotinylées Sureselect Agilent de chaque panel fait à façon. Après capture, nous obtenons 16 banques post capture « custom ».

Pour chaque panel, les banques de pré-capture ont été préparées à partir de 3 µg d'ADN génomique fragmenté mécaniquement par un ultrasonicateur S2, selon les instructions du fabricant. Le système Ovation Ultralow (Technologies NuGEN) a été utilisé pour préparer la librairie de pré-capture pour le HiSeq2500. Le séquençage a été réalisé par le HiSeq2500 sur les pools des librairies barcodées (48 librairies ciliome/callosome par FlowCell). L'utilisation du séquençage de fragments à partir de deux extrémités (Paired-end reads) a été généré (130+130), démultiplexé et aligné au génome humain de référence (version NCBI build37/hg19) en utilisant l'aligneur 16 Burrows-Wheeler. La couverture moyenne par échantillon était supérieure à 80x avec plus de 90% de l'exome couvert à 15x. Selon les meilleures pratiques, le processing en aval a été réalisé par les outils Genome Analysis Toolkit, 17 SAMtools, et 18 Picard Tools (88). Tous les variants ont été annotés en utilisant un logiciel développé par la plateforme de bioinformatique de l'université Paris Descartes (Patrick Nitschké). Différents filtres ont été appliqués pour exclure les variants des régions non exoniques, des pseudogenes, des UTRs, ou les polymorphismes avec une fréquence supérieure ou égale à 1% (i.e., présents dans les bases de données comme dbSNP et 1000 Genomes Projects, et tous les variants identifiés par les exomes locaux (5,150 exomes et 1,020 ciliomes). La conséquence fonctionnelle des variants faux-sens est prédite par les logiciels SIFT ([http://sift.jcvi.org/www/SIFT\\_enst\\_submit.html](http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html)) et PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>).

### ***Panel de gènes du cil « ciliome »***

Le séquençage ciblé sur les gènes du cil est réalisé grâce à un kit de capture custom SureSelect (Technologies Agilent) ciblant 4.5 Mb comptant 20,168 exons de 1,221 gènes connus et candidats de ciliopathies. Les gènes ont été choisis grâce aux bases de données publiques construites à partir d'études de protéomique et génomique comparative (43%), de « connectomes » (21%). De plus, 23% des gènes ciblés sont impliqués dans la structure et les voies de signalisation du cil, 6% sont issus d'études de modèles animaux d'extinction de

gènes (souris, poisson zèbre) et 7% sont des gènes impliqués en pathologie humaine (gènes responsables de ciliopathies).

### ***Panel de gènes de MCC « callosome »***

Ce panel cible 421 gènes et 2 ARN non codants (MIR17HG et RNU4ATAC) correspondant à la capture de 2 Mb comptant 6633 exons grâce à 56310 sondes (capture custom SureSelect ; Technologies Agilent). La conception de ce panel a fait partie de mon travail de thèse. Il comprend 345 gènes « diagnostics » connus en pathologie humaine dont 40 gènes impliqués dans des syndromes associant MCC et microcéphalie ; 10 gènes d'atrophie olivo-ponto-cérébelleuse ; 27 gènes impliqués dans des anomalies de la ligne médiane ; 57 gènes impliqués dans des syndromes polymalformatifs comprenant une anomalie du corps calleux ; et 11 gènes impliqués dans des maladies métaboliques. Par ailleurs, il comprend des gènes candidats de par les modèles murins de MCC, ou de par leur fonction dans des voies de signalisation connues pour être impliquées dans la mise en place du corps calleux ; et enfin 16 gènes candidats pointés par exome ou CGH array. 45 gènes de ce panel sont également présents dans le panel ciliome.

La couverture moyenne en 30X des bases est sensiblement meilleure pour le panel callosome ( $\approx 99\%$ ) que le panel ciliome ( $\approx 95\%$ ) comprenant 3 fois plus de gènes.

Les variants identifiés et présentés dans ce manuscrit ont été confirmés par séquençage direct (méthode Sanger) chez les cas et leurs parents pour valider les variants et vérifier leur ségrégation familiale.

#### ***2.2.4. Méthode d'analyse des données NGS***

Les données massives issues du séquençage haut débit par exome ou panels sont filtrées. Ainsi sont retirées :

- 1) des variants synonymes ou introniques autres que ceux créant ou affectant les sites d'épissage
- 2) des variants avec une fréquence de l'allèle mineur de plus de 1%, soit dans 1000 Genomes (1KG), dans le serveur de variant EVS (NHLBI Exome Sequencing Project Exome Variant Server) et dans la base de données américaine de variant simple base dbSNP (The Single Nucleotide Polymorphism database)
- 3) des variants observés chez plus de 1% d'un ensemble de données d'exome en interne provenant de projets indépendants (Filtre par les « déjà-vus »)

4) les ARN non codant et les si-RNA mature, les régions UTR.

Ainsi sont conservés les variants non synonymes comprenant les variations faux-sens, non-sens et les insertions/délétions, et les mutations au niveau des sites accepteurs et donneurs de site d'épissage.

5) Les variants faux-sens ont ensuite été priorisés selon leur effet prédit par PolyPhen-2 et SIFT.

SIFT est un outil basé sur l'homologie de séquence et prédit si une substitution d'acides aminés affecte la fonction de la protéine. Cette prédiction est basée sur le degré de conservation de résidus d'acides aminés et peut être appliquée à des polymorphismes d'origine naturelle ou non synonymes faux-sens mutations induites en laboratoire.

Tandis que PolyPhen-2 est un outil de prédiction de l'impact d'une substitution d'acide aminé sur la structure et la fonction d'une protéine humaine. Cette prédiction est basée sur un certain nombre de caractéristiques comprenant la séquence, les informations structurales et phylogénétiques, et la caractérisation de la substitution.

On ne peut pas exclure que les variants en cause dans chaque famille soient situées dans des régions non suffisamment couvertes, les régions non codantes des gènes, ou dans un gène non présent dans chaque panel.

### 2.3. **Génotypage par microsatellites**

Pour analyser la possibilité d'une disomie uniparentale du chromosome 1 (DUP1), un génotypage par microsatellites a été réalisé sur le trio parents-fœtus d'un cas de la cohorte présentant une HCC associée à une microcéphalie à gyration simplifiée. Dix marqueurs microsatellites ont été choisis le long du chromosome 1 (D1S2795, D1S2642, D1S2667, D1S489, D1S507, D1S2713, D1S2652, D1S198, D1S464, D1S2790). Les produits de PCR ont été analysés par Genemapper Software5 (Applied Biosystems). Afin de borner la région d'intérêt, une analyse par puce SNP est en cours.

Parallèlement, nous avons identifié une mutation identique chez plusieurs individus malades originaires d'Europe de l'est. Ces données suggérant un effet fondateur, nous avons appliqué une méthode de calcul basée sur des calculs de vraisemblance à partir des données des marqueurs microsatellites utilisés (89). Les marqueurs microsatellites qui ont été utilisés sont les suivants : D14S1064, D14S285, D14S890, D14S1038, D14S994, et D14S290 et un

marqueur maison IVS8. Les produits de PCR ont été analysés par Genemapper Software5 (Applied Biosystems).

#### 2.4. Culture cellulaire

Les fibroblastes (issus de biopsie de peau) sont cultivés en atmosphère humide à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> dans du milieu Optimem supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal et 1% d'antibiotiques (Pénicilline et streptomycine). Les amniocytes (issus de liquide amniotique) sont cultivés en atmosphère humide à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> dans du milieu CHANG-D sur support plastique collagéné.

Pour les expériences d'analyse du cil primaire, l'induction de la ciliogenèse se fait par privation de sérum pendant 24 à 48 heures sur cellules confluentes.

Pour l'étude de l'activation de la voie Sonic Hedgehog, les cellules à confluence sont privées de sérum pendant 24 heures puis incubées en présence d'un agoniste de la voie (SAG : smoothed agonist ; sc-202814, Santa Cruz; 5 mM) pendant 24 heures.

#### 2.5. RT-PCR en temps réel

L'extraction d'ARN à partir des fibroblastes du cas index et d'un témoin de même terme a été faite avec le kit Qiagen RNeasy, incluant une étape de digestion de l'ADN par traitement DNase sur colonne. La synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) à partir des ARN totaux a été faite avec le kit GenAmp RNA PCR corekit (Applied biosystems). PTCH1 et GLI1 sont des cibles transcriptionnelles de la voie *SHH* dont le niveau d'expression permet d'estimer l'activation de la voie *SHH*.

**Table 7 : Amorces des gènes *GLI1*, *PTCH1* et *GAPDH* utilisées pour la real time RT-PCR**

GLI1-F	AGAGGGTGCCATGAAGCCAC
GLI1-R	AAGGTCCCTCGTCCAAGCTG
PTCH1-F	GCTACTTACTCATGCTCGCC
PTCH1-R	TCCGATCAATGAGCACAGGC
GAPDH-F	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG
GAPDH-R	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA

Les amorces des gènes *GLI1* et *PTCH1* ainsi que les amorces du gène de référence pour *GAPDH* utilisées sont répertoriées ci-dessus (Table 7). Cette démarche nous a ainsi permis d'évaluer le niveau d'activation de la voie SHH dans les cellules du cas par rapport au témoin après addition d'un agoniste de la voie (SAG).

## 2.6. Immunocytochimie

Les fibroblastes sont fixés dans de la paraformaldéhyde 4%, puis incubés dans des solutions de NH<sub>4</sub>Cl (50 mM, inhibe l'auto fluorescence des groupements aldéhydes libres de la PFA) et de Triton X-100 (0,3%, perméabilisation des cellules) puis dans une solution de blocage (PBS Tween 20 0,5% et BSA 1%). Les cellules sont ensuite incubées avec les anticorps suivants : alpha-tubuline acétylée monoclonale de souris (ac-a-Tub, clone 6-11B-1, Sigma) et péricentrine (PCNT) polyclonale de lapin (Ab4448 Abcam) et les anticorps secondaires Alexa Fluor 488 anti-lapin et Alexa Fluor 555 anti souris (Invitrogen). Pour calculer le nombre de cellules ciliées, les images confocales ont été prises avec un Leica SP5. Au moins 3 expériences indépendantes ont été réalisées et au minimum 500 cellules ont été observées.

Par ailleurs, une imagerie haute résolution des centrioles co-marqués avec des anticorps anti-ODF2 (protéine centriolaire de l'appendice subdistal; Abnova, H00004957-M01) et anti-CEP164 (protéine centriolaire de l'appendice distal; Sigma, HPA037606) des cellules mutantes et contrôles a été réalisée. De même, un immunomarquage avec les anticorps anti-CEP290 (Novus Biologicals, NB100-86991) et anti-centrine (Clone 20H5, Millipore) a permis d'observer le patron d'expression de ces protéines centriolaires.

La microscopie haute résolution a été réalisée sur un appareil Leica TCS SP8 STED (STimulated Emission Depletion).

## 2.7. Western-blot

Pour l'extraction de protéines, les fibroblastes ont été lysés dans du tampon RIPA supplémenté d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases et phosphatases (Roche). 40 microgrammes de protéines ont été déposés sur des gels SDS-PAGE 8%. L'immunomarquage a été réalisé en utilisant l'anticorps GLI3-H280 de lapin (Santa Cruz Biotechnology), puis un anticorps secondaire conjugué à l'HRP et détection ECL plus (Amersham). Un anticorps anti bêta-actine (Santa Cruz Biotechnology ; sc-81178) a été utilisé comme contrôle. Les signaux obtenus ont alors été imagés puis quantifiés par densitométrie grâce au logiciel ImageJ et ont permis de calculer les ratios de concentration des formes courte (répressive) et longue (activatrice) de GLI3.

### **III. RESULTATS**

#### **1. ETUDE DE LA COHORTE PAR CGH ARRAY [Alby et al, BDRA soumis]**

##### **1.1. Etude clinique de la cohorte**

Entre 2000 et 2015, 179 fœtus ont été documentés comme ayant une malformation du corps calleux diagnostiquée en anténatal, qu'elle soit totale ou partielle, isolée ou associée à un syndrome polymalformatif. 138 de ces fœtus ont bénéficié d'un examen neuro-pathologique. En fonction de l'aspect anatomique macroscopique, nous avons pu définir plusieurs catégories de MCC : 1/ les anomalies de décussation lors de la présence de bandelettes de Probst retrouvée chez 55 fœtus 2/ les anomalies de croissance lorsque le corps calleux est hypoplasique, c'est à dire complet mais soit trop court soit trop fin ; caractéristiques retrouvées chez 30 fœtus 3/ les corps calleux dysmorphiques, ayant une anomalie de forme le plus souvent en rapport avec un lipome ou un kyste arachnoïdien sur la ligne médiane; au nombre de 24 ; 4/ les corps calleux anormaux du fait d'un trouble du développement cortical, lorsque le ruban cortical ou la substance blanche sous-jacente sont atteints avec 29 fœtus concernés.

##### **1.2. Séquençage ciblé et CGH array- diagnostics**

La quasi totalité des cas demeurant sans diagnostic au moment de l'IMG, deux stratégies complémentaires ont été mises en place pour avancer dans ce domaine. Tout d'abord une analyse par CGH array : 21 cas ont pu être diagnostiqués. Par rapport à la réalisation d'un caryotype standard ou d'une FISH ciblée, cette approche a permis 33% de diagnostics supplémentaires

La deuxième approche a été le séquençage ciblé de gènes spécifiques, guidé par le phénotype fœtal. Cette démarche a permis d'établir 21 diagnostics, en particulier de MCC liées à des anomalies du développement cortical.



### 1.3. Conclusion/perspectives

Cette double approche a permis d'expliquer la cause dans 32% des cas de MCC. L'examen neuropathologique est surtout performant pour les MCC associées à des malformations du développement cortical (MCD). L'analyse par CGH array a permis de pointer vers de nouveaux loci impliqués dans le développement du corps calleux. Par contre les MCC isolées et ou avec bandelettes de Probst, c'est à dire par défaut de décussation, restent les catégories dans lesquelles le diagnostic est rarement déterminé.

Bien que l'IRM anténatale permette d'évaluer les signes associés, la caractérisation du type de CCM reste un défi en cours de grossesse. L'examen neuropathologique de cette grande cohorte des fœtus a permis de les classer en quatre groupes distincts en fonction de la morphologie du CC et de la présence ou l'absence de bandelettes de Probst.

Les causes sous-jacentes sont très hétérogènes : les anomalies chromosomiques ont été trouvées dans 15% des cas.

**Peu de MCC classées comme isolées par l'imagerie prénatale le restent après autopsie (16/40).** Le message majeur de cette première étude est en effet que des anomalies additionnelles sont signalées chez 60% d'entre eux (24/40). Ce taux est probablement encore sous-estimé parce que certains signes cliniques ne sont pas accessibles à l'autopsie soit parce qu'ils ne sont pas morphologiquement visible ou parce qu'ils apparaissent plus tard dans la vie (par exemple, la déficience intellectuelle, l'épilepsie, la surdité, des anomalies métaboliques, l'ataxie, la spasticité). Une étude prospective a montré que des anomalies supplémentaires ont été diagnostiquées après la naissance chez 15% des nouveau-nés ayant un MCC isolée avant la naissance (90). Dans ces cas, le pronostic incertain conduit à un risque difficile à évaluer précisément. Identifier la cause génétique de MCC isolées et leur pronostic sera un véritable atout, car il permettra de fournir un conseil prénatal précis.

**Les MCC qui restent isolées sont principalement les ACC complètes.** Les ACC par défaut de décussation étaient globalement de 26% (14/53). Cependant alors que les ACC complètes étaient isolées dans 22% des cas (14/64), aucune ACC partielle n'est restée isolée au terme de l'EFP (Article annexe 2, Figure 4B). Les HCC et les DCC étaient en grande majorité associés à d'autres anomalies du CNS (27/30 and 20/24 respectivement) ou extra-CNS (21/30 and 20/24 respectivement) ; au total, dans ces deux derniers groupes réunis, seules deux CCH restaient apparemment isolées après autopsie (Figure 4A).

**Les anomalies chromosomiques sont plus fréquentes dans les MCC associées** en particulier les HCC. Dans notre série, comme attendu, des anomalies chromosomiques ont été trouvées principalement dans les CCM associées à d'autres anomalies, et dans le groupe des HCC. De plus cette étude souligne la valeur ajoutée de la CGH array puisque pour 7/21 des cas (33%), c'est la CGH array seule qui a permis de détecter le déséquilibre génomique.

**L'ACC complète (N=64), est plus fréquente que l'ACC partielle (N=20), mais les diagnostics plus rares** (Article Annexe 1, Figure 3B). En effet, un diagnostic a été fait chez 65% des ACC partielle (13/20 dont 8 maladies mendéliennes et 3 anomalies chromosomiques), alors qu'un diagnostic n'est porté que chez 20 % des fœtus ACC complète (13/64 dont 7 maladies mendéliennes et 6 anomalies chromosomiques). Dans le groupe des HCC (N=30), le taux diagnostic est intermédiaire, avec 40 % de diagnostics et plus d'anomalies chromosomiques (8) que de maladies mendéliennes (3), et une cause exogène (diabète).

**Chez les fœtus avec CCM et anomalie du développement cortical, l'examen neuropathologique permet généralement le diagnostic**, y compris le type de lissencéphalie (type I vs II) ou une tubulinopathie, permettant jusqu'à 50% des diagnostics dans cette catégorie.

Au total dans notre série, l'incidence des anomalies associées est d'environ 88% dont 60% d'entre elles sont avec des anomalies extra-SNC, posant moins de problème en termes de conseil prénatal, le pronostic des formes associées étant connu comme plutôt défavorable. Cependant, établir un diagnostic dans ces formes associées est crucial pour la gestion des futures grossesses et le conseil génétique. Les deux groupes où le moins de diagnostics ont été faits au terme de l'examen neuropathologie et la CGH array sont le groupe des ACC par anomalie de décussation, et le groupe des MCC apparemment isolés. De ce point de vue, le principal défi des études génétiques par NGS a été d'établir un diagnostic dans ces cas non étiquetés (68% dans notre série).

Les techniques de NGS appliquées à cette cohorte certes hétérogène ont été évaluées dans un second temps.

L'IRM couplée au DTI devrait permettre d'aller plus loin dans l'établissement du mécanisme causal. D'où l'intérêt pour la suite du travail de pouvoir réaliser en prospectif des analyses radiologiques par IRM avec tractographie en anténatal.

## **2. ETUDE PAR PANEL CIBLE « CILIOME » : IDENTIFICATION D'UN NOUVEAU GENE *KIAA0586* [Alby et al., AJHG, 2015]**

Dans la cohorte fœtale, cinq cas ont été analysés par ciliome, ce qui n'a pas permis d'identifier de mutation pathogène. En revanche, un nouveau gène a pu être identifié dans quatre familles issues d'un recrutement externe, décrites ci-dessous.

### **2.1. Phénotypes des individus atteints**

5 fœtus de 4 familles différentes présentaient des phénotypes chevauchants entre hydrocéphalus et côtes courtes polydactylies de type SRPII et IV. Tous avaient une malformation du corps calleux.

#### **Famille 1 :**

Le premier cas est issu d'un couple de cousins germains d'origine libanaise, bien portants. Leur histoire a été marquée par de multiples fausses couches spontanées précoces avant 12 SA. Puis le cas II :1 est une petite fille décédée à un jour de vie. Son phénotype est partiellement décrit mais étaient présents une polydactylie et une fente labio-palatine. La grossesse suivante s'est arrêtée à 15 SA dans un contexte polymalformatif comprenant une hydrocéphalie majeure, associée à une polydactylie des quatre membres, une fente labiopalatine médiane, une hernie de coupole diaphragmatique droite et une absence de clavicule. L'examen foetopathologique était partiel. Le cas II :3 est un fœtus interrompu à 15 SA dans un contexte polymalformatif, avec hydrocéphalie, encéphalocèle occipitale avec absence de ligne médiane soit une anencéphalie, un anasarque, une polysyndactylie des 4 membres, une fente labio-palatine médiane et des ailes iliaques plates et élargies à la radiologie. Il s'agissait d'un phénotype hydrolethalus avec quelques signes de dysplasie squelettique.

Famille 2 :

Les parents sont des apparentés lointains issus de Roumanie. Le cas II :2 est un fœtus interrompu à 31 SA. L'échographie prénatale montrait un hydramnios associé à une micromélie et des côtes courtes avec un thorax étroit ; une hydrocéphalie avec hypoplasie vermiennne, et une agénésie partielle postérieure du corps calleux. L'examen foetopathologique montre une dysmorphie, une fente palatine médiane, des freins multiples et des hamartomes de la langue, un thorax étroit, une hypoplasie pulmonaire, des polysyndactylies pré axiales des pieds et post axiales des mains. L'examen radiologique met en évidence des côtes courtes, des os longs avec des têtes fémorales arrondies. L'examen neuropathologique confirme l'agénésie postérieure du corps calleux associée à une hypoplasie vermiennne, une polymicrogyrie pré-rolandique, une agénésie des bulbes olfactifs. Le cas II :3 est un enfant né à terme et décédé à la naissance. L'échographie prénatale avait décelé un hydramnios, des côtes courtes, une micromélie, une hypoplasie vermiennne une méga grande citerne et des anomalies de gyration. Les parents avaient décidé de poursuivre la grossesse.

Famille 3 :

Les parents ne se savent pas apparentés. Ils sont originaires de Hongrie. La première grossesse a été marquée par une fausse couche à 12 SA dans un contexte d'anencéphalie. Le cas II :2 est une fille née à 35 SA et décédée à un an. La grossesse avait été marquée par la présence d'un hydramnios. L'enfant a eu besoin d'une ventilation mécanique de la naissance à son décès. Elle avait un thorax étroit, des côtes courtes et une micromélie, une polydactylie post axiale des mains et pré axiale des pieds, une dysmorphie, des freins multiples, des gencives hypoplasiques ; aucune réponse à des stimuli visuels ou auditifs, une hypotonie généralisée. L'IRM montrait un micro-cerveau avec des espaces péri-cérébraux larges et une ventriculomégalie, un aspect de dent molaire et une hypoplasie du corps calleux, de l'hippocampe, ainsi que du tronc cérébral et de la moelle ; et une méningocèle occipitale. L'échocardiographie montrait une communication inter auriculaire.

Famille 4 :

Les parents sont apparentés lointains originaires du Kosovo. Le cas II :4 est décédé à un jour de vie et a été décrit comme ayant le même phénotype que II :5. II :5 est un fœtus interrompu à 28 SA. L'autopsie révèle une dysmorphie, une fente labio-palatine médiane, des hamartomes linguaux, un défaut occipital en trou de serrure, un thorax étroit et une hypoplasie pulmonaire ; une polydactylie pré et post axiale des pieds et post axiale des mains ; Les radiographies montrent une micromélie avec des extrémités fémorales arrondies, des os de

l'avant bras incurvés et des côtes courtes. L'examen neuropathologique montre une agénésie du corps calleux, une polymicrogyrie temporale, un aspect de dent molaire et un colobome rétinien.

## 2.2. Ciliome/résultats

Chez le fœtus II :3 de la famille 1 avec phénotype HLS, nous avons séquencé *KIF7* et *HYLS1* sans identifier de mutation. Nous avons ensuite réalisé un séquençage du ciliome. Nous nous sommes intéressé aux variants homozygotes, rares et avec un effet sur la protéine, absents des bases de données (ExaC, dbSNP et 1000 Genomes) et des projets de site, et non synonymes, affectant des sites d'épissage. Cette analyse nous a permis d'identifier le variant c.230C>G, p.Ser77\* dans l'exon 2 (GenBank: NM\_001244189.1) de *KIAA0586* [MIM 610178], orthologue de *Kiaa0586* du poulet. Ce variant a été validé par séquençage Sanger et ségrége dans la famille selon un mode d'hérédité autosomique récessive. Nous nous sommes assuré qu'il s'agit d'un variant rare, et nous sommes donc assurés de son absence dans une population de même origine ethnique en séquençant 300 chromosomes témoins libanais. La mutation prédisant un adressage du mRNA au NMD, nous avons réalisé une RT-PCR à partir des ARNm extraits de tissus congelés du cas index et un témoin de même âge gestationnel. Cette analyse a montré l'absence totale de transcrit avec exon 2 chez le cas index. Ces transcrits sont ubiquitaires et transcrits dès 8 SA chez l'homme chez des témoins.

Parallèlement nous avons identifié le variant synonyme homozygote c.1815G>A (p.=) dans l'exon 14 de *KIAA0586* chez trois fœtus issus de trois familles d'Europe de l'Est non apparentés. Ce variant absent de la base ExaC, est situé dans la dernière base de l'exon 14 et prédit une abolition du site donneur de l'intron 14. Nous avons montré l'existence d'un transcrit aberrant sans exon 14 chez deux des cas par RT-PCR à partir d'ARN extrait de sang fœtal. Ce saut d'exon n'étant pas en phase, le décalage du cadre de lecture prédit un codon stop prématuré.

## 2.3. Effet fondateur

Etant donnée l'origine géographiquement proche des familles, un effet fondateur a été suspecté. La distance à l'ancêtre commun a été déterminée par une méthode de calcul de rapport de vraisemblance à partir de la taille de l'haplotype partagé par chacun des cas. Elle a été estimée à 16 générations, soit environ 500 ans.

Le calcul a été réalisé d'abord en prenant un haplotype, d'après l'algorithme précisé dans le chapitre II (2.3). On obtient les données suivantes :  $n = 16$ ,  $n_{end} = 232$ ,  $n_{inf} = 5$ ,  $n_{sup} = 63$ ,  $likelihood = -3.776324$ .

Puis nous avons voulu regarder si le calcul différait en faisant varier l'haplotype. Les résultats étaient très proches avec  $n=19$  dans les deux possibilités, au lieu de  $n=16$  ( $n_{end} = 111$ ,  $n_{inf} = 8$ ,  $n_{sup} = 51$ ,  $likelihood = -8.894125$ ) ou ( $n_{end} = 114$ ,  $n_{inf} = 8$ ,  $n_{sup} = 52$ ,  $likelihood = -8.607710$ ). Ces résultats indiquent que le choix de l'haplotype ne fait pas varier de manière significative le calcul du nombre de générations à l'ancêtre commun le plus proche.

#### 2.4. Etude fonctionnelle

Du fait du phénotype évocateur de défaut de signalisation hedgehog et par analogie à ce qui est connu chez l'animal et *in vitro* chez l'homme pour cette protéine, la voie de signalisation SHH a été étudiée. La voie SHH a d'abord été activée dans les amniocytes d'un des cas ayant le variant c.1815G>A (p.=), avec du SAG (SHH-agoniste de la classe des chloro-benzothiophènes), une petite molécule qui se lie directement et active Smo (91). Puisque PTC1 et GLI1 sont des cibles transcriptionnelles de la voie SHH, leur niveau d'expression peut servir de mesure d'activité SHH. Nous avons constaté un défaut d'activation de la voie dans les cellules du fœtus atteint par rapport au témoin par qRT-PCR. Nous avons aussi constaté un défaut de processing de GLI3 par Western Blot, avec une accumulation de GLI3-FL et une augmentation du rapport GLI3-FL/GLI3R dans les cellules mutantes. Nous avons également pu montrer que la perturbation de la voie SHH est liée à un défaut de la ciliogenèse dans les cellules mutantes, associée à une mauvaise distribution de la protéine péricentriolaire CEP290.

#### 2.5. Conclusion

La stratégie de capture ciblée sur les gènes du cil primaire a permis d'identifier des mutations non-sens et d'épissage dans *KIAA0586* comme responsables de ciliopathies létales chez l'homme. Cette même stratégie avait permis d'identifier *TCTN3* et *KIF7* comme responsables d'autres ciliopathies létales : syndrome de Meckel et HLS. Par ailleurs les syndromes de Joubert et acrocalleux sont respectivement alléliques aux précédents. Ceci laissait penser que les phénotypes décrits pouvaient être l'extrême phénotype du spectre d'autres ciliopathies. Ceci a pu être montré par 5 publications quasi-simultanées (92) (93) montrant que les mutations de *KIAA0586* expliquent 2.5 à 5% des patients atteints de syndrome de Joubert.

### 3. ETUDE PANEL CIBLE « CALLOSOME »

#### 3.1. Résultats globaux

Le séquençage de ce panel cible de 421 gènes et 2 ARN non codants a été réalisé chez 63 fœtus de la cohorte fœtale. Le nombre de variations par individus est en moyenne de 4683 sur l'ensemble des individus analysés dans le callosome. Il est donc nécessaire d'appliquer des filtres pour sélectionner les variations potentiellement délétères.

Au total, cette stratégie a permis d'identifier 6% de diagnostics supplémentaires dans des gènes connus de MCC.

A noter que parmi les fœtus sans cause déterminée de MCC, un tiers ont un seul variant candidat, un quart ont soit 2 soit 3 variants candidats et 20% restent sans aucun variant candidat. L'analyse de ségrégation familiale, quand elle est possible aide à avancer dans le filtre des candidats. Les multiples variants par fœtus n'excluent pas la possibilité d'un multigénisme, déjà évoqué dans la littérature pour les MCC isolées.

#### 3.2. Diagnostics

En plus de la cohorte fœtale, ont également été analysés par callosome 52 cas supplémentaires, dont quelques patients (N=5) suivis à l'hôpital Necker avec une anomalie du corps calleux. Parmi les diagnostics réalisés dans la cohorte, deux syndromes peuvent être définis comme majoritaires : le syndrome de Primrose et le syndrome de Coffin-Siris (Table 8).

**Table 8 : Les deux syndromes les plus fréquemment diagnostiqués dans la cohorte**

	<b>Gène</b>	<b>Maladie</b>	<b>Mutation</b>	<b>Hérédité</b>
GEF1300068*	<i>ZBTB20</i>	Primrose	c.1906T>C, p.Cys636Arg	<i>De novo</i>
ID01-EA**	<i>ZBTB20</i>	Primrose	c.1837C>T, p.Arg613Cys	<i>De novo</i>
GEF1400290***	<i>ZBTB20</i>	Primrose	c.1832G>A, p.Cys611Tyr	<i>De novo</i>
EFP0700164	<i>ARID1B</i>	Coffin-Siris	c.4784_4785del, p.Phe1595Serfs*27	<i>De novo</i>
EFP1300047	<i>ARID1B</i>	Coffin-Siris	Délétion de 380 kb emportant exons 5 à 19	<i>De novo</i>
EFP0500034	<i>ARID1A</i>	Coffin-Siris	c.2733-2A>C	<i>De novo</i>
GEF1500004	<i>ARID1A</i>	Coffin-Siris	c.4886dup, p.Val1630Cysfs18	En cours
GEF1400234****	<i>SMARCA4</i>	Coffin-Siris	c.3523G>C, p.Asp1175His	<i>De novo</i>

\* Diagnostic réalisé par exome en trio. Le gène *ZBTB20* a été inclus dans le panel callosome suite à l'identification d cette mutation *de novo* par exome chez le foetus.

\*\* Patient âgé de 11 ans (Dr Rio), présentant un retard des acquisitions, une macrocéphalie, une dysmorphie, une hypotonie, une dysplasie polyépiphytaire, une hyperlaxité et des anomalies dentaires,

\*\*\* Patiente âgée de 16 ans (Pr Cormier-Daire) présentant un retard des acquisitions, une macrocéphalie, une dysmorphie, une surdité, un retard staturo-pondéral, des anomalies rotuliennes, une sténose de l'artère pulmonaire, une absence de gyrus cingulaire, une tige verticalisée et des hypersignaux épars de substance blanche.

\*\*\*\* Patiente âgée de 11 ans (Pr Amiel), présentant une ACCp, une déficience intellectuelle, une dysmorphie, un surpoids, une dysplasie des ongles.

### 3.2.1. *ZBTB20 et syndrome de Primrose*

Le syndrome de Primrose (OMIM 259050) est caractérisé par une macrocéphalie, un déficit intellectuel constant, une dysmorphie caractéristique et une surdité. D'autres signes peuvent être associés : une petite taille, une obésité, des calcifications intra cérébrales, une cataracte, des troubles métaboliques. Les anomalies du corps calleux sont fréquentes (5/8) parmi les cas rapportés avec mutation du gène *ZBTB20* (NM\_001164342.1) (94). *ZBTB20* est un répresseur transcriptionnel exprimé dans les neurones de l'hippocampe, intervenant dans la neurogenèse, la glycogenèse et le métabolisme. Il appartient à la famille des Tram Track Brick à Brack (BTB). Dans le modèle murin d'inactivation, la souris présente une agénésie partielle postérieure du corps calleux. Des mutations somatiques de ce gène ont récemment été impliquées dans des gliomes de bas grade (95). Les mutations de chacun des trois patients sont localisées dans les domaines en doigt de zinc II et III du domaine C terminal de liaison à l'ADN. Les modélisations (<http://swissmodel.expasy.org>) prédisent une déstabilisation de la structure en doigt de zinc et en conséquence de la coordination de l'ion zinc, affectant ainsi la liaison à l'ADN.

Chez le fœtus GEF1300068, l'agénésie du corps calleux était présentée comme isolée en prénatal. Il présentait une mégalencéphalie supérieure au 95<sup>o</sup>p et une approche de reverse-phenotyping a permis de mettre en évidence des anomalies de l'organisation neuronale hippocampiques (CA1 et subiculum), ainsi que des astrocytes volumineux dans la substance blanches, en accord avec le phénotype murin.

*ZBTB20* étant exprimé dans l'indusium griseum composé de cellules gliales, il participerait à la formation du corps calleux au niveau de cette structure et donc par l'intermédiaire de la glie plutôt que de neurones transitoires nécessaires à la mise en place du corps calleux.

### 3.2.2. *Complexe SWI/SNF et syndrome de Coffin-Siris*

Le syndrome de Coffin-Siris (CSS, OMIM 135900) est caractérisé par une déficience intellectuelle, une hypoplasie ou une aplasie de la phalange distale ou l'ongle du 5<sup>o</sup> doigt, un faciès grossier et une hypertrichose. Il existe une grande variabilité clinique. Les autres signes possibles sont une petite taille, une microcéphalie, une épilepsie, une surdité, des signes



ophtalmologiques (à type de strabisme, cataracte, ptosis), des malformations cardiaques de type anomalies septales, tétralogie de Fallot), des hernies de coupole diaphragmatique, des anomalies génito-urinaires et rénales, un retard de maturation osseuse, des anomalies vertébrales ou une hyperlaxité ligamentaire. Il est transmis selon une hérédité autosomique dominante. Les gènes impliqués dans cette pathologie codent pour des protéines du complexe SWI/SNF du complexe BAF impliquées dans le remodelage de la conformation de l'ADN, et suppresseurs de tumeur: *ARIDIA* (1p36.1-p35), *ARID1B* (6q25.3), *SMARCA2* (9p24.3), *SMARCA4* (19p13.3), *SMARCB1* (22q11.23), et *SMARCE1* (17q21.2). Des mutations somatiques de ces gènes sont retrouvées dans certains cancers (cholangiocarcinomes, cancers de l'ovaire à cellules claires).

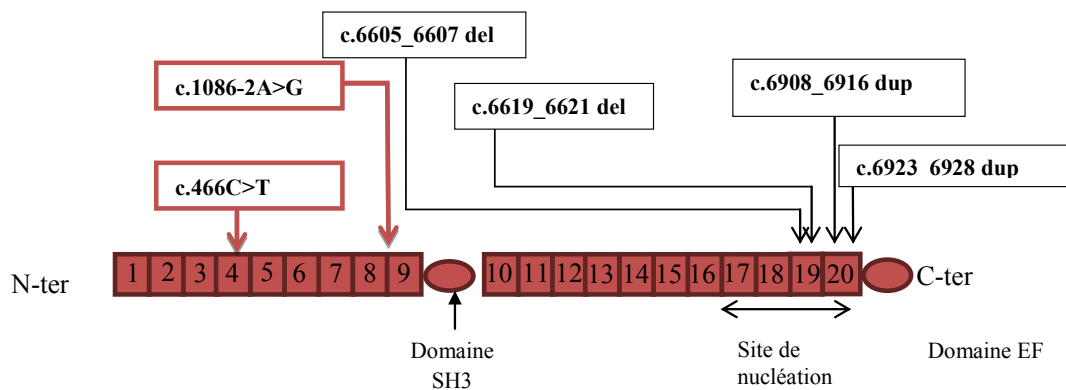
Les deux fœtus ayant une mutation d'*ARID1B* avaient une agénésie du corps calleux isolée en période anténatale. En revanche, les fœtus porteurs de mutations tronquantes d'*ARIDIA* avaient des syndromes polymalformatifs sévères comprenant un canal atrio-ventriculaire et une agénésie calleuse pour les deux. L'un avait une dysmorphie craniofaciale, une agénésie des coupoles diaphragmatiques, une clinodactylie avec absence de la dernière phalange des 5<sup>o</sup> doigts, un estomac dilaté, et un hamartome hypothalamique. Un seul cas de hernie de coupole diaphragmatique a été publié à ce jour sans qu'il n'ait été génotypé (48). Le deuxième cas avait une hydrocéphalie, une hypoplasie vermienne, une dysplasie rétinienne, une fente palatine, une agénésie thymique, une anomalie de lobulation pulmonaire et une persistance de la veine cave supérieure gauche. Peu de cas de syndromes de CSS par mutation d'*ARIDIA* ont été publiés à ce jour dans la littérature (88,89). Ce sont des cas pédiatriques dont la mutation était en mosaïque somatique. L'analyse de la mutation a été réalisée par séquençage Sanger sans argument pour une mosaïque somatique, laissant suggérer qu'une mutation tronquante germinale d'*ARIDIA* conduit à un phénotype beaucoup plus sévère.

Cette fréquence élevée de cas de syndromes de CSS dans la cohorte de fœtus avec agénésie du corps calleux est à rapprocher de l'étude DDD portant sur 14000 trios d'enfants avec déficit intellectuel. En effet dans cette étude, *ARID1B* est le gène le plus fréquemment muté dans la cohorte (51).

### **3.2.3. Nouveau mode d'hérédité pour *SPTANI***

Chez un couple non apparenté sans antécédent notable, un cas sporadique fœtal d'agénésie complète du corps calleux par anomalie de la plaque corticale, associée à une hypotrophie du tronc cérébral et du vermis cérébelleux, une hypoplasie sévère du cœur gauche et une asymétrie faciale modérée avec asymétrie oculaire, a été analysé par callosome.

Ceci a permis d'identifier 4536 variants. Après filtration et en excluant les variants déjà vus 7 fois ou plus dans les projets de site, 5 variants sont retenus dans 4 gènes. Dans *DHCR7*, gène du syndrome de Smith-Lemli-Opitz d'hérédité autosomique récessive; mais il n'y a pas d'autre variant à l'état hétérozygote ni d'argument pour une délétion intragénique par analyse quantitative du nombre de lectures. Dans *PIEZO2* et *DCC*, les variants hétérozygotes étaient hérités d'un parent sain. Enfin dans *SPTANI*, nous avons identifié des mutations hétérozygotes composites avec une mutation non-sens (c.466C>T ; p.Arg156X) d'origine paternelle, et une mutation du site accepteur d'épissage (c.1086-2A>G) d'origine maternelle. La membrane plasmique, constituée d'une bicouche phospholipidique, est soutenue par un squelette membranaire (sous-membranaire) qui lui confère une robustesse tout en lui permettant de garder sa propriété de « mosaïque fluide » (100). Ce squelette membranaire est composé en majeure partie par une protéine : la spectrine (101). Les mutations de *SPTANI* codant pour la spectrine  $\alpha$ -II, étaient préalablement décrites en pathologie humaine comme responsables d'une encéphalopathie épileptique infantile précoce (EIEE5) autosomique dominante (102). Toutes les mutations décrites à type de microdélétions ou duplications en phase et survenues *de novo*, se situent dans les deux dernières répétitions du domaine C-terminal de la spectrine  $\alpha$ -II, dans le site de nucléation, et agissent par effet dominant négatif (103).



**Figure 22 Mutations de *SPTANI* et domaines protéiques de la spectrine alpha-II**

Localisation des mutations publiées en noir (dominantes, conduisant à une encéphalopathie convulsivante) et des mutations identifiées chez le fœtus de la cohorte en rouge.

Or, les mutations identifiées chez le fœtus s'opposent aux mutations à l'origine d'encéphalopathie convulsivante par leur nature (haploinsuffisance) et leur localisation dans la partie codant pour le domaine N terminal de la protéine (Figure 22). Le phénotype foetal concorde avec le phénotype de l'inactivation du gène chez la souris (104). L'identification des mutations récessives pour le gène codant la spectrine  $\alpha$ -II, permet d'élargir le groupe des spectrinopathies neuronales.

### 3.2.4. *Autres diagnostics*

Les autres diagnostics réalisés par séquençage du callosome comprennent majoritairement des MCC associées à des MCD. Ils sont indiqués ci-dessous (Table 9).

**Table 9 : Autres diagnostics réalisés par callosome**

	<b>Gène</b>	<b>Maladie</b>	<b>Mutation</b>	<b>Hérédité</b>
EFP1100206	<i>PDHA1</i>	Leigh	c.934_940del, p.Ser312ValfsX12 htz	<i>De novo</i>
GEF1300213	<i>GPSM2</i>	Chudley Mac Cullough	c.453_454dup, p.Tyr152CysfsX17 hmz	En cours
GEF1400093	<i>TUBB3</i>	Lissencéphalie	c.817C>T, p.Leu273Phe htz	<i>De novo</i>
GEF1400141	<i>TUBA1A</i>	Lissencéphalie	c.5G>A, p.Arg2His htz	<i>De novo</i>
GEF1400415	<i>PEX1</i>	Zellweger	c.1435_1439dup, p.Leu480PhefsX4 htz c.2097dup, p.Ile700TyrfsX42 htz	En cours
GEF1500049	<i>ASPM</i>	MCPH5	c.3646_3661del, p.Asn1216GlyfsX13 htz c.8206_8207del, p.Leu2736SerfsX14 htz	En cours
EFP0800215	<i>KIF11</i>	MCLMR*	c.157C>T, p.Arg53X htz	<i>De novo</i>
EFP0800249	<i>RITN</i>	Polymicrogyrie et crises d'épilepsie	c.6273del, p.Gln2092AsnfsX3 exon 46 c.1526C>T, p.Ser509Phe exon 2	En cours

\*MCPH with or without chorioretinopathy, lymphedema, or mental retardation (MCLMR, MIM 152950)  
htz: hétérozygote; hmz: homozygote

### 3.3. **Gènes candidats**

Le séquençage du callosome a mis en évidence des variations dans des gènes non impliqués à ce jour en pathologie humaine dans les MCC. Les gènes les plus candidats sont présentés ici.

#### 3.3.1. *mTOR*

Chez un couple non apparenté d'origine asiatique sans antécédent notable, une grossesse a été interrompue à 32 SA pour un fœtus présentant une microcéphalie à gyration simplifiée avec kystes de germinolyse et fonte de la substance blanche périventriculaire. Le corps calleux fœtal était fin, donc hypoplasique et les signes associés étaient une hyperplasie thymique et rénale. L'étude du callosome met en évidence 32 variants, dont quatre dans des gènes impliqués dans des microcéphalies d'hérédité récessive. Mais ces variants sont tous à l'état hétérozygote. Une analyse quantitative de chacun de ces gènes ne montre pas de délétion/duplication pour chacun des quatre gènes.

Par contre, un seul variant homozygote est détecté. Il s'agit d'un variant homozygote c.4998+4A>G, dans le gène *mTOR*, au niveau du site donneur d'épissage de l'intron 35,

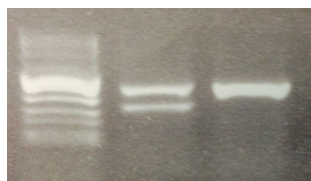
prédit *in silico* comme diminuant de 40% le site donneur d'épissage (Alamut) dont la conséquence serait une délétion de 123 acides aminés en phase au niveau protéique. Il pourrait donc s'agir d'un allèle hypomorphe.

*mTOR* (Mamalian target of Rapamycin) est une sérine thréonine kinase qui régule le métabolisme cellulaire en réponse à de nombreux stimuli environnementaux, comme des facteurs de croissance ou des acides aminés, et la disponibilité énergétique. *mTOR* fonctionne dans deux complexes protéiques distincts : *mTOR* complex 1 (*mTORC1*) et *mTORC2*. L'activation de la voie *mTORC1* facilite les synthèses protéiques via la phosphorylation de la kinase *p70S6* et des protéines *4EBP1* et *2*. En même temps, il supprime la dégradation protéique en inhibant l'autophagie. Ainsi, il est impliqué dans de nombreux processus comme la croissance cellulaire, la prolifération et la survie, en jouant sur l'anabolisme et le catabolisme. Le cerveau étant un des organes qui consomme le plus d'énergie, *mTOR* joue un rôle essentiel dans les neurones. En pathologie humaine, la voie *mTOR* est impliquée dans de nombreuses affections neuro-psychiatriques comme les maladies neuro-dégénératives, la sclérose tubéreuse de Bourneville (105), le syndrome de l'X fragile (106) et l'autisme (107)(108). *mTOR* inhibe l'autophagie, mécanisme nécessaire à la ciliogenèse, ce qui lie la voie de signalisation *mTOR* au cil primaire (109).

Ce gène est candidat puisque une perte de fonction de *mTORC1* au niveau cérébral donne une microcéphalie chez la souris (110). Par ailleurs, 6 patients ayant une délétion emportant le gène *mTOR* et présentant une microcéphalie sont répertoriés dans *decipher* (<http://decipher.sanger.ac.uk>). La région commune aux six cas mesure 3,3 Mb et comprend 45 gènes.

Nous avons pu confirmer ce variant en Sanger. La réalisation d'une RT-PCR à partir d'ARN extrait de poumon fœtal montre un transcrit aberrant en plus du transcrit normal chez le fœtus par rapport au témoin: deux bandes correspondant aux tailles attendues pour chaque transcrit ont pu être identifiées correspondant par séquençage au transcrit avec ou sans exon 35 (Figure 23).

M VIII Foetus Témoin



**Figure 23** RT-PCR à partir de l'ARN extrait de poumon du fœtus porteur de la mutation homozygote dans *mTOR* et d'un témoin de même terme

Les deux bandes présentes chez le témoin correspondent à des tailles de 387 et 264 pb ; alors que seule la bande correspondant à 387 pb est présente chez le témoin

L'analyse de ségrégation parentale a mis en évidence la variation chez le père, mais pas chez la mère faisant évoquer une délétion survenue sur l'allèle maternelle ou une disomie uniparentale paternelle. L'étude de marqueurs microsatellites a été réalisée (Table 10).

**Table 10 : Génotypage du cas index et des parents**

Microsatellite	Hg19	Fœtus	Père	Mère	
D1S2795	5,576,824	214/214	214/214	216/216	iDUP ou hDUP pat
D1S2642	6,850,702	180/180	180/182	182/182	iDUP pat
D1S2667	11,487,307	265/265	265/267	259/267	iDUP pat
D1S489	12,048,291	144/144	144/139	139/139	iDUP pat
D1S507	15,028,985	192/192	192/192	180/178	iDUP ou hDUP pat
D1S2713	44,513,476	263/263	263/263	265/263	iDUP ou hDUP pat
D1S2652	55,467,142	86/92	86/90	92/92	CBP
D1S198	67,011,512	314/310	314/318	316/310	CBP
D1S464	75,732,082	103/111	103/113	109/111	CBP
D1S2790	173,024,362	246/246	246/244	246/246	CBP

**iDUP : iso-disomie uni-parentale ; hDUP : hétéro-disomie uni parentale ; pat : d'origine paternelle**

Les dix marqueurs analysés sont informatifs. Quatre montrent une contribution bi-parentale, et ne montrent qu'une contribution paternelle. Ces résultats ainsi que la CGH array normale chez le fœtus confirment que le patient avait une isodisomie uniparentale (iDUP) paternelle, du bras court du chromosome 1. La région d'iDUP chez le proband s'étend de 1pter à 1p34.1 et mesure au moins 44,5 Mb (chr1 : 1-44,513,476, hg19). Ce résultat sera confirmé par une puce SNP, qui permettra une caractérisation plus précise de la taille de l'iDUP.

L'existence d'une iDUP révélant une mutation récessive pourrait aussi intéresser un autre gène que mTOR présent dans la région, mais non séquencé par le callosome. Afin de confirmer l'implication de ce gène, une cohorte de patients/fœtus ayant une microcéphalie primaire est en cours de séquençage de *mTOR*. Une étude du variant dans un modèle drosophile est également envisagée.

### 3.3.2. *MAP3K4*

Chez un fœtus de sexe masculin interrompu à 37 SA pour hypoplasie du corps calleux (corps calleux court), l'examen foetopathologique a confirmé le caractère isolé de la MCC. L'analyse du callosome a pointé vers plusieurs variants hétérozygotes dans des gènes récessifs sans duplication ou délétion vue (*TRAPPC9*, *HSD17B4*, *KIAA0586* et *DDC*),

dominants *BCOR* et *ZIC2*, variants prédits comme bénins par les logiciels de prédiction) ou candidat (*MAP3K4*). La ségrégation a montré que le variant c.4124G>A, p.Arg1375Gln du gène *MAP3K4* est apparu *de novo* chez le fœtus.

*MAP3K4* est un gène candidat de MCC car les souris invalidées pour l'orthologue nommé *Mekk4* présentent une agénésie partielle ou totale du corps calleux (111) par défaut de prolifération gliale et ou neuronale et probable défaut de fusion de ligne médiane. *Mekk4* est fortement exprimé dans le neuroépithélium. Il a un rôle anti-apoptotique et la perte de l'activité *Mekk4* provoque des anomalies de fermeture du tube neural par induction d'excès d'apoptose (111). *MAP3K4* est un médiateur majeur de la voie p38MAPK et un médiateur mineur de la voie Jnk de réponse cellulaire au stress.

De façon intéressante, il a été démontré que *MAP3K4* joue un rôle dans la migration cellulaire et l'acidification du milieu extra-cellulaire de cellules de cancer du sein, via le complexe ERBB2-ERBB3-heregulin bêta1. Or ERBB2 est un récepteur des neurorégulines, impliquées dans la neurogenèse. Ces récepteurs sont présents sur les cellules de la glie radiaire et à un moindre degré dans les neuroblastes, surtout au début du développement chez les souris. Le lien entre *MAP3K4* et ERBB2 est d'autant plus intéressant qu'une mutation *de novo* de ce gène a été identifiée chez un autre fœtus (cf chapitre 4.2.1).

### 3.3.3. *KIF3A*

Chez un couple non apparenté sans antécédent notable, un fœtus de 23 SA présentait une microcéphalie avec agénésie du corps calleux. L'examen neuropathologique a révélé une microlissencéphalie avec des zones germinatives volumineuses et confirmé l'agénésie du corps calleux. Le séquençage du callosome met en évidence une variation faux-sens hétérozygote du gène *KIF3A*.

Les kinésines sont des moteurs moléculaires ATP dépendants impliqués dans le transport intracellulaire le long des microtubules. *KIF3A* code pour un membre de la superfamille des kinésines du complexe hétérotrimérique kinesin2 composé des deux sous-unités motrices kif3a et kif3b et d'une protéine cargo kap3. Ce moteur microtubulaire se dirige vers les extrémités plus des microtubules. Kinesin2 a surtout été décrit dans le cil pour son rôle de transport des complexes protéiques le long de l'axonème de la base vers le sommet du cil : le transport intra flagellaire IFT-B. Les souris invalidées à l'état homozygote pour *Kif3a* ont des anomalies de fermeture du tube neural, une troncation caudale et un défaut de latéralisation. En dehors du cil, kinesin2 est impliqué dans le transport vésiculaire. De nombreuses kinésines ont été impliquées dans les anomalies du développement cortical et les microcéphalies (112)

par atteinte de la dynamique des microtubules. L'analyse de ségrégation parentale et la survenue *de novo* de cette variation serait en faveur de la pathogénicité de ce variant.

### 3.3.4. *NFIB*

Chez un couple non apparenté, la grossesse a été marquée par la découverte d'une hyperclarté nucale au premier trimestre de la grossesse et l'échographie morphologique réalisée à 27 SA a révélé une hypoplasie du corps calleux associée à une séquestration pulmonaire sous diaphragmatique. Ce syndrome polymalformatif a été confirmé par l'examen fœtopathologique, et a révélé un défaut de lobulation pulmonaire (2 lobes de chaque côté) et des anomalies mineures de l'axe radial. L'examen neuropathologique révèle une macrocraînie associée à une mégalencéphalie supérieure au 95° percentile, en plus d'un corps calleux hypoplasique fin et inférieur au 5° percentile en longueur.

L'ADN a été analysé par callosome, et après filtration, les données du callosome révèlent un variant faux-sens hétérozygote du gène *NFIB* considéré comme pathogène *in silico*. Ce variant c.1066\_1067delinsCT, p.Ser356Leu (NM\_001190737.1) n'a jamais été vu, ni dans les exomes/panels locaux, ni dans les bases de données publiques ExAC, 1000 genome ou EVS. C'est le seul variant convainquant car les autres sont des variants hétérozygotes dans des gènes de maladie autosomique récessive (*NIN*, *MSH2*, *AHNAK2*) n'ayant ni délétion ni duplication intragénique. L'analyse de ségrégation a montré l'existence de la variation chez la mère. Cependant, la mère est substituée par subutex pour sevrage d'intoxication chronique. Elle est elle-même née d'une mère ayant des troubles bi-polaires. Ni la mère ni la grand-mère n'ont eu d'IRM cérébrale et le caractère hérité du variant n'exclut pas qu'il soit pathogène.

La famille NF1 est une famille de facteurs de transcription qui comprend quatre membres : NFIA, NFIB, NFIC et NFIX. Ils ont un domaine N-terminal de dimérisation et de liaison à l'ADN. Ils se fixent à un site dyad-symétrique (TTGGCN<sub>5</sub>GCCAA) et forment des homo et des hétérodimères. Ils sont fortement candidats car impliqués dans le développement cérébral. Les souris invalidées pour *Nfia* ont une hydrocéphalie sévère associée à une agénésie du corps calleux (113). Les souris invalidées pour *Nfib* ont une agénésie calleuse associée à des anomalies au niveau de l'hippocampe et du pont, un élargissement des ventricules latéraux et une perte des populations gliales de la ligne médiane (114). Il existe des anomalies pulmonaires de type retard de maturation pulmonaire avec un épaissement du mésenchyme. Pour NFIA et NFIB, il y a diminution de production de GFAP par les astrocytes de la ligne médiane. Le mécanisme sous-jacent n'est pas clair : il pourrait s'agir d'une altération de l'expression des autres NFI, ou d'une altération de l'activation ou la répression des gènes

cibles par exemple. Il a été évoqué que Pax6 était un régulateur des Nfi mais cela vient d'être infirmé récemment (115). Par contre NFIA est un effecteur de Fgf8 et est fortement exprimée à 7 semaines de gestation chez l'homme au niveau de la plaque commissurale, en même temps que Emx1 : c'est le lieu où passeront les fibres calleuses ultérieurement.

Pour cette famille ou le caractère hérité du variant pourrait ne pas exclure sa causalité du fait des antécédents psychiatriques du côté maternel, la technique du CRISPR-Cas9 permettant de reproduire exactement le variant dans un modèle donné permettrait de s'affranchir du fond génétique variable d'un individu à l'autre et d'étudier réellement l'effet du variant sur le phénotype. Cette technique devrait permettre de répondre à la question de la pénétrance variable des malformations du corps calleux liée au fond génétique différent d'un individu à l'autre, posant des difficultés d'interprétation des variants candidats.

#### **4. ETUDE EN TRIO ou QUATUOR PAR WES (WHOLE EXOME SEQUENCING)**

Pour 13 fœtus, l'ADN des parents était disponible, et nous avons pu réaliser un exome en trio parents-enfant, ou en quatuor dans une forme familiale.

##### **4.1. Diagnostics**

Grâce à cette stratégie 5 diagnostics ont pu être établis (Table 11), représentant 3% de la cohorte. En plus de la mutation *de novo* du gène *ZBTB20* déjà discutée (chapitre 3.2.1) un diagnostic de syndrome de Goldberg-Schprintzen avait été réalisé par exome par l'équipe du Karine Poirier à Cochin (116) chez un fœtus de la cohorte EFP0318521 présentant une anomalie cérébrale à type de polymicrogyrie. L'absence de maladie d'Hirschsprung, inconstante dans le syndrome, rendait difficile le diagnostic dans cette famille.

Le diagnostic de syndrome génitopatellaire (OMIM 606170) est également difficile à réaliser en anténatal. Ce syndrome très rares dont le pronostic est très sombre associe une dysmorphie faciale, des anomalies génitales (hypoplasie scrotale et une cryptorchidie) et rénales (reins polykystiques ou hydronéphrose), une microcéphalie, un déficit intellectuel, des pieds bots et est caractérisé par une absence de rotule. Les anomalies cérébrales possibles sont une agénésie du corps calleux, des hétérotopies periventriculaires, une microcéphalie. Le fœtus présentait une ACC et des anomalies génitales, un RCIU, mais pas de microcéphalie. La rotule est visible à l'échographie fœtale mais à rechercher activement.



L'hypoplasie ponto-cérébelleuse (PCH) réfère à un groupe de troubles neurodégénératifs graves affectant la croissance et la fonction du tronc cérébral et du cervelet. L'association à une atteinte de la corne antérieure définit le type 1 de Barth (OMIM 607596). Les étiologies sont très diverses car de nombreuses maladies du métabolisme peuvent comprendre un PCH dans leur spectre telles que le syndrome des glycoprotéines déficientes en hydrates de carbone (CDG), les dystrophies cérébromusculaires (syndrome de Walker-Warburg, de Fukuyama, ou syndrome muscle-eye-brain), maladies du métabolisme énergétique. En plus de ces maladies, il existe 10 locus de PCH à ce jour, associant parfois une microcéphalie ou une agénésie du corps calleux. Tous sauf un sont d'hérédité autosomique récessive et l'un lié à l'X. L'hétérogénéité des PCH rendait difficile un diagnostic moléculaire qui sera certainement facilité par l'introduction des panels NGS en diagnostic, et pourra ainsi permettre un diagnostic prénatal moléculaire aux familles.

Dans un cas, une agénésie du corps calleux paraissant isolée était associée à une agénésie des pyramides à l'examen neuropathologique. Ce phénotype avait fait évoquer une mutation du gène *LICAM*. Le séquençage a permis d'établir un diagnostic de déficit en *PDHA1*, pathologie avec un pronostic sombre, constamment défavorable. De façon intéressante, une mutation du gène *PDHA1* a également été identifiée par callosome chez un fœtus féminin présentant le même phénotype, définissant une phénocopie du syndrome de Bickers-Adams.

Au total pour ces diagnostics, il s'agissait de syndromes comportant des signes visibles uniquement en post natal soit parce qu'ils ne sont pas malformatifs soit parce que les anomalies apparaissent plus tard dans la vie (*ZBTB20*, surdité). Pour d'autres, il s'agissait de phénopies d'autres syndromes qui avaient fait égarer le diagnostic (*PDHA1*).

**Table 11 : Diagnostics faits par exome**

	<b>Gene</b>	<b>Syndrome</b>	<b>Mutation</b>	<b>Hérédité</b>
EFP0318521	<b><i>KIAA1279</i></b>	Goldberg-Schprintzen	délétion homozygote des exons 2 et 3	Parents hétérozygotes
GEF1300068	<b><i>ZBTB20</i></b>	Primrose	c.c.1906T>C, p.Cys636Arg	<i>De novo</i>
GEF1200165	<b><i>KAT6B</i></b>	Génitopatellaire	c.3788-3789del,p.Lys1263ArgfsX7 htz	<i>De novo</i>
EFP0600238	<b><i>PDHA1</i></b>	Déficit en PDH	c.910C>T,p.Arg304X htz	<i>De novo</i>
GEF1400017	<b><i>AMPD2</i></b>	PCH type 9	c.682G>T,p.Glu228X hnz	Parents hétérozygotes

## 4.2. Gènes candidats

Deux gènes candidats intéressants sont en cours d'évaluation (Table 12). Leur validation passera par une cohorte de réplication d'agénésies du corps calleux sur une cohorte nationale post natale d'ACC avec déficience intellectuelle actuellement en cours de séquençage par callosome sur lequel ces deux gènes sont présents.

**Table 12 : Gènes candidats pointés par exome**

	<i>De novo</i>	<i>Récessif</i>	Variants, ségrégation	Fonction
GEF1300071	<b><i>ERBB2</i></b>	<i>non</i>	c.2744C>G, p.Pro915Arg <i>De novo</i>	Communication neurones-glie
EFP1100410F1 & 2	<i>non</i>	<b><i>FARP2</i></b>	c.814A>G, p.Lys272Glu maternelle c.1785C>T,p.Arg595Arg paternelle	Semaphorine 3A/f Plexin-A / Autism

### 4.2.1. *ERBB2*

Chez un couple non apparenté sans antécédent notable, la 3<sup>o</sup> grossesse a été interrompue à 29 SA pour agénésie isolée du corps calleux confirmée à l'examen neuropathologique avec visualisation de bandelettes de Probst.

L'analyse de l'exome a montré une bonne couverture avec 98% des séquences cibles couvertes à 15X et une couverture moyenne de 100X. Nous avons obtenu un total de 413 723 variants pour le trio. Après filtration (cf méthode 2.2.4), nous nous sommes concentrés sur les variants survenus *de novo* chez le fœtus, ou hérités sur le mode récessif (homozygote ou hétérozygote composite), et pour les faux-sens sur celles qui étaient prédites comme pathogènes par les logiciels de prédiction *in silico*. Ceci nous a permis d'identifier un seul variant *de novo* c.2744C>G, p.Pro915Arg du gène *ERBB2*. Ce variant concerne un acide aminé très conservé et le changement provoque un écart physico-chimique important. Il est situé dans le domaine catalytique kinase de la protéine. Il a été confirmé par séquençage Sanger, ainsi que sa ségrégation en mode *de novo*.

*ERBB2* est un récepteur des neurorégulines, impliquées dans la neurogenèse. Ces récepteurs sont présents sur les cellules de la glie radiaire et à un moindre degré dans les neuroblastes, surtout au cours du développement précoce chez les souris. Les neurorégulines régulent avec un effet dose la vitesse de migration des neuroblastes sur les cellules de la glie radiaire, par un effet direct sur les cellules de la glie radiaire. *In vitro* sur cellules en culture, *ERBB2* est exprimé sur les cellules de la glie radiaire. Chez les souris invalidées pour *ErbB2*, les arborisations des prolongements des cellules de la glie radiaire disparaissent. Ce sont les

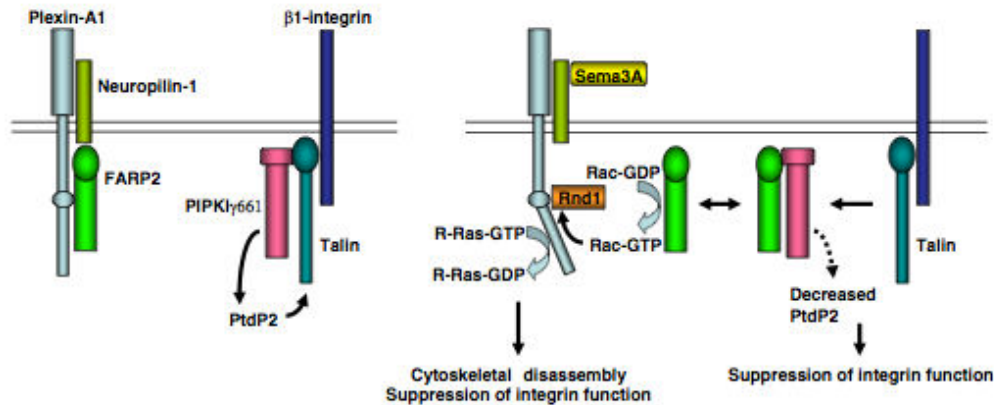
terminaisons qui se font à la limite entre zone marginale et plaque corticale (couches I/II). A cause de la létalité embryonnaire, le phénotype cérébral est impossible à déterminer après E11 (117). L'effet de cette mutation pourrait être testé *in vitro* sur des cultures cellulaires, et idéalement dans des modèles animaux, zebrafish ou murin (Knock-in). L'hypothèse pour ce gène serait qu'un retard de migration des neurones calleux vers la plaque corticale pourrait provoquer une agénésie du corps calleux par le décalage dans le temps du croisement de la ligne médiane par les axones calleux.

#### 4.2.2. *FARP2*

Un couple non apparenté a eu une interruption médicale de grossesse pour triploïdie puis une fille bien portante. Ils ont ensuite eu deux IMG pour agénésie totale du corps calleux par défaut de décussation, isolée, découverte au deuxième trimestre de grossesse pour les cas II :3 et II :4 et confirmée par l'examen neuro et fœtopathologique.

L'analyse de l'exome en quatuor a montré une bonne couverture avec 99% des séquences cibles couvertes à 15x et une couverture moyenne de 150 à 209X. Nous avons obtenu un total de 144 395 variants pour le quatuor. Après filtration, nous nous sommes concentrés sur les variants fœtaux survenus *de novo* (hypothèse d'une mosaïque germinale), ou transmis selon mode récessif homozygote ou hétérozygote composite, et pour les faux-sens celles qui étaient prédites comme pathogènes *in silico*. Cette analyse a permis d'identifier exclusivement deux variants dans le gène *FARP2* (NM\_014808.2) confirmés par séquençage Sanger : le variant synonyme c.1785C>T; p.= est hérité du père, et prédit *in silico* comme créant un site donneur d'épissage avec un saut d'exon probable. Ce variant est localisé dans l'exon 16, au niveau du domaine d'homologie de la protéine. Il s'agit d'un variant rare (rs138838419) vu en hétérozygote avec une fréquence de 3/1000. Le variant faux-sens c.814A>G, p.Lys272Glu hérité de la mère est situé dans le domaine FERM de la protéine, et prédit comme pathogène selon tous les logiciels de prédiction.

La forme des neurones est la plus variée de tous les types cellulaires. L'extrémité de chaque neurite est extrêmement sensible à des gradients de molécules attractives ou répulsives et choisira en fonction de son environnement parmi de multiples trajets et cibles synaptiques pendant le développement. Comme dans les autres types cellulaires, les changements morphologiques et la mobilité des neurones sont en lien étroit avec l'organisation des protéines du cytosquelette, comme par exemple la polymérisation de filaments d'actine. Ces phénomènes sont induits entre autres par les sémaphorines (118).



**Figure 24 : Schéma du rôle de FARP2 dans l'initiation de la voie de signalisation Sema3A-PlexinA1**

La liaison de Sema3A au complexe du récepteur comprenant la Neuropilin1, sous unité de liaison au ligand, et la plexinA1, sous-unité de transduction du signal, provoque la dissociation de FARP2. FARP2 libéré a alors deux rôles dans la voie de signalisation. D'une part il acquiert son activité RacGEF, essentielle au recrutement de Rnd1 par Plexin-A1 et activation de R-Ras, ce qui provoque un désassemblage du cytosquelette et une suppression des fonctions intégrines. D'autre part, il se lie à PIPKIγ661 dont il inhibe l'activité kinase. Ceci inhibe l'adhésion focale (119).

Or FARP2 joue un rôle dans l'initiation de la voie de signalisation Sema3A-PlexinA1 (Figure 24).

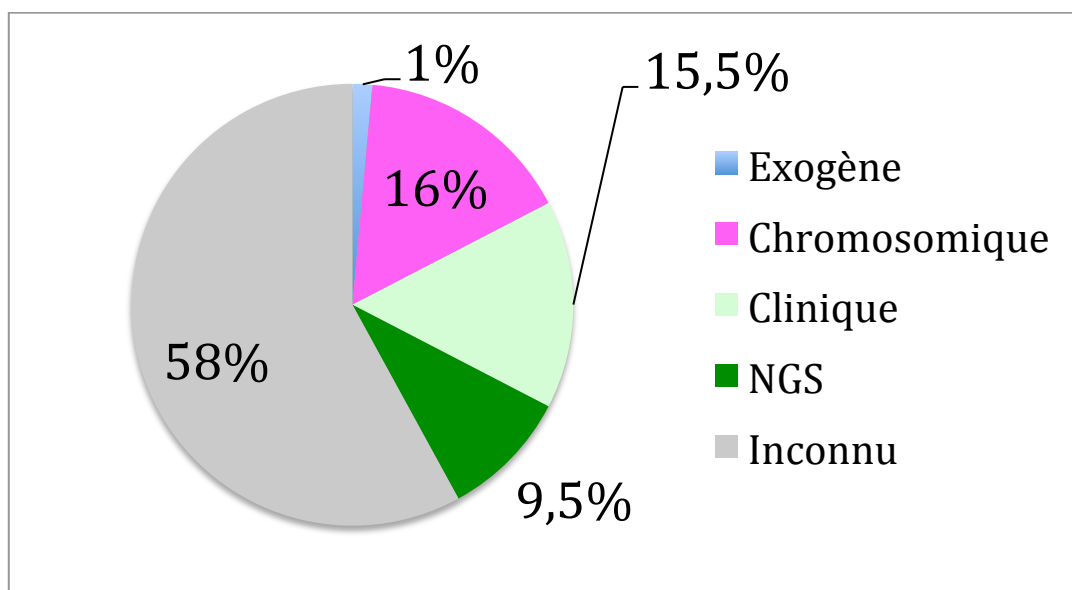
Pendant le développement, les axones calleux, originaires des neurones des couches supérieures, se dirigent vers la ligne médiane. A l'opposé, les axones des couches profondes projettent vers les structures sous-corticales. Netrin-1 est impliqué dans la croissance axonale vers les structures sous-corticales. Sema3A a un rôle d'orientation médiane de croissance axonale des neurones corticaux des couches supérieures. Ce mécanisme passe par une répulsion latérale à travers un gradient d'expression de Sema3A chez la souris *in vivo* (120).

Par ailleurs, au niveau de la ligne médiane, pendant le développement du corps calleux, deux sous populations transitoires de neurones glutamaergiques et gabaergiques occupent une position stratégique pour contribuer à la guidance des axones calleux, à travers la formation d'un réseau tri-dimensionnel organisé qui évolue dans le temps (en terme de proportion de neurones glutamaergiques et gabaergique). De plus, les deux populations neuronales ont la capacité d'attirer chimiquement les axones calleux et cette activité est dépendante de la fonction Sema3C de la population glutamaergique (121). Sema3C est nécessaire au développement des voies calleuses *in vivo*. Ces neurones apparaissent au niveau de la frontière corticoseptale avant le croisement des axones pionniers calleux. Ces activités sont distinctes de celles des cellules gliales du « glial wedge » et de l'indusium griseum.

Les amniocytes étant disponibles, il serait possible de les dédifférencier en cellules souches et de les re-différencier en précurseurs neuronaux et ainsi d'étudier l'effet du variant sur le phénotype cellulaire concerné.

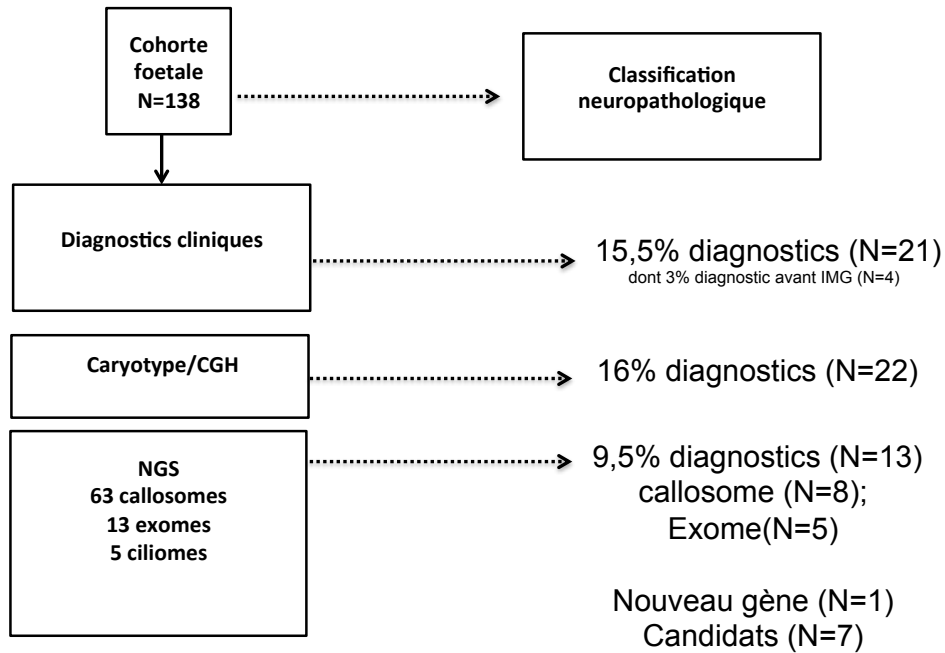
## 5. CONCLUSION

Au total, sur cette cohorte de MCC, le taux diagnostique est de 42% (N=58/138) (figure 25).



**Figure 25** Nombre en pourcentage et moyens des diagnostics réalisés dans la cohorte de MCC fœtal

Il y a 15,5% de diagnostics établis par séquençage Sanger orienté par le phénotype, 9,5% de diagnostics supplémentaires par NGS (exome, callosome), 16% d'anomalie chromosomique, dont des remaniements chromosomiques déséquilibrés cryptiques décelés par CGH array.

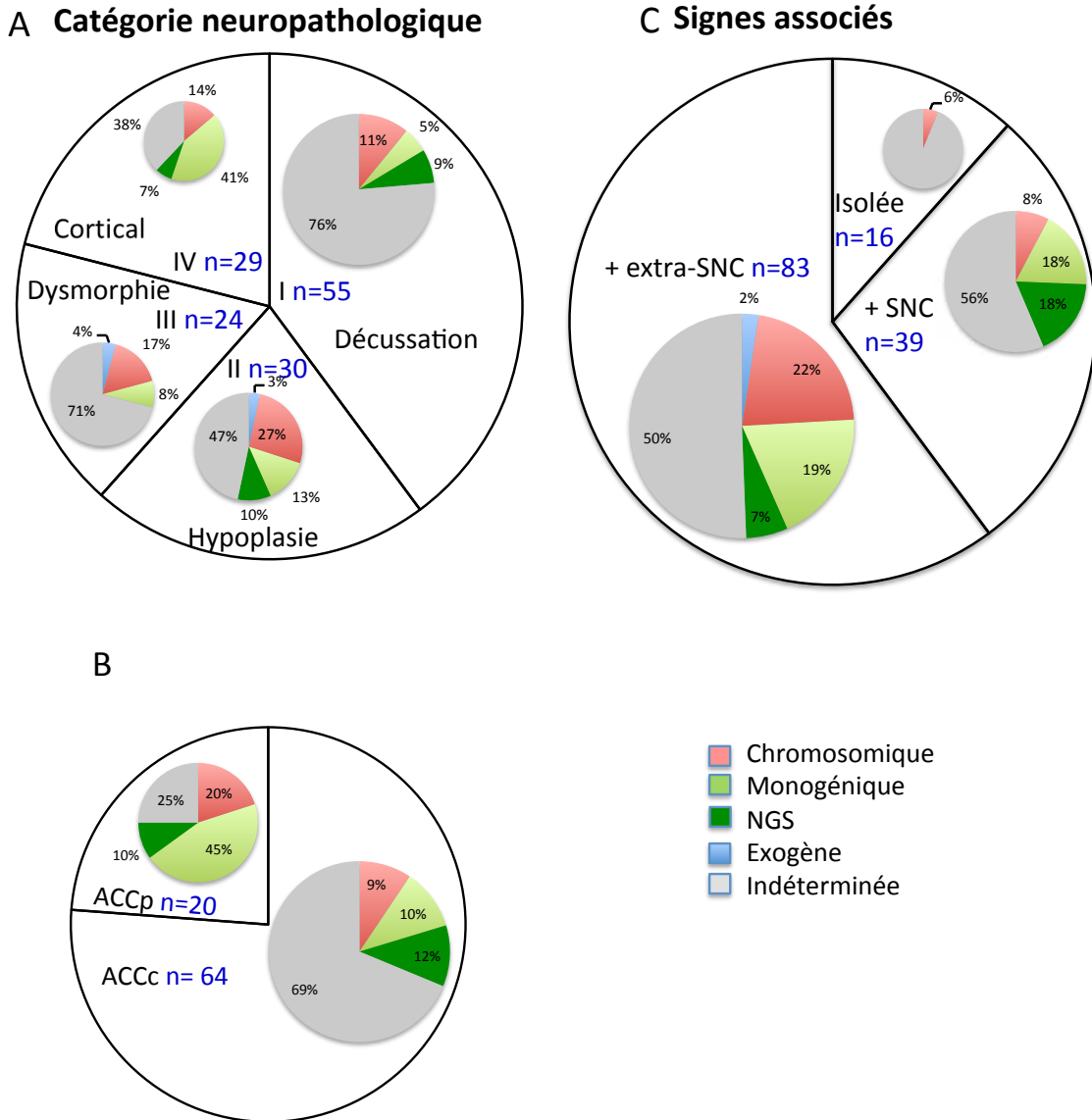


**Figure 26 : Organigramme des diagnostics de la cohorte foetale**

La recherche de microremaniements déséquilibrés par CGH array en complément des techniques d'analyse de cytogénétique standard a permis de réaliser 16% de diagnostics. Parmi eux on note principalement des HCC (N=10).

Le NGS a permis 9,5% (N=13) de diagnostics certains supplémentaires. Parmi ces derniers (Figure 26), tous sont établis dans des formes de MCC associées à des signes cérébraux ou extracérébraux après examen foetopathologique. Parmi ceux-ci, 3 cas de MCC paraissaient isolés à l'imagerie anténatale (2 syndromes de Coffin-Siris et un syndrome de Primrose). 3 sont du groupe II et 2 sont du groupe IV. Le nombre de diagnostics est augmenté de 50% par le NGS dans les catégories suivantes : MCC du groupe I (N=5/8), ACCc (N=8/13) et MCC apparemment isolées à l'imagerie, avant examen foetopathologique.

Au total, le plus grand nombre de diagnostics établis par catégorie neuropathologique est dans les groupes suivants (Figure 27) : 1/ les ACCp avec un taux de 75% (N=15/20); 2/ les MCC par anomalies de développement cortical avec un taux de 68% (N=18/29); et 3/ dans les MCC associées à des signes extra-cérébraux avec un taux de 50% (N=42/84). Les MCC isolées au terme de l'examen foeto-neuropathologique dans la cohorte restent sans diagnostic à l'issue des analyses génétiques à l'exception d'un cas de trisomie 8.



**Figure 27 Etiologies retrouvées en fonction du phénotype foeto/neuropathologique**

Les étiologies identifiées dans chaque catégorie neuropathologique (A), dans les formes isolées ou associées (C) sont indiquées. Les ACC complètes ou partielles (B) sont comprises dans les groupes I et III, et correspondent à la situation d'imagerie anténatale précoce ou le mécanisme n'est pas encore identifié. L'apport du NGS varie de 6 à 18% sauf pour les fœtus avec ACC isolée et le groupe III.

Les MCC isolées (16 ACCc et 2 HCC) restent la catégorie avec le moins de causes génétiques identifiées au terme de cette étude; et plusieurs hypothèses sont possibles : 1/ le(s) gène(s) ne sont pas compris dans la panel callosome ; 2/ le(s) variant(s) peuvent être situé dans les régions non codantes ; 3/ il existe un remaniement en dessous du seuil de la CGH array ou équilibré ; 4/ le déterminisme est multigénique. De nombreux variants candidats sont en cours de validation. En particulier, pour certains fœtus, un multigénisme est évoqué comme événement causal : plusieurs fœtus ont plusieurs variants candidats, parfois dans des gènes

connus pour être dans des voies de signalisation interagissant les unes avec les autres comme les Slit par exemple. L'identification de causes dans les autres catégories souligne le fait que la MCC est le signe d'une pathologie sous jacente à laquelle est lié le pronostic.

Ce travail a par ailleurs permis d'identifier un nouveau gène du cil primaire en pathologie humaine chez des fœtus avec MCC.



## IV. DISCUSSION

### 1. Rôle du cil primaire dans le développement cérébral

Nos travaux ont permis l'identification d'un nouveau gène ciliaire responsable d'un phénotype extrême par mutations perte de fonction de *KIAA0586* chez des fœtus ayant une malformation du corps calleux syndromique (Alby et al, AJHG 2015), et des mutations de ce gènes ont parallèlement été identifiées chez des patients atteints de syndrome de Joubert (92,93). Ces résultats démontrent le rôle majeur de ce gène et plus généralement du cil primaire et de la voie de signalisation hedgehog dans le développement cérébral.

La plupart des cellules du système nerveux central-progénérateurs neuronaux, neurones post-mitotiques et interneurons-ont un cil primaire (122). De nombreuses ciliopathies sont associées à des malformations cérébrales (123,124), et celles-ci sont caractérisées par une grande variabilité reflétant le rôle complexe du cil primaire dans de nombreux processus fondamentaux du développement du système nerveux central.

Certains fœtus ont une anencéphalie ou une encéphalocèle occipitale montrant un rôle de *KIAA0586* dans la neurulation primaire. Pendant les 4 premières semaines du développement, la plaque neurale se transforme en tube neural, pour finalement former la moëlle épinière et le cerveau (125,126). La fermeture de l'axe commence du milieu vers les extrémités rostro-caudales de l'embryon. Cette étape du développement est contrôlée par un double gradient Shh et Wnt avec un feedback négatif de l'un par rapport à l'autre. SHH spécifie ventralement le tube neural et forme les cellules neurales progénitrices (127), ce qui requiert le cil primaire (128). Les mutants *Talpid3* poulet, souris et zebrafish ont un défaut de ventralisation du tube neural. Par ailleurs, les voies de signalisation Wnt sont critiques pour le développement cérébral et la spécification du tube neural. Le cil primaire inhibe la voie Wnt canonique (129,130). Cette voie de signalisation n'a pas été étudiée dans les cellules mutantes mais nous pouvons émettre l'hypothèse d'une dérégulation de cette voie, concomitante de la voie Shh.

D'autres fœtus ont un microcerveau suggérant un rôle de *KIAA0586* dans les étapes de prolifération. Après la fermeture du tube neural, le nombre de cellules ciliées augmente en même temps que la neurogenèse avance, ce qui suggère un lien entre les deux (131).

La polymicrogyrie présente chez certains fœtus suggère un rôle de *KIAA0586* au niveau de la migration cellulaire. Le rôle du cil primaire dans la migration neuronale est

controversé en fonction des études, l'une disant que le cil n'apparaît que dans les neurones post migratoires (132) alors que d'autres semblent montrer son rôle dans les neurones en migration (133,134).

Les anomalies du corps calleux pourraient ainsi résulter d'un défaut de prolifération ou de migration neuronale, mais également d'un défaut de la ligne médiane. En effet, le rôle du cil dans le développement à proprement parler du corps calleux a été démontré dans des modèles murins. Une diminution de Gli3R au niveau de la ligne médiane cérébrale est responsable d'un défaut de circonscription du territoire FGF8 au moment de l'induction du prosencéphale, et cela provoque en conséquence une désorganisation des neurones de la frontière corticoseptale (34) qui ont un rôle majeur dans la mise en place du corps calleux, et de par leur organisation et de par leurs capacités d'attraction chimique par les sémaphorines (121). Le défaut de clivage de GLI3 et la diminution du rapport GLI3R/GLI3A que nous avons montré dans les fibroblastes des patients existe probablement aussi au niveau de la ligne médiane cérébrale. Il serait intéressant de savoir quels sont les interactants directs de la protéine, et ce directement dans les tissus d'intérêt.

Par ailleurs, l'analyse du transcriptome au niveau du cortex cingulaire, de la zone de fusion de la plaque commissurale et de la commissure hippocampique d'un fœtus atteint et interrompu pourrait être comparée à celle d'un fœtus témoin de même terme. Ces études permettraient d'avoir une vision globale des gènes et voies de signalisation dérégulées par les mutations de *KIAA0586*. Ces études étant difficilement réalisables chez l'homme, une étude chez le poulet ou la souris permettrait de mieux comprendre le rôle de *KIAA0586* dans le développement et la mise en place du corps calleux en particulier. Une étude en RNAseq aurait l'avantage de pouvoir détecter des isoformes nouvelles et des ARN non codants par rapport aux puces Affymetrix et l'analyse pourrait être quantitative et qualitative.

Les fœtus/enfants mutés pour *KIAA0586* avaient une hydrocéphalie majeure. Or les cellules épendymaires qui bordent les ventricules cérébraux ont des cils mobiles qui assurent la bonne circulation du liquide céphalorachidien (LCR). Une hypothèse serait l'altération des cils mobile : *KIAA0586* est une protéine centriolaire et la biogenèse des cils mobiles se fait par une multiplication des centrioles. Une atteinte de la voie Wnt non canonique au niveau de ces cils mobiles provoque également une hydrocéphalie (124,125). On peut à nouveau suggérer une dérégulation de cette voie au niveau des cellules épendymaires des patients. Cependant, l'hydrocéphalie peut aussi provenir d'un excès de production de LCR par les cellules des plexus choroïdes. Elle se développe dans ce cas du fait d'une atteinte du cil

primaire des cellules des plexus choroïdes, par un défaut de signalisation neuropeptidique et de transport ionique (126,127).

Enfin, l'agénésie des bulbes olfactifs suggère un défaut au niveau du territoire ventral du prosencéphale. Or ce territoire est dépendant de SHH et les mutations altèrent de manière drastique la voie SHH.

Tout en laissant de nombreuses questions ouvertes, ces travaux confirment l'importance et la complexité du rôle du cil primaire dans le développement cérébral en général, et en particulier du corps calleux.

## **2. Hétérogénéité génétique des MCD**

Les causes de MCC sont hautement hétérogènes et certaines MCC révèlent pendant la période anténatale des anomalies de prolifération et/ou migration neuronale, pathologies du développement cortical extrêmement hétérogènes qui peuvent être démantelées par les panels ciblés ou l'exome.

### **2.1. Microcéphalies primaires**

Dans notre cohorte, 22 fœtus avaient une hypoplasie du corps calleux associée à une microcéphalie isolée ou associées à d'autres signes cérébraux ou extracérébraux et la plupart (N=13) ont eu un diagnostic étiologique, soit par CGH array, soit par séquençage du callosome/exome.

Dans la cohorte, deux cas de MCPH par défaut de prolifération/apoptose associées à une hypoplasie du CC ont des mutations du gène *ASPM*.

La microcéphalie primaire autosomique récessive (MCPH) appelée antérieurement « microcéphalie vera » est caractérisée par un périmètre crânien inférieur à 2 déviations standards (DS) à la naissance pour l'âge, le sexe et l'ethnie, une croissance crânienne est ensuite très lente, sans anomalies notables de l'architecture cérébrale, sans déficit neurologique significatif mais parfois une épilepsie (10%), un déficit intellectuel variable, et l'absence de malformations viscérales. La distinction entre les patients avec une microcéphalie et une taille normale, et ceux avec une petite taille permettait de distinguer la MCPH et le syndrome de Seckel (SCKL, OMIM 210600), mais l'on sait désormais qu'ils appartiennent à un même spectre clinique, les mutations dans les gènes connus résultant dans l'un ou l'autre des phénotypes. Il existe 15 gènes de MCPH, et certains gènes sont associés à

un locus SCKL uniquement à ce jour (Table 13). Tous se transmettent sous un mode autosomique récessif et la plupart des gènes codent pour des protéines associées au centrosome (139).

**Table 13 : Gènes responsables de microcéphalies primaires/ syndrome de Seckel**

Gène	Chr	Locus MCPH	Locus SCKL	OMIM
<i>MCPH1</i>	8p23.1	<i>MCPH1</i>		607117
<i>WDR62</i>	19q13.12	<i>MCPH2</i>		613583
<i>CDK5RAP2</i>	9q33.2	<i>MCPH3</i>		608201
<i>CASC5</i>	15q15	<i>MCPH4</i>		609173
<i>ASPM</i>	1q31.3	<i>MCPH5</i>		605481
<i>CENPJ</i>	13q12.12	<i>MCPH6</i>	<i>SCKL4</i>	609279
<i>STIL</i>	1p33	<i>MCPH7</i>		181590
<i>CEP135</i>	4q12	<i>MCPH8</i>		611423
<i>CEP152</i>	15q21.1	<i>MCPH9</i>	<i>SCKL5</i>	613529
<i>ZNF335</i>	20q13.2	<i>MCPH10</i>		610827
<i>PHC1</i>	12p13	<i>MCPH11</i>		602978
<i>CDK6</i>	7q21.2	<i>MCPH12</i>		603368
<i>CENPE</i>	4q24	<i>MCPH13</i>		117143
<i>SASS6</i>	1p21.2	<i>MCPH14</i>		609321
<i>MFSD2A</i>	1p34.2	<i>MCPH15</i>		614397
<i>ATR</i>	3q23		<i>SCKL1</i>	601215
<i>CEP63</i>	3q22.2		<i>SCKL6</i>	614724
<i>NIN</i>	14q22.1		<i>SCKL7</i>	608684
<i>RBBP8</i>	18q11.2	<i>MCPH</i>	<i>SCKL2</i>	604124
<i>DNA2</i>	10q2.1		<i>SCKL8</i>	601810

A titre d'exemples, CDK5RAP2 regroupe les deux centrioles ensemble. STIL est important pour le contrôle de l'entrée en mitose et la formation du centriole. CEP152 interagit avec CEP63 et est nécessaire à la duplication du centrosome. CENPJ est nécessaire à l'élongation du centriole. MCPH1 est impliqué dans l'activité du centrosome et la réparation de l'ADN. Le centrosome joue un rôle critique au cours de la migration cellulaire, dans la formation du cil primaire, et dans la régulation de la mitose par association aux microtubules en contrôlant la formation du fuseau mitotique.

Au début du développement, le cerveau est constitué d'un épithélium pseudo-stratifié avec des cellules ayant une division symétrique, produisant deux progéniteurs filles augmentant ainsi le nombre de cellules de manière exponentielle. Ces cellules, précurseurs neuronaux avant même le début de la neurogenèse à E11 chez la souris, sont capables de réguler le nombre de neurones au final par une capacité proliférative plus ou moins grande. Ensuite, il y a le début de la neurogenèse dont le temps est déterminé par la durée du cycle cellulaire : il

existe une régulation fine du taux de prolifération versus le taux de différenciation. Des mutations dans des gènes impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN sont également impliquées dans les microcéphalies primaires. La grande question qui demeure pour ces deux mécanismes physiopathologiques est pourquoi est-ce qu'elles n'affectent que le cerveau et pas d'autres organes ?

Avant la découverte des bases moléculaires du spectre MCPH - SCKL, le motif gyral simplifié (circonvolutions secondaires et tertiaires peu profondes ou non développées) était considéré comme central pour le diagnostic des microcéphalies. La gyration dans les MCPH - SCK et les autres microcéphalies variant de quasi - normale à sévèrement simplifiée, la gyration simplifiée n'entre plus dans les critères de classification (140). Deux fœtus avec MCPH et gyration simplifiée ont permis, l'un, un diagnostic avec une mutation tronquante hétérozygote *de novo* de *KIF11* ; et l'autre de pointer vers un nouveau gène candidat : *mTOR*.

Des mutations hétérozygotes de *KIF11* ont été décrites comme responsables de microcéphalies syndromiques associées à une chorioretinopathie et un lymphoedème et/ou déficience intellectuelle dans les syndromes MLCRD (pour microcéphalie lymphoedème et dysplasie chorio-rétinienne) et (CDMMR pour dysplasie chorioretinienne, microcéphalie et déficience intellectuelle) (141). Il s'agit de microcéphalies avec gyration simplifiée à spectre clinique et pénétrance variable. Une approche de reverse-phenotyping a montré que le fœtus présentait un œdème bilatéral des dos de pieds, en accord avec la littérature (142). *KIF11* code pour une protéine du fuseau mitotique de la famille des kinésine 5, et la protéine homotétramérique a un rôle restrictif de croissance axonale (143). Trois autres gènes responsables de microcéphalie avec chorioretinopathie sont connus : *TUBGCP6* (MCCRP1, OMIM 251270), *PLK4* (MCCRP2, OMIM 616171) et *TUBGCP4* (MCCRP3, OMIM 616335), d'hérédité autosomique récessive. De façon intéressante, le conseil génétique de ce couple a pu être rectifié suite à ce résultat ayant permis le diagnostic de la seule entité de microcéphalie primaire d'hérédité dominante. Enfin, cette observation souligne la particularité de la situation anténatale : un examen du fond d'œil normal permet en postnatal de distinguer la MCPH des syndromes de microcéphalies-chorioretinopathies, et cette distinction n'est pas possible chez le fœtus.

Concernant le fœtus de la cohorte ayant une variation homozygote dans le gène *mTOR*, il est possible de tester le variant hypomorphe dans un modèle drosophile en observant

l'organisation du neuroépithélium et sa taille. Une étude a été faite pour étudier la fonction d'Asp, l'orthologue de *Aspm* chez la drosophile et a permis de montrer une altération de l'organisation du neuroépithélium par une interaction d'Asp avec la myosine II, montrant ainsi un nouveau mécanisme d'action d'Asp (144).

Pendant longtemps la stratégie moléculaire devant une microcéphalie était de séquencer *ASPM* qui compte pour 50% des causes des MCPH. Il existe un continuum entre les MCPH à gyration normale ou gyration simplifiée, et s'il n'y a pas dans les MCPH d'anomalies notables de l'architecture cérébrale, le corps calleux tend à être d'autant plus fin que la microcéphalie est sévère (145), et certains individus ont même des anomalies de migration neuronale, comme des hétérotopies, une pachygyrie ou une polymicrogyrie focale. Il existe aussi un continuum entre MCPH et microlissencéphalies, avec une grande hétérogénéité génétique (112) à laquelle répondront les techniques de NGS.

## 2.2. Troubles de migration neuronale

Les MCD par trouble de migration neuronale peuvent être révélées en anténatal par une malformation du corps calleux. Elles sont divisées en plusieurs catégories (140,146). 1/ Le spectre des lissencéphalies et des hétérotopies sous corticales en bandes dûs à des mutations dans les gènes *LISI*, *DCX*, *ARX* et *RELN*, *VLDLR* ; ou à des tubulinopathies, principalement par mutations dans *TUBA1A*, parfois *TUBB2B*, *TUBB3* et *TUBB5*. La lissencéphalie classique est caractérisée par une ventriculomégalie associée à une agyrie (absence de fissure sylvienne) et une agénésie totale du corps calleux ; 2/ les syndromes avec dystrophie musculaire congénitale par mutations dans *POMT*, *FKRP*, *POMGnT1*, *FCMD* et *LARGE*. 3/ les hétérotopies péri-ventriculaires, sous corticales et marginales.

Au total dans la cohorte, de nombreux diagnostics de MCD par trouble de migration neuronale avaient été faits par l'examen neuropathologique, et la majorité confirmés par séquençage ciblé orienté par le phénotype. Le panel NGS callosome a permis d'une part d'identifier trois tubulinopathies supplémentaires, qui n'avaient pas été trouvées par la démarche précédente : une mutation de *TUBA1A* chez deux fœtus, et une mutation de *TUBB3* chez un autre. D'autre part, il a l'avantage de permettre une exploration plus rapide et moins coûteuse de ces entités cliniques génétiquement très hétérogènes avec chevauchement phénotypique, comme par exemple avec les MCPH ou les microlissencéphalies.

### 3. Réponse aux phénocopies

L'application des techniques de NGS à la cohorte de MCC chez le fœtus a permis d'identifier des diagnostics dans certains cas où le phénotype mimait une autre pathologie par phénocopie. La combinaison d'une agénésie calleuse, d'une hydrocéphalie et d'une absence des pyramides avait fait évoquer un syndrome de Bickers-Adams (OMIM 307000), récessif lié à l'X, dû à des mutations du gène *LICAM*. Le séquençage du gène *LICAM* avait été réalisé chez ces deux fœtus de sexe féminin devant la forte présomption neuropathologique. Or l'exome et le callosome ont permis de poser le diagnostic de déficit en PDH par mutation de *PDHA1* chez ces fœtus. L'analyse rétrospective des données neuropathologiques des fœtus avec déficit en PDH a confirmé que les anomalies observées pouvaient entrer dans le cadre de cette entité clinique (147,148) auquel s'associent fréquemment une ventriculomégalie (67%) et des anomalies du corps calleux (55%). S'y associent généralement une microcéphalie (50%), une atrophie cérébrale ou cérébelleuse ou un RCIU, qui étaient absents chez les deux fœtus, peut-être en raison de l'âge. Des kystes sous-épendymaires fréquents ont été retrouvés lors de l'analyse rétrospective de l'examen neuropathologique, et n'avaient pas été considérés comme significatifs initialement. Le pronostic de cette encéphalopathie est effroyable avec 90% de décès à 4 ans.

### 4. Variabilité d'expression

#### *Variabilité selon l'âge et accessibilité des signes en anténatal*

Ce travail souligne la variabilité d'expression d'une pathologie selon l'âge. Certains signes définissant un syndrome n'ont pas de caractéristique morphologique accessible à l'imagerie prénatale comme le syndrome de Hirschsprung du syndrome de Goldberg-Schprinzen, l'hypoplasie unguéale ou l'hirsutisme du syndrome de Coffin-Siris, l'agénésie rotulienne du syndrome génito-patellaire, les taches cutanées.... Ces signes, sont cependant accessibles chez le fœtus lors de l'examen fœtopathologique. Enfin, d'autres signes fonctionnels ne sont jamais accessibles en anténatal, comme la surdité du syndrome de Chudley Mac Cullough, la déficience intellectuelle, ou parce que ils n'apparaissent qu'après la naissance parfois que plusieurs années après comme l'obésité, le retard pubertaire, la rétinopathie.

La problématique de la période prénatale est donc la suivante : certaines co-morbidités ne peuvent pas être diagnostiquées. Ceci est d'autant plus important pour les MCC qu'il est décrit dans la littérature que les MCC isolées sont de meilleur pronostic que les MCC associées à d'autres signes (19,32), et ceci conditionne le pronostic et le conseil génétique aux

couples. Or, certaines MCC paraissent isolées en anténatal et sont pourtant de mauvais pronostic. L'apport du NGS en anténatal est illustré dans ce rapport par plusieurs exemples comme le syndrome de Primrose (*ZBTB20*), le syndrome de Coffin-Siris (*ARID1B*) et la délétion 14q12 emportant la région régulatrice de *FOXG1* étudiés. Tous ces cas avaient été considérés comme des MCC isolées pendant la période anténatale alors qu'ils se sont avérés être associés après examen neuropathologique à une anomalie du ruban cortical focale de type pachygyrie pour le cas du fœtus avec la délétion impliquant la région régulatrice de *FOXG1*, et à des anomalies hippocampiques et gliales détectées par reverse-phenotyping pour le cas du syndrome de Primrose interrompu, à une surdité et des troubles autistiques apparus en post natal pour les deux cas pédiatriques de syndrome de Primrose.

Le syndrome de Pitt Hopkins, de Mowat Wilson, les déficits en glycine, et des mutations dans *FOXG1* sont autant de cas où l'ACC paraît isolée en pré natal alors que les syndromes sont associés à un déficit intellectuel sévère.

#### *Phénotypes extrêmes*

A l'inverse des phénotypes « incomplets », les formes dépistées en anténatal sont parfois beaucoup plus sévères que la maladie classiquement connue en pédiatrie. Les mécanismes génétiques par lesquels un phénotype plus sévère a été observé pour des mutations dans un même gène sont variables et illustrés par plusieurs exemples dans ce travail.

Un même gène peut donner des phénotypes différents en fonction de la nature hypomorphe ou perte totale de fonction de la mutation. Ceci est illustré par *KIAA0586* dont les mutations hypomorphes conduisent à un syndrome de Joubert et les mutations pertes de fonction à une ciliopathie létale.

*SPTANI* illustre la variabilité phénotypique par hétérogénéité allélique avec un effet de la mutation dominant négatif versus perte de fonction. Les enfants avec des encéphalopathies épileptiques de type 5 ont des mutations hétérozygotes dans la partie codant pour la partie C terminale de la spectrine alpha, dont l'effet dominant négatif a été démontré. Pourtant le fœtus ayant une MCC associée à une hypoplasie du cœur gauche a des mutations hétérozygotes composites tronquantes dans la région N terminale de *SPTANI* héritée de chaque parent qui est asymptomatique. Le mécanisme allélique est une perte de fonction qui à l'état hétérozygote n'a aucune conséquence phénotypique et le phénotype malformatif sévère est révélé par une perte de fonction bi-allélique, suivant donc un mode d'hérédité autosomique récessive. Ce résultat renforce l'importance des spectrines dans le développement du cerveau, et illustre



l'hétérogénéité allélique chez l'homme, avec deux maladies différentes associées à différents mécanismes moléculaires d'un même gène par mutations dominantes négatives ou perte de fonction.

L'exemple d'*ARIDIA* illustre le fait que certaines maladies connues en pédiatrie comme des formes en mosaïque existent sous forme de mutations germinales mais dans un phénotype extrême non viable. Le syndrome de Coffin-Siris est dû à des mutations dans des gènes du complexe SWI/SNF. *ARIDIB* a été le gène le plus fréquemment muté dans notre série, ce qui rejoint les résultats de DDD pour une large cohorte d'enfants avec déficience intellectuelle (99). En ce qui concerne *ARIDIA*, les cas publiés sont très rares et les formes pédiatriques sont plus sévères que pour les mutations dans *ARIDIB* avec des atteintes multi-viscérales décrites. Les cas fœtaux ici décrits ont un phénotype extrême. Or le nombre de reads en NGS et la confirmation par Sanger ne montrent pas d'argument pour une atteinte en mosaïque puisque la balance allélique est de 50%, sans que l'on puisse l'exclure. Cela va dans le sens de l'hypothèse d'une mutation germinale pour les deux cas fœtaux de cette série.

Cette variabilité d'expression liée à des mutations dans un même gène est largement illustrée dans la littérature, et a été accélérée grâce à l'apport du NGS. Un exemple concernant les ACC est récemment illustré par un article qui suggère un nouveau gène impliqué dans les ACC isolées, avec une famille décrite: une ACC isolée chez trois frères et sœurs pour lesquels un variant dans *CDK5RAP2* a été identifié par exome (149). Or, des mutations tronquantes avaient précédemment été décrites chez des patients avec microcéphalie (MCPH3), par abolition complète de la fonction protéique. Comme pour *KIAA0586*, des variants faux sens hypomorphes conduisent à un phénotype moins sévère, ici une ACC isolée.

## 5. Avantages et limites du NGS

### 5.1. Historique : du Sanger au NGS

La découverte des lois de Mendel en 1865, puis la découverte du support de cette hérédité, les chromosomes, par Morgan en 1930, et enfin la découverte de la structure de l'ADN par Watson et Crick en 1953 (prix Nobel de physiologie) sont à la base d'une grande révolution de la biologie. Puis, en 1977 est découverte la méthode Sanger par synthèse enzymatique sélective. Cette analyse ciblée de longs fragments de 1000pb avec peu de lectures a été à l'origine de l'identification de nombreuses causes de maladies monogéniques par sélection de régions candidates par cartographie par autozygotie. Les limites de cette méthode étaient liées à un mauvais rendement, à son caractère long et coûteux.

Le projet génome humain (Human genome project) a duré 10 ans avec un consortium international. En 2004, 99% du génome eucaryotique est publié, sans les séquences centromériques et télomériques. A partir de 2006, le séquençage nouvelle génération (NGS, par opposition au séquençage de première génération précédemment utilisé) permet une analyse non ciblée de fragments courts de quelques dizaines à centaines de paires de bases en fonction de la plateforme. Les séquenceurs à haut débit peuvent séquencer plusieurs gigabases en quelques jours et pour un coût qui diminue rapidement (150). Ainsi, le séquençage d'un génome humain peut désormais être réalisé en 15 jours pour 1500 euros.

Une analyse quantitative, dans des gènes inconnus jusqu'alors et avec toutes les isoformes possibles, et avec analyse des régions non codantes est désormais possible. Ceci a permis des études comparatives à grande échelle et des études sur l'évolution jusqu'alors inconcevables, et surtout le reséquençage de génomes humains pour déterminer l'impact de différences génétiques sur la santé et la maladie.

### 5.2. Genome versus exome versus panels

Pendant longtemps, le test génétique était d'une utilité secondaire dans la prise en charge d'un patient par rapport aux examens radiologiques et biochimiques qui orientaient les traitements. L'arrivée de panels de gènes a permis d'inclure les gènes sur lesquels les traitements d'une maladie étaient réellement efficaces et de diminuer le temps et le coût pour arriver au diagnostic étiologique.

Cette double approche de génotypage de la cohorte par CGH array et NGS permet d'identifier des variants pathogènes de type perte de fonction ou faux-sens par changement nucléotidique

(SNV), des remaniements de type insertions –délétions, des Copy Number Variants (CNV), homogènes ou en mosaïque et a révélé une isodisomie uni-parentale.

La CGH array a été évaluée par une méta-analyse avec un taux de diagnostics dans le cadre des malformations congénitales et du déficit intellectuel allant de 7 à 35% en fonction des études et un taux moyen de 10%, avec plus de faux-positifs que pour les méthodes conventionnelles qui doit rendre l'utilisation de cette technique prudente (151). Ces résultats sont confirmés par notre étude avec un apport diagnostique d'un tiers supplémentaire par rapport au caryotype standard et à la FISH pour des anomalies du corps calleux. La résolution de la CGH array utilisée est de 400 kb dans notre étude, mais un seuil de 1500kb est fixé avec des filtres sur certaines pathologies lorsqu'elle est utilisée en prénatal.

Les panels ciblés ont prouvé leur efficacité pour le diagnostic de maladies génétiquement hétérogènes comme les MCC. Les exomes en trio sont la technique qui apporte proportionnellement le plus d'éléments de réponse diagnostique, en moyenne environ 30% de diagnostics (152). Quelle place accorder à l'exome en trio dans les malformations du corps calleux ? Elle reste pour l'instant réservée au cadre de la recherche, du moins en France. Dans le contexte du prénatal, la responsabilité incombant aux soignants de ne pas chercher de découvertes fortuites à communiquer aux parents est importante (153). Ce point souligne l'intérêt de proposer un outil diagnostique par panel ciblé qui évitera ces découvertes fortuites. D'un point de vue technique, 20% des régions restent non couvertes par l'exome. Ce point peut être amélioré par des panels ciblés dont la couverture globale est meilleure comme c'est le cas pour la cohorte analysée ici. Dans un souci d'une distribution juste des moyens, et d'équité d'accès au soin, le coût d'un séquençage par panel ciblé de type callosome est moindre par rapport à l'exome. Ce qui nous a permis de séquencer une large cohorte alors que cela n'aurait pas pu être réalisé par exome.

L'identification de nouveaux gènes par les panels ciblés dans la cohorte est en cours de validation. Par rapport à une analyse globale de l'exome, ces techniques ont l'avantage de diminuer le coût, de simplifier les analyses bio informatiques et le stockage de l'information, et d'augmenter la couverture de manière importante. L'inconvénient est la difficulté de cibler certaines régions comme les régions répétées et ou riches en GC, nettement mieux analysées par le séquençage du génome entier qui ne nécessite pas de capture préalable. De plus, des délétions ou duplications de petite taille-à l'échelle de l'exon- sont aujourd'hui analysées gène par gène. Ce point est illustré ici par un fœtus pour lequel le callosome a permis de faire le diagnostic de syndrome de Coffin-Siris par visualisation d'une délétion de 380 kb dans *ARID1B*-jute sous le seuil de détection de la CGH array. Ce diagnostic a été fait car nous

avons cherché patient par patient une délétion/duplication de petite taille du fait de la fréquence élevée des syndromes de Coffin-Siris dans la cohorte. Cet exemple souligne la nécessité d'un rapprochement des outils de biologie moléculaire et cytogénétique dans le futur.

Cependant l'exome et nos panels ciblés ne s'intéressent qu'aux régions codantes du génome qui représentent environ 1% du génome total. Donc les régions régulatrices, les régions introniques profondes et les ARN non codants ne sont pas analysés. Avec le coût décroissant du NGS, la meilleure couverture par séquençage du génome entier, le rapprochement inéluctable des outils de cytogénétique et génétique moléculaire, les perspectives d'avenir s'orientent vers l'exploration d'un patient par une technique unique de séquençage du génome entier, et une analyse en plusieurs étapes : recherche de CNV (en remplacement de la CGH array), analyse de panels ciblés de gènes orientés par le phénotype (SNV et microdélétions en remplacement de panels), analyse de l'ensemble des gènes morbides connus en cas de non orientation diagnostique (en remplacement de l'exome), et enfin possibilité d'analyse des nouveaux gènes, régions ou ARN non codants. Cette technique aurait également l'avantage d'identifier les variants structuraux équilibrés.

## 6. Cil et réparation de l'ADN

Dans la littérature, un lien entre « DNA damage response » (DDR) et formation du cil primaire a été établi (154). En effet, des mutations dans *ZNF423* ont été décrites comme responsables de ciliopathies rénales, alors que ce gène joue un rôle de DDR via le complexe ATM par réduction de l'activité kinase CDK. Or la majorité des patients/fœtus de ce travail mutés *KIAA0586* ont un micro-cerveau et une micromélie sévère, évocateurs du syndrome de Seckel dû à des anomalies de DDR ; et *KIAA0586*, de même que *ZNF423*, est un partenaire de CEP290, lui même interagissant avec le complexe ATM. D'où l'hypothèse d'une DDR altérée chez les mutants *KIAA0586*. Pour tester cette hypothèse, il faudrait déterminer si la protéine co-localise avec Tip60, une protéine de DDR, dans les foci nucléaires, s'il y a une expression augmentée de  $\gamma$ H2AX phosphorylé dans les tissus des patients et une sensibilité cellulaire aux agents provoquant des lésions de l'ADN. Si l'hypothèse était confirmée, elle pourrait impliquer *KIAA0586* dans des pathologies de réparation de l'ADN en cas de mutations hypomorphes. Ces mutations pourraient causer des phénotypes dégénératifs se déclarant tard dans la vie, pendant la maintenance chronique d'un tissu donné par perte lente de cellules progénitrices adultes (154).

## V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les malformations du corps calleux constituent un trait anatomique associé ou non à une déficience intellectuelle ou une épilepsie. Devant leur hétérogénéité clinique et génétique et l'incertitude pronostique d'une telle condition, l'identification de la cause est importante car elle fournit une explication, permettant le conseil génétique adapté et anticipant le développement de possibles co-morbidités. Après une interruption médicale de grossesse, un diagnostic précis contribue à diminuer la culpabilité des couples dont la décision d'IMG a été basée sur la notion de risque. Mettre un mot sur une maladie ce n'est pas la soigner mais « penser c'est panser » (l'homme qui rit-V. Hugo).

L'étude de la cohorte fœtale par examen neuro-foetopathologique et par CGH array a permis d'identifier un diagnostic dans 32% des cas. La CGH array, l'exome en trio parents-enfant lorsque cela était possible, ou le séquençage du callosome ont permis d'augmenter considérablement le nombre de diagnostics avec un taux total proche de 50% dans la cohorte.

La démarche diagnostique par NGS se met en place et se doit de suivre de nouvelles lignes éthiques, qui se déploient en plusieurs volets : respecter l'autonomie du patient (ou des parents dans le cas des enfants et à fortiori des fœtus) par une information éclairée et des consentements, vouloir faire le bien et ne pas faire le mal en tant que soignant (« primum non nocere »), et répartir équitablement les moyens déployés dans un souci de justice. Ces grandes lignes nous permettront de discerner entre ce que l'on PEUT trouver comme variants d'une part, ce que les malades ou leurs parents SOUHAITENT savoir et ce que l'on DOIT offrir comme éléments de réponse aux patients. Comprendre pour chaque fœtus/enfant donne l'espoir de pouvoir moduler l'inné en trouvant un traitement adapté à chaque cause trouvée. Cependant, le degré de certitude de l'apport des techniques de NGS pour un diagnostic est variable en fonction de la pénétrance de la maladie et du degré d'action que l'on peut avoir dessus. La sensibilité et la spécificité du test dépendront de la décision (jugement) prise pour un cas donné.

Nous avons voulu évaluer la contribution des gènes du cil primaire dans la mise en place du corps calleux. Par une stratégie de panel ciblé, comprenant des gènes candidats ciliaires, dont certains connus dans des modèles animaux, nous avons pu identifier *KIAA0586* comme un nouveau gène de phénotype extrême de syndrome de Joubert, comprenant une MCC associée

à d'autres malformations. Par ailleurs, l'exploration génétique par exome et callosome a permis de pointer vers de nombreux autres gènes candidats en attente de duplication et de validation fonctionnelle.

Etudier les MCC, c'est s'intéresser au « câblage » et à la connectivité cérébrale qui est plus fine à repérer que les malformations corticales classiques visibles à l'IRM et représentant 8 à 14% des épilepsies réfractaires (155,156). Ces défauts de connexion corticale sont de plus en plus discutés en lien non seulement à l'épilepsie mais aussi aux difficultés cognitives, à l'autisme, à la schizophrénie et aux troubles du langage. A titre d'exemple, une étude multicentrique par tractographie a montré que les troubles bipolaires avec psychose sont associés à plus d'anomalies de la microstructure du corps calleux que les troubles bipolaires sans psychose (157). L'identification des causes génétiques des anomalies du corps calleux aura donc certainement un impact dans le champ de la psychiatrie.

Le système nerveux central est fortement auto-régulé et dans le même temps capable d'une grande plasticité. C'est un système fortement résilient, capable de fournir des fonctions cognitives de qualité dans des circonstances extrêmes. En parallèle d'une réflexion directe sur les étiologies hétérogènes, une observation des mécanismes partagés de construction de circuits pendant le développement et de leurs compensations possibles est à mener. La compréhension de la réponse du système nerveux central à une perturbation donnée, et la façon dont la diversité de cette réponse est régulée par le fond génétique d'un individu devrait apporter autant d'éléments de réponse que la recherche directe de la cause de la MCC. L'étude de larges cohortes documentées avec précision sur le plan clinique, radiologique et génétique sera fondamentale pour relever ce défi. Cette démarche est en cours avec d'une part la réalisation d'études tractographiques en période pré et postnatale et d'autre part par la confrontation des résultats sur les fœtus à une cohorte post-natale d'enfants avec MCC suivis à la Pitié Salpêtrière, dont le phénotype neuro-développemental est précisément documenté.

Ainsi, le démantèlement des causes grâce aux progrès de la génétique, mais aussi l'étude de la connectivité sous-jacente par l'imagerie fonctionnelle, et une approche multi-disciplinaire avec évaluation des différentes prises en charge de ces enfants, permettront d'ouvrir de nouvelles pistes pour de nouvelles thérapeutiques.

A l'image de la neuroplasticité cérébrale, l'immuable pré-déterminé par le génétique est plastique et il est très délicat de « faire la part de ce qui est proprement biologique et de ce qui

relève, au sens large, de l'environnement (...) : tous les autres facteurs qui peuvent interagir avec l'expression des gènes, que ces facteurs soient biologiques (comme les infections), comportementaux, éducationnels ou culturels » JF Bach. Ainsi, insistons sur l'importance des approches multidisciplinaires permettant de moduler l'inné par l'acquis ; et sur l'importance du projet parental en vue d'une éducation adaptative pour une prise en charge globale. Cette modulation de l'acquis inscrit les MCC dans le temps. Celui-ci devenant notre allié, la prise en charge des patients peut se placer dans le cadre d'un mouvement, qui nous révèle qu'il n'y a pas de réponse universelle mais une réponse singulière par individu.

## ANNEXE 1

## LISTE DES GENES DU PANEL « CALLOSOME »

Gene	Locus	Disease	Inheritance	OMIM gene
ACTB	7p22.1	Baraitser-Winter syndrome 1	AD	102630
ACTG1*	17q25.3	Baraitser-Winter syndrome 2	AD	102560
AKT3	1q43	Megalencephaly, Polymicrogyria, Mega Corpus Callosum Syndrome (MPPH) Megalencephaly-Capillary Malformation-Polymicrogyria Syndrome (MCAP / MCM)	AD	611223
ANK2	4q25	Cardiac Arrhythmia, Ankyrin-B-Related	AD	106410
APP	21q21.2	Alzheimer disease 1, familial	AD	104760
ARHGAP31	3q13.33	Adams-Oliver syndrome 1	AD	610911
ARIDIA	1p36.11	Coffin-Siris syndrome/ Mental retardation 14 MRD14	AD	603024
ARIDIB	6q25.3	Coffin-Siris syndrome/ Mental retardation 12 MRD12	AD	614556
ASCL1	12q23	CCHS, Ondine	AD	100790
ASXL1	20q11.21	Opitz trigonocephaly / C like / Bohring Opitz	AD	612990
BMP4	14q22.2	Microphthalmia, syndromic 6 / Orofacial cleft 11	AD	112262
BRAF	7q34	Cardiofaciocutaneous syndrome	AD	164757
CD96	3q13	Opitz trigonocephaly /C syndrome	AD	606037
CDON	11q24.2	Holoprosencephaly 11	AD	608707
CHD7	8q12	CHARGE syndrome / Hypogonadotropic hypogonadism 5	AD	608892
CREBBP	16p13.3	Rubinstein-Taybi syndrome	AD	600140
CTNNA1	3p22.1	Mental retardation 19 MRD19	AD	116806
DCC	18q21.3	Mirror Movements 1	AD	120470
DYNC1H1*	14q32.31	Autosomal Dominant Mental Retardation-13 with Neuronal Migration Defects	AD	600112
EFTUD2	17q21.31	Mandibulofacial dysostosis, Guion-Almeida type 5 (MFD5)	AD	603892
EP300	22q13	Rubinstein-Taybi syndrome RSTS2	AD	602700
FGFR1	10q24.32	Hypogonadotropic hypogonadism 6	AD	600483
FGFR2	8p11.2	Jackson-Weiss syndrome / Pfeiffer syndrome / Hypogonadotropic hypogonadism 2	AD	136350
FGFR3	10q26.13	Apert syndrome, Beare-Stevenson cutis gyrata syndrome	AD	176943
FOXO1	6p25.3	Axenfeld-Rieger syndrome, type 3	AD	601090
FOXG1*	14q12	Reti syndrome, congenital variant	AD	164874
GLI2*	2q14.2	Holoprosencephaly 9	AD	165230
GLI3*	7p14.1	Greig cephalopolysyndactyly /Pallister Hall	AD	165240
HEPACAM	11q24.2	Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 2A & 2B	AD	611642
HESX1	3p21	Septo-optic dysplasia SOD	AD	601802
KAT5	10q22.2	Genitopatellar syndrome	AD	605880
KIF2A*	5q12.1	Cortical dysplasia, complex, with other brain malformations 3 CDCBM3	AD	602591
KIF5C*	2q23.1	Cortical dysplasia, complex, with other brain malformations 2 CDCBM2	AD	604593
KIF11*	10q23.33	Microcephaly with or without chorioretinopathy, lymphedema, or mental retardation	AD	148760
KRAS	12p12.1	Cardiofaciocutaneous syndrome	AD	190070
LHX4	1q25.2	Pituitary hormone deficiency, combined, 4	AD	602146
MAP2K1	15q22.31	Cardiofaciocutaneous syndrome	AD	176872
MAP2K2	19p13.3	Cardiofaciocutaneous syndrome	AD	601263
MAPK10	4q21.3	Epileptic encephalopathy, Lennox-Gastaut type	AD	602897
MEF2C	5q14.3	Mental retardation, stereotypic movements, epilepsy, and/or cerebral malformations, MRD20	AD	600662
MIR17HG	13q31.3	Feingold syndrome 2	AD	609415
MTOR	1p36.22	Megalencephaly-Capillary Malformation-Polymicrogyria Syndrome (MCAP ou MCM)	AD	601231
MYCN	2p24.3	Feingold syndrome 1	AD	164840
NDE1	16p13.11	Lissencephaly 4 (with microcephaly)	AD	609449
NFIX	19p13.2	Marshall-Smith	AD	164005
NSD1	5q35	Sotos syndrome	AD	606681
OTX2	14q22.3	Microphthalmia, syndromic 5	AD	600037
PAFAH1B1*	17p13.3	Lissencephaly type 1	AD	601545
PDYN	20p13	Spinocerebellar ataxia 23 SCA23	AD	131340
PIEZO2	18p11	Marden-Walker/ Arthrogyrosis, distal, type 3, Gordon /, Arthrogyrosis, distal, type 5	AD	613629
PIK3CA	3q26.32	Megalencephaly-Capillary Malformation-Polymicrogyria Syndrome (MCAP ou MCM)	AD	171834
PITX1	5q31.1	Clubfoot, congenital, with or without deficiency of long bones and/or mirror-image polydactyly	AD	602149
PITX2	4q25	Axenfeld-Rieger syndrome 1 /Ring dermoid of cornea/Iridogoniodysgenesis, 2/ Peters anomaly 3	AD	601542
PROK2	3p13	Hypogonadotropic hypogonadism 4	AD	607002
PROKR2	20p12.3	Hypogonadotropic hypogonadism 3	AD	607123
PTCH1	9q22.32	Holoprosencephaly 7 / Basal cell nevus	AD	601309
RAD51	15q15.1	Mirror movements 2	AD	179617
RBPJ	4p15.2	Adams-Oliver syndrome 3	AD	147183
ROBO2	3p12.3	Vesicoureteral Reflux 2	AD	602431
SATB2	2q33.1	Cleft Palate, Isolated	AD	608148
SETBP1	18q12.3	Schinzel-Giedion midface retraction syndrome	AD	611060
SF3B4	1q21.2	Acrofacial dysostosis 1, NAGER AFD1	AD	605593
SHH*	7q36.3	Holoprosencephaly 3	AD	600725
SIX3	2p21	Holoprosencephaly 2	AD	603714
SKI	1p36.33	ICD +Shprintzen-Goldberg Craniosynostosis Syndrome	AD	164780
SMARCA4	19p13.2	Coffin-Siris syndrome/ Mental retardation 16 MRD16	AD	603254
SMARCB1	22q11.23	Coffin-Siris syndrome/ Mental retardation 15 MRD15	AD	601607
SOX2	3q26.33	Microphthalmia, syndromic 3	AD	184429
SPOCK1	5q31.2	Developmental delay, microcephaly and ACC	AD	602264
SPTAN1	9q34.11	Epileptic encephalopathy, early infantile, 5	AD	182810
STXBP1*	9q34.11	Epileptic encephalopathy, early infantile, 4	AD	602926
TCF4	18q21.2	Pitt-Hopkins syndrome	AD	602272
TGIF1	18p11.31	Holoprosencephaly 4	AD	602630
TUBA1A	12q13.12	Lissencephaly 3	AD	602529
TUBA8	22q11.21	Polymicrogyria with optic nerve hypoplasia	AD	605742
TUBB2B*	6p25.2	Polymicrogyria, asymmetric	AD	612850
TUBB3	16q24.3	Cortical dysplasia CDCBM1 / Polymicrogyria, Symmetric Or Asymmetric; PMGYSA	AD	602661
TUBG1	17q21.2	Cortical dysplasia, complex, with other brain malformations 4 CDCBM4	AD	191135
TWIST1	7p21.1	Craniosynostosis, type 1, Robinow-Sorauf syndrome / Saethre-Chotzen syndrome	AD	601622
ZBTB18	1q44	Autosomal dominant mental retardation 22 MRD22/ 1q43q44 microdeletion syndrome	AD	612337
ZBTB20	3q13.31	Primrose Candidat / exome	AD	606025



ZEB2	2q22.3	Mowat-Wilson syndrome	AD	605802
ZIC2	13q32.3	Holoprosencephaly 5	AD	603073
DUSP6	12q21.33	Hypogonadotropic hypogonadism 19	AD ?	602748
ERMARD	6q27	? Periventricular nodular heterotopia 6 ?	AD ?	615532
FGF17	8p21.3	Hypogonadotropic hypogonadism 20	AD ?	603725
FLRT3	20p12.1	Hypogonadotropic hypogonadism 21	AD ?	604808
KISS1R	19p13.3	Hypogonadotropic hypogonadism 8	AD ?	604161
NSMF	9q34.3	Hypogonadotropic hypogonadism 9	AD ?	608137
SEMA3A	7q21.11	Hypogonadotropic hypogonadism 16	AD ?	603961
SPRY4	5q31.3	Hypogonadotropic hypogonadism 17	AD ?	607984
TMTC4	13q32.3	candidate translocation	AD ?	Non
TUBGCP4*	15q15.3	Microcephaly and chorioretinopathy-3 (MCCRP3)	AD ?	609610
WDR11	10q26.12	Hypogonadotropic hypogonadism 14	AD ?	606417
HS6ST1	2q21	Hypogonadotropic hypogonadism 15	AD/AR	604846
IL17RD	3p14.3	Hypogonadotropic hypogonadism 18	AD/AR	606807
PAX6	11p13	Aniridia type II (homozygotes only)	AD/AR	607108
TREX1	3p21.31	Aicardi-Goutieres syndrome 1, dominant and recessive	AD/AR	606609
AARS2	6p21	COXPD8 deficiency	AR	612035
ABAT	16p13.2	GABA-transaminase deficiency	AR	137150
ACADS	12q24.31	Acyl-Coa Dehydrogenase, Short-Chain deficiency	AR	606885
AH11*	6q23.3	Joubert JBTS3	AR	608894
ALG6	1p31.3	Congenital disorder of glycosylation, type Ic	AR	604566
ALX3	1p13.3	Frontonasal dysplasia 1	AR	606014
ALX4	11p11.2	Frontonasal dysplasia 2	AR	605420
AMPD2	1p13.3	Adenosine monophosphate deaminase-2 deficiency	AR	102771
AMT	3p21.31	Glycine encephalopathy	AR	238310
AP4B1	1p13.2	Spastic paraplegia 47, autosomal recessive SPG47	AR	607245
ASPM	1q31.3	Microcephaly, primary AR, MCPH5	AR	605481
ATPAF2	17p11.2	Mitochondrial complex V (ATP synthase) deficiency, nuclear type 1	AR	608918
ATR	3q23	Seckel syndrome 1, SCKL1	AR	601215
ATXN10*	22q13.31	Spastic paraplegia 10	AR	611150
B3GALNT2	1q42.3	Muscular dystrophy-dystroglycanopathy (congenital with brain and eye anomalies), type A, 11	AR	610194
B3GALTL	13q12.3	Peters-plus syndrome	AR	610308
B3GNT1	11q13.2	Muscular dystrophy-dystroglycanopathy (congenital with brain and eye anomalies), type A, 13	AR	605517
BCS1L	2q35	Mitochondrial complex III deficiency	AR	603647
BUB1B	15q15.1	Mosaic variegated aneuploidy syndrome	AR	602860
c12orf57	12p13.31	Temtamy syndrome	AR	615140
C12ORF65	12q24	COXPD7 deficiency	AR	613541
C2CD3*	11q13.4	OFD 14, Joubert	AR	615944
C5orf42*	5p13	Joubert JBTS17, Oro-facio-digital VI	AR	614615
CASC5	15q15.1	Microcephaly 4, primary, AR, MCPH4	AR	609173
CDK5RAP2*	9q33.2	Microcephaly, primary AR, MCPH3	AR	608201
CENPJ	13q12.12	Microcephaly, primary AR, MCPH6, SCKL4	AR	609279
CEP135*	4q12	Microcephaly, primary AR, MCPH8	AR	611423
CEP152*	15q21.1	Microcephaly, primary AR, MCPH9, SCKL5	AR	613529
CEP63*	3q22.2	Seckel syndrome 6, SCKL6	AR	614724
CHMPIA	16q24.3	Pontocerebellar hypoplasia, type 8	AR	164010
CHSY1	15q26.3	Temtamy preaxial brachydactyly syndrome	AR	608183
COX15	10q24.2	Leigh syndrome due to cytochrome c oxidase deficiency	AR	603646
CPT2	1p32.3	CPT II deficiency, lethal neonatal	AR	600650
CYP11A1	15q24.1	Adrenal insufficiency, with sex reversal, partial or complete	AR	118485
DDC	7p12.1	Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency	AR	107930
DHCR24	1p33	Desmosterolosis	AR	606418
DHCR7*	11q13.4	Smith-Lemli-Opitz syndrome	AR	602858
DIS3L2	2q37.1	Perlman syndrome	AR	614184
DLAT	11q23.1	PDE2 deficiency	AR	608770
DLG	7q31.1	Leigh syndrome, PHE3 deficiency PDH	AR	238331
DOCK6	19p13.2	Adams-Oliver syndrome 2	AR	614194
DPYD	1p21.3	Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency	AR	612779
EARS2	16p12.2	COXPD12 deficiency	AR	612799
EOMES	3p24.1	Microcephaly, ACC, polymicrogyria	AR	604615
EPG5	18q	VICI syndrome	AR	615068
ERCC1	19q13.32	Cerebrooculofacioskeletal syndrome 4	AR	19q13.32
ERCC2	19q13.32	Cerebrooculofacioskeletal syndrome 2	AR	126340
ERCC5	13q33.1	Cerebrooculofacioskeletal syndrome 3 /XPG/CS	AR	133530
ERCC6	10q11.23	Cerebrooculofacioskeletal syndrome 1	AR	609413
ERLIN2	8p11.23	Spastic paraplegia 18 SPG18	AR	611605
ETFA	15q24	Glutaric acidemia IIA	AR	608053
ETFB	19q13.41	Glutaric acidemia IIB	AR	130410
ETFDH	4q32.1	Glutaric acidemia IIC	AR	231675
ETHE1	19q13.31	Ethylmalonic encephalopathy	AR	608451
EXOSC3	9p13.2	Pontocerebellar hypoplasia, type 1B	AR	606489
FA2H	16q23.1	Spastic paraplegia 35, autosomal recessive SPG35	AR	611026
FARS2	6p25	COXPD14 deficiency	AR	611592
FH	1q42.1	Fumarase deficiency	AR	136850
FKRP	19q13.32	Muscular dystrophy-dystroglycanopathy (congenital with brain and eye anomalies), type A, 5	AR	606596
FKTN	9q31.2	Muscular dystrophy-dystroglycanopathy (congenital with brain and eye anomalies), type A, 4	AR	607440
FLVCR2	14q24.3	Fowler syndrome	AR	610865
FOXRED1	11q24.2	Mitochondrial complex I deficiency	AR	613622
FRAS1	4q21.21	Fraser syndrome	AR	607830
FREM2	13q13.3	Fraser syndrome	AR	608945
GALC	14q31.3	Krabbe disease	AR	606890
GCDH	19p13.2	Glutaricaciduria, type I	AR	608801
GCSH	16q23.2	Glycine encephalopathy	AR	238330
GFM1	3q25.32	COXPD1 deficiency	AR	606639
GHRHR	4q13.2	Hypogonadotropic hypogonadism 7	AR	138850
GLDC	9p24.1	Glycine encephalopathy	AR	238300
GLUL	1q25.3	Glutamine synthase deficiency	AR	138290
GMPBB	3p21.31	Muscular dystrophy-dystroglycanopathy (congenital with brain and eye anomalies), type A, 14	AR	615320
GNRH1	8p21.2	Hypogonadotropic hypogonadism 12	AR	152760
GPR56	16q21	Bilateral frontoparietal polymicrogyria BFPP	AR	604110
GPRM2	1p13.3	Chudley-McCullough syndrome	AR	609245
HIBCH	2q32.2	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase deficiency	AR	610690
HSD17B4	5q23.1	D-bifunctional protein deficiency	AR	601860
HYLS1*	11q24.2	Hydrolethalus syndrome	AR	610693
ICK	6p12	Endocrine-cerebroostedysplasia	AR	612325
IGF1	12q23.2	Growth retardation with deafness and mental retardation	AR	147440
INPPE*	9q34.3	Joubert JBTS1	AR	613037

ISPD	7p21.2	Muscular dystrophy-dystroglycanopathy (congenital with brain and eye anomalies), type A, 7	AR	614631
KCNT1	9q34.3	Epileptic encephalopathy, early infantile, 14	AR	608167
KIAA0196	8q24.13	Ritscher-Schinzel syndrome, cranio-cerebello-cardiac, 3C	AR	610657
KIAA1279	10q22.1	Goldberg-Shprintzen megacolon syndrome	AR	609367
KIF14*	1q32.1	Lethal ciliopathy	AR	611279
KIF7*	15q26.1	Acrocallosal syndrome, Joubert JBTS12	AR	611254
KISS1	1q32.1	Hypogonadotropic hypogonadism 13	AR	603286
KPNA7	7q22.1	Early infantile epileptic encephalopathy-1 EIEE1	AR	614107
L2HGDH	14q21.3	L-2-hydroxyglutaric aciduria	AR	609584
LAMB1	7q31.1	Lissencephaly 5	AR	150240
LAMC3	9q34.12	Cortical malformations, occipital OCCM	AR	604349
LARGE	22q12.3	Muscular dystrophy-dystroglycanopathy (congenital with brain and eye anomalies), type A, 6	AR	603590
LHX3	9q34.3	Pituitary hormone deficiency, combined, 3	AR	600577
LRP2	2q31.1	Donnai-Barrow syndrome	AR	600073
MCPH1	8p23.1	Microcephaly, primary AR, MCPH1	AR	607117
MLC1	22q13.33	Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 1	AR	605908
MLH1	3p22.2	Mismatch Repair Deficiency	AR	120436
MMACHC	1p34.1	Methylmalonic aciduria and homocystinuria, cbIC type	AR	609831
MRPS16	10q22.1	COXPD2 deficiency	AR	609204
MRPS22	3q23	COXPD5 deficiency	AR	605810
MSH2	2p21	Mismatch Repair Deficiency	AR	609309
MSH6	2p16.3	Mismatch Repair Deficiency	AR	600678
MTFMT	15q	COXPD15 deficiency	AR	611766
NBN	8q21.3	Nijmegen breakage syndrome NBS1	AR	602667
NDUFA1	Xq24	Mitochondrial complex I deficiency	AR	300078
NDUFA10	2q37.3	Mitochondrial complex I deficiency	AR	603835
NDUFA11	19p13.3	Mitochondrial complex I deficiency	AR	612638
NDUFA12	12q22	Mitochondrial complex I deficiency	AR	614530
NDUFA2	5q31.3	Mitochondrial complex I deficiency	AR	602137
NDUFA9	12p13.32	Mitochondrial complex I deficiency	AR	603834
NDUFAF1	15q15.1	Mitochondrial complex I deficiency	AR	606934
NDUFAF2	5q12.1	Mitochondrial complex I deficiency	AR	609653
NDUFAF3	3p21.31	Mitochondrial complex I deficiency	AR	612911
NDUFAF4	6q16.1	Mitochondrial complex I deficiency	AR	611776
NDUFAF5	20p12.1	Mitochondrial complex I deficiency	AR	612360
NDUFAF6	8q22.1	Mitochondrial complex I deficiency	AR	612392
NDUFB3	2q33.1	Mitochondrial complex I deficiency	AR	603839
NDUFS1	2q33.3	Mitochondrial complex I deficiency	AR	157655
NDUFS2	1q23.3	Mitochondrial complex I deficiency	AR	602985
NDUFS3	11p11.2	Mitochondrial complex I deficiency	AR	603846
NDUFS4	5q11.2	Mitochondrial complex I deficiency	AR	602694
NDUFS6	5p15.33	Mitochondrial complex I deficiency	AR	603848
NDUFS7	19p13.3	Mitochondrial complex I deficiency	AR	601825
NDUFS8	11q13.2	Mitochondrial complex I deficiency	AR	602141
NDUFV1	11q13.2	Mitochondrial complex I deficiency	AR	161015
NDUFV2	18p11.22	Mitochondrial complex I deficiency	AR	600532
NHEJ1	2q35	SCID with microcephaly, growth retardation, and sensitivity to ionizing radiation	AR	611290
NIN*	14q22.1	Seckel syndrome 7, SCKL7	AR	608684
NUBPL	14q12	Mitochondrial complex I deficiency	AR	613621
OCLN	5q13.2	Band-like calcification with simplified gyration and polymicrogyria Pseudo-TORCH	AR	602876
PC	11q13.2	Leigh, pyruvate carboxylase deficiency	AR	608786
PCCA	13q32.3	Propionicacidemia	AR	232000
PCCB	3q22.3	Propionicacidemia	AR	232050
PCNT*	21q22.3	MOPD2, Microcephaly	AR	605925
PDHB	3p14.3	PDH E1-beta deficiency	AR	179060
PDHX	11p13	PDX1 deficiency	AR	608769
PDP1	8q22.1	PDH phosphatase deficiency	AR	605993
PEX1	7q21.2	Zellweger syndrome	AR	602136
PEX10	1p36.32	Zellweger syndrome	AR	602859
PEX12	17q12	Zellweger syndrome	AR	601758
PEX13	2p16.1	Zellweger syndrome	AR	601789
PEX14	1p36.22	Zellweger syndrome	AR	601791
PEX16	11p11.2	Zellweger syndrome	AR	603360
PEX19	1q23.2	Zellweger syndrome	AR	600279
PEX2	8q21.11	Zellweger syndrome	AR	170993
PEX26	22q11.21	Zellweger syndrome	AR	608666
PEX3	6q24.2	Zellweger syndrome	AR	603164
PEX5	12p13.31	Zellweger syndrome	AR	600414
PEX6	6p21.1	Zellweger syndrome	AR	601498
PMS2	7p22.1	Mismatch Repair Deficiency	AR	600259
PNKP	19q13.33	Epileptic encephalopathy, early infantile, 10	AR	605610
PNPT1	2p16.1	COXPD13 deficiency	AR	610316
POLR3A	10q22.3	Leukodystrophy, hypomyelinating, 7	AR	614258
POLR3B	12q23.3	Leukodystrophy, hypomyelinating, 8,	AR	614366
POMGNT1	1p34.1	Muscular dystrophy-dystroglycanopathy (congenital with brain and eye anomalies), type A, 3	AR	606822
POMGNT2	3p22.1	Muscular dystrophy-dystroglycanopathy (congenital with brain and eye anomalies), type A, 8	AR	614828
POMK	8p11.21	?Muscular dystrophy-dystroglycanopathy (congenital with brain and eye anomalies), type A, 12	AR	615247
POMT1	9q34.13	Muscular dystrophy-dystroglycanopathy (congenital with brain and eye anomalies), type A, 1	AR	607423
POMT2	14q24.3	Muscular dystrophy-dystroglycanopathy (congenital with brain and eye anomalies), type A, 2	AR	607439
POU1F1	3p11.2	Pituitary hormone deficiency, combined, 1	AR	173110
PROPI	5q35.3	Pituitary hormone deficiency, combined, 2	AR	601538
PRRX1	1q24.2	Agnathia-otocephaly complex AGOTC / Holoprosencephaly	AR	167420
PSAP	10q22.1	Combined SAP deficiency	AR	176801
PYCR1	17q25.3	Cutis laxa, type IIB	AR	179035
RAB18*	10p12.1	Warburg micro syndrome 3 WARBM3	AR	602207
RAB3GAP1*	2q21.3	Warburg micro syndrome 1 WARBM1	AR	602536
RAB3GAP2*	1q41	Warburg micro syndrome 2 WARBM2	AR	609275
RARS2	6q15	Pontocerebellar hypoplasia, type 6	AR	611524
RBBP8	18q11.2	Seckel syndrome 2 SCKL2 / Microcephaly / Jawad syndrome	AR	604124
RELN	7q22.1	Lissencephaly 2 (Norman-Roberts type)	AR	600514
RMND1	6q25.1	COXPD11 deficiency	AR	614917
RNASEH2A	19p13.13	Aicardi-Goutieres syndrome 4	AR	606034
RNASEH2B	13q14.3	Aicardi-Goutieres syndrome 2	AR	610326
RNASEH2C	11q13.2	Aicardi-Goutieres syndrome 3	AR	610330
RNU4ATAC*	2q14.2	MOPD1, Taybi Linder syndrome	AR	601428
ROBO3	11q24.2	Gaze Palsy, familial horizontal, with progressive scoliosis	AR	608630
RTTN	18q22.2	Polymicrogyria with seizures PMGYS	AR	610436
SAMHD1	20q11.23	Aicardi-Goutieres syndrome 5	AR	606754

SCLT1	4q28.2	OFD IX	AR	611399
SCO2	22q13.33	Cytochrome c oxidase deficiency, Cardioencephalomyopathy, fatal infantile	AR	604272
SDHA	5p15.33	Succinate Dehydrogenase Complex, Subunit A	AR	600857
SEPSECS	4p15.2	Pontocerebellar hypoplasia type 2D	AR	613009
SLC12A6	15q14	ACC + peripheral neuropathy ACCPN /Andermann	AR	604878
SLC25A1	22q11.21	Combined D-2- and L-2-hydroxyglutaric aciduria	AR	190315
SLC25A19	17q25.1	Microcephaly, Amish type	AR	606521
SLC25A22	11p15.5	Epileptic encephalopathy, early infantile 3	AR	609302
SNAP29	22q11.21	Cerebral dysgenesis, neuropathy, ichthyosis, and palmoplantar keratoderma syndrome	AR	604202
SNIP1	1p34.3	Psychomotor retardation, epilepsy, and craniofacial dysmorphism	AR	608241
SNX10*	7p15.2	Osteopetrosis, Autosomal Recessive 8	AR	614780
SPG11	15q21.1	ACC + paraplégie spastique 11 SPG11	AR	610844
STIL	1p33	Microcephaly, primary AR, MCPH7	AR	181590
STRA6	15q24.1	Microphthalmia, syndromic 9	AR	610745
SUOX	12q13.2	Sulfite oxidase deficiency	AR	606887
SURF1	9q34.2	Mitochondrial complex IV deficiency	AR	185620
SZT2	1p34.2	Epileptic encephalopathy, early infantile, 18	AR	615463
TAC3	12q13.3	Hypogonadotropic hypogonadism 10	AR	162330
TACR3	4q24	Hypogonadotropic hypogonadism 11	AR	162332
TBC1D20	20p13	WARBM4 Micro Warburg	AR	611663
TBC1D32	6q22.31	OFD IX	AR	x
TMEM5	12q14.2	Muscular dystrophy-dystroglycanopathy (congenital with brain and eye anomalies), type A, 10	AR	605862
TRAPPC9	8q24.3	Mental retardation, AR 13	AR	611966
TSEN2	3p25.2	Pontocerebellar hypoplasia type 2B	AR	608753
TSEN34	19q13.42	Pontocerebellar hypoplasia type 2C	AR	608754
TSEN54	17q25.1	Pontocerebellar hypoplasia type 2A, 4, 5	AR	608755
TSMF	12q14.1	COXPD3 deficiency	AR	604723
TTC19	17p12	Mitochondrial complex III deficiency	AR	613814
TUBGCP6*	22q13.33	Microcephaly and chorioretinopathy with or without mental retardation	AR	610053
TUFM	16p11.2	COXPD4 deficiency	AR	602389
UOICRB	8q22.1	Mitochondrial complex III deficiency	AR	191330
UOICRQ	5q31.1	Mitochondrial complex III deficiency	AR	612080
VAX1	10q25.3	Microphthalmia, syndromic 11, microphthalmia cleft lip and palate and ACC	AR	604294
VRK1	14q32.2	Pontocerebellar hypoplasia type 1A	AR	602168
WDR62*	19q13.12	Microcephaly, primary AR, MCPH2	AR	613583
WNT3	17q21.31	Tetra-amelia, autosomal recessive	AR	165330
XPNPEP3*	22q13.2	Nephronophthise-like NPHPL1	AR	613553
ZFYVE26	14q24.1	Spastic paraplegia 15	AR	612012
BCOR	Xp11.4	Microphthalmia, syndromic 2, Lenz syndrome	DLX	300485
CASK	Xp11.4	Mental retardation and microcephaly with pontine and cerebellar hypoplasia PCH / FG syndrome 4	DLX	300172
EFNB1	Xq13.1	Craniofrontonasal syndrome	DLX	300035
PORCN	Xp11.23	Goltz-Gorlin Focal dermal hypoplasia	DLX	300651
AIFM1	Xq26.1	COXPD6 deficiency	RLX	300169
ARX	Xp22.1	LISX2 / Proud syndrome	RLX	300382
ATP7A	Xq21.1	Menkes disease	RLX	300011
DCX	Xq23	LISX1 lissencephaly, DCX	RLX	300121
GPC3	Xq26.2	Simpson-Golabi-Behmel syndrome, type 1	RLX	300037
HCF1	Xq28	Mental retardation, X-linked 3 (methylmalonic acidemia and homocysteinemia, cblX type )	RLX	300019
IGBP1	Xq13.1	ACC + MR, coloboma and micrognathia	RLX	300139
KAL1	Xp22.31	Hypogonadotropic hypogonadism 1	RLX	300836
LICAM	Xq28	HSAS, MASA, ACC	RLX	308840
MBTPS2	Xp22	IFAP / BRESHECK syndrome	RLX	300294
MED12	Xq13.1	FG OPITZ-KAVEGGIA (Et Lujan-Fryns )	RLX	300188
MID1	Xp22	Opitz syndrome (fente pharyngée, dysmorphie cranio-faciale, genital, anal, déficience intellectuelle)	RLX	300552
NAA10	Xq28	Microphthalmia, syndromic 1, Lenz syndrome	RLX	
PIGA	Xp22.2	Multiple congenital anomalies-hypotonia-seizures syndrome 2 MCAHS2	RLX	311770
RPS6KA3	Xp22.12	Coffin-Lowry syndrome / MRX19	RLX	300075
SOX3	Xq27.1	Panhypopituitarism, X-linked	RLX	313430
UPF3B	Xq24	FG syndrome / Lujan Fryns / MRXS14	RLX	300298
ZDHH9	Xq26.1	FG syndrome / MRX Raymond type	RLX	300646
ZIC3	Xq26.3	VACTERL-H, X-linked	RLX	306955
ATRX	Xq21.1	ATR-X syndrome (gene: XH2/XNP)	X-linked	300032
FLNA	Xq28	FG syndrome 2 / Heterotopia, periventricular	X-linked	300017
HCCS	Xp22.2	Microphthalmia, syndromic 7/ MLS/ MIDAS	X-linked	300056
OFD1*	Xp22.2	Joubert JBTS10, Oro-facio-digital 1	X-linked	300170
PDHA1	Xp22.12	PDH E1-alpha deficiency	X-linked	300502
TBX22	Xq21.1	CHARGE Like	X-linked	
ABCC10	6p21.1	Candidate Exome		612509
AHNAK2	14q22.33	Candidate Exome		608570
ANGPTL7	1p36.22	Candidate Exome		x
APBB1	11p15	Mouse model		602709
APBB2	4p14	Mouse model		602710
ARHGAP10	4q31.23	Candidate Exome		x
ARHGAP35	19q13.3	Mouse model		605277
ARHGAP36	Xq26.1	Candidate Exome		x
BCL11B	14q32.2	Mouse model		606558
BGLAP	1q22	Mouse model		112260
CDC42*	1p36.12	Mouse model		116952
CDK5	7q36.1	Mouse model		123831
CDK3R1	17q12	Mouse model		603460
CHL1	3p26.3	Mouse model		607416
CREB1	2q33.3	Mouse model		123810
DAB1	1p32.2	Mouse model		603448
DCLK1	13q13.3	Mouse model		604742
DISC1	1q42.2	Mouse model		605210
DRAXIN	1p36.22	Mouse model		612682
DSCAM	21q22.2	Mouse model		602523
EFNB2	13q33.3	Mouse model		600527
EFNB3	17p13.1	Mouse model		602297
EMX1	2p13.2	Mouse model		600034
EMX2	10q26.1	Mouse model		600035
ENAH	1q42.13	Mouse model		609061
EPHA4	2q36.1	Mouse model		602188
EPHA5	4q13.2	Mouse model		600004
EPHB1	3q22.2	Mouse model		600600
EPHB2	1p36.12	Mouse model		600997
EPHB3	3q27.1	Mouse model		601839
ERBB2	17q12	Candidate Exome		164870

<b>FZD3</b>	8p21	Mouse model		606143
<b>GAP43</b>	3q13.31	Mouse model		162060
<b>GAS1</b>	9q21.33	Mouse model		139185
<b>IGFBP1</b>	7p13-p12	Mouse model		146730
<b>KIAA0586</b>	14q23.1	Mouse and chicken models		610178
<b>KIF27*</b>	9q21.32	Candidate function		
<b>KIF3A*</b>	5q31.1	Mouse model		604683
<b>KLF4</b>	9q31.2	Mouse model		602253
<b>LAMC1</b>	1q31.1	Mouse model		150290
<b>MAP1B*</b>	5q13	Mouse model		157129
<b>MAP3K4</b>	6q26	Mouse model		602425
<b>MAPK1</b>	22q11.2	Mouse model		176948
<b>MAPK3</b>	16p11.2	Mouse model		601795
<b>MAPK8IP3</b>	16p13.3	Mouse model		605431
<b>MARCKS</b>	6q22.2	Mouse model		177061
<b>MARCKSL1</b>	1p35.1	Mouse model		602940
<b>MSLN</b>	16p13.3	Candidate Exome		601051
<b>NAPA</b>	19q13	Mouse model		603215
<b>NEXN</b>	1p31.1	Candidate Exome		613121
<b>NFATC1</b>	18q23	Candidate Exome		600489
<b>NFIA</b>	1p31	Mouse model		600727
<b>NFIB</b>	9p32	Mouse model		600728
<b>NLGN1</b>	3q26.31	Candidate CGH array		
<b>NR2E1</b>	6q21	Mouse model		603849
<b>NR2F1</b>	5q15	Mouse model		132890
<b>NRP1</b>	10p11.22	Mouse model		602069
<b>NTN1</b>	17p13	Mouse model		601614
<b>PDE4DIP</b>	1q21.1	Candidate Exome		608117
<b>PLEKHBI*</b>	11q13	Mouse model		697651
<b>PTK2</b>	8q24.3	Mouse model		600758
<b>PTPRS</b>	19p13.3	Mouse model		601576
<b>RAC1*</b>	7p22	Mouse model		602048
<b>RAPGEF2*</b>	4q32.1	Mouse model		609530
<b>RFX3*</b>	9p24.2	Mouse model		601337
<b>ROBO1</b>	3p12.3	Mouse model		602430
<b>RYK</b>	3q22.2	Mouse model		600524
<b>SEMA3C</b>	7q21.11	Mouse model		602645
<b>SF3B1</b>	2q33.1	Candidate Exome		605590
<b>SLIT1</b>	10q24.1	Mouse model		603742
<b>SLIT2</b>	4p15.31	Mouse model		603746
<b>SLIT3</b>	5q34-q35	Mouse model		603745
<b>ST8SIA2</b>	15q26	Mouse model		602546
<b>TBR1</b>	2q24.2	Mouse model		604616
<b>TRIO</b>	5p15.2	Mouse model		601893
<b>TWSG1</b>	18p11.22	HPE contributor		605049
<b>UST</b>	6q25.1	Mouse model		610752
<b>VASP</b>	19q13.32	Mouse model		601703
<b>ZNF345</b>	19q13	Candidate Exome		x

Légende : \* signifie que le gène est également compris dans le panel « ciliome »



## ANNEXE 2

Alby et al., BDRA 2015-10-14

Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology

**Clinical, Genetic and Neuropathological Findings in a Series  
of 138 fetuses with a corpus callosum malformation**

Journal:	<i>Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology</i>
Manuscript ID:	Draft
Wiley - Manuscript type:	Obituary
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	ALBY, CAROLINE; Hôpital Necker-Enfants Malades, INSERM U1163, Institut Imagine malan, valerie; Hôpital Necker-Enfants Malades, INSERM U1163, Institut Imagine; Hôpital Necker-Enfants Malades, Histologie-Embryologie-Cytogénétique Boutaud, Lucile; Hôpital Necker-Enfants Malades, Histologie-Embryologie-Cytogénétique; Hôpital Necker-Enfants Malades, INSERM U1163, Institut Imagine Marangoni, Maria Angela; Hôpital Necker-Enfants Malades, gynécologie obstétrique Bessieres, Bettina; Hôpital Necker-Enfants Malades, Histologie-Embryologie-Cytogénétique; Hôpital Necker-Enfants Malades, INSERM U1163, Institut Imagine Bonniere, Maryse; Hôpital Necker-Enfants Malades, Histologie-Embryologie-Cytogénétique Ichkou, Amale; Hôpital Necker-Enfants Malades, Histologie-Embryologie-Cytogénétique El Khartoufi, Nadia; Hôpital Necker-Enfants Malades, Histologie-Embryologie-Cytogénétique Bahi-Buisson, Nadia; Hôpital Necker-Enfants Malades, neuropediatrics; Hôpital Necker-Enfants Malades, INSERM U1163, Institut Imagine Sonigo, Pascale; Hôpital Necker-Enfants Malades, Pediatric radiology Millischer, Anne-Elodie; Hôpital Necker-Enfants Malades, Pediatric radiology Thomas, Sophie; Hôpital Necker-Enfants Malades, INSERM U1163, Institut Imagine VILLE, Yves; Hôpital Necker-Enfants Malades, gynécologie obstétrique VEKEMANS, Michel; Hôpital Necker-Enfants Malades, Histologie-Embryologie-Cytogénétique; Hôpital Necker-Enfants Malades, INSERM U1163, Institut Imagine Razavi, Ferechte; Hôpital Necker-Enfants Malades, INSERM U1163, Institut Imagine; Hôpital Necker-Enfants Malades, Histologie-Embryologie-Cytogénétique ATTIE-BITACH, Tania; Hôpital Necker-Enfants Malades, INSERM U1163, Institut Imagine; Hôpital Necker-Enfants Malades, Histologie-Embryologie-Cytogénétique
Key Words:	Corpus callosum malformation, Fetus, Comparative genomics hybridization (CGH), Neuropathology, Midline brain anomalies

John Wiley &amp; Sons, Inc.



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

SCHOLARONE™  
Manuscripts

For Peer Review

1  
2  
3 Clinical, Genetic and Neuropathological Findings in a Series of 138 fetuses with a  
4 corpus callosum malformation  
5  
6

7  
8 Authors:

9 Caroline Alby<sup>1,2</sup>, Valérie Malan<sup>1,3,4</sup>, Lucile Boutaud, Marie Angela Marangoni<sup>2</sup>,  
10 Bettina Bessières<sup>4</sup>, Maryse Bonniere<sup>4</sup>, Amale Ichkou, Nadia Elkhartoufi, Nadia  
11 Bahi-Buisson<sup>1,4,5</sup>, Pascale Sonigo<sup>6</sup>, Anne-Elodie Millischer<sup>6</sup>, Sophie Thomas<sup>1,4</sup>,  
12 Yves Ville<sup>2,4</sup>, Michel Vekemans<sup>1,3,4</sup>, Féréchté Encha-Razavi<sup>1,3,4</sup>; Tania Attié-  
13 Bitach<sup>1,3,4</sup>  
14  
15

16 <sup>1</sup>INSERM U1163, Institut Imagine, Hôpital Necker-Enfants Malades

17 <sup>2</sup>Service de Gynécologie-Obstétrique, Hôpital Necker-Enfants Malades, APHP,  
18 Paris, France.

19 <sup>3</sup>Service d'Histologie-Embryologie-Cytogénétique, Hôpital Necker-Enfants  
20 Malades, APHP, Paris, France

21 <sup>4</sup> Université Paris Descartes, Paris Sorbonne Cité

22 <sup>5</sup>Service de Neuropédiatrie, Hôpital Necker-Enfants Malades, APHP, Paris, France

23 <sup>6</sup>Service de Radiologie Pédiatrique, Hôpital Necker-Enfants Malades, APHP, Paris,  
24 France  
25  
26  
27  
28  
29

30 **Grant information**

31 This work was supported by grants

32 ANR 2013CILAXAL N° ANR-13-BSV1-0027.

33 Agence de la Biomedecine AOR 2010

34 Caroline Alby is funded by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM)  
35  
36

37 **Running Title:** Fetal study of corpus callosum malformations  
38

39 **Key words:** Fetus, Corpus callosum malformation, neuropathology, comparative  
40 genomics hybridization (CGH)  
41  
42

43 **Corresponding author :**

44 Tania ATTIE-BITACH

45 Département de Génétique et INSERM U1163

46 Hôpital Necker-Enfants Malades

47 149 rue de Sèvres

48 75743 Paris Cedex 15

49 Tel + 33144495144

50 Mail : tania.attie@inserm.fr  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**ABSTRACT :****Background:**

Corpus callosum malformation (CCM) is the most frequent brain malformation observed at birth. Because CCM is a highly heterogeneous condition, the prognosis of fetuses diagnosed prenatally remains uncertain, making prenatal counseling difficult.

**Method and results**

We evaluated retrospectively a total of 138 fetuses, 117 with CCM observed on prenatal imaging examination, and 21 after post mortem autopsy. On ultrasound and/or Magnetic Resonance Imaging (MRI), CCM was either isolated (N=40) or associated with other neurological (N=57) or extra cerebral findings (N=21/20 respectively). Most fetuses (N=134) remained without a diagnosis at the time of pregnancy termination. This emphasizes the need to establish a neuropathological classification and to perform a genomic screening using Comparative Genomic Hybridization (CGH).

A neuropathological examination performed on 138 cases revealed a spectrum of CCMs, classified as follows: Agenesis of Corpus Callosum (ACC, 55), CC Hypoplasia (CCH, 30), CC Dymorphism (CCD, 24) and CCM associated with a Malformation of Cortical Development (MCD, 29). Interestingly, after fetopathological examination, only 16/40 malformations were classified as isolated, highlighting the importance of the autopsy following termination of pregnancy.

Among the 138 cases, the underlying etiology was found in 44 cases: diabetes (one case), CMV infection (one case), 21 chromosome abnormalities, and 21 mendelian conditions.

**Conclusion:**

In our series of 138 cases of CCM, prenatal and post mortem examinations identified a variety of genetic causes. However no diagnosis could be established in 68% of cases. The classification based on the underlying neurodevelopmental defects paves the way for further genetic studies and genotype-phenotype correlations.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## INTRODUCTION

The corpus callosum (CC) in humans is the largest commissure connecting the two homologous cortical hemispheres. It is made up of 200 million axons, each forming homotopic and heterotopic connections, often between distant regions of the cerebral cortex (Wahl et al., 2007). The CC develops early during embryonic development (as soon as 6 weeks of gestation) and requiring a tight interaction between neurons and glia (Moldrich et al., 2010). Pioneer axons from the cingular cortex find their way through the midline and become the tract that is necessary for later axons to find their way to the opposite hemisphere (Rash and Richards, 2001).

From the anterior to the posterior end the CC consists of four major anatomic parts: the rostrum, the genu, the corpus and the splenium, with a high diversity of connections within each segment (Wahl et al., 2009). All four parts are present by the 17<sup>th</sup> week of gestation, although development of the CC continues until after birth (Jeret et al., 1987). Routine ultrasound examination remains the main tool to diagnose CC malformations (CCMs) antenatally. In particular a widening of the interhemispheric fissure, associated with a widening of the cavum of the septum pellucidum and colpocephaly are usually observed (Santo et al., 2012). Magnetic Resonance Imaging (MRI) remains the preferred imaging technique for direct visualization of the CC and identification of neurodevelopmental disorders (Tang et al., 2009). CCMs have an estimated prevalence of 1/4000 live births (Wang et al., 2004).

CCMs are very heterogenous, as follows: 1/ complete agenesis when the CC is totally missing; 2/ dysgenesis when there is a partial agenesis, also called hypogenesis; namely the later-formed segments are missing but earlier-formed segments are present, (Hetts et al., 2006); 3/ hypoplasia when the CC is fully formed but is thinner than expected when taking in account the age and the sex of the individual; 4/ dysplasia when the CC has a hump shape (Erdogmus et al., 2005). The most recent classification based upon midline sagittal brain MRI identifies three major CCM classes: hypoplasia when CC is uniformly thin or with an underdeveloped posterior region, hypoplasia with dysplasia when the malformed shape is not limited to the posterior region (stripe and kinked CC) and complete agenesis (Hanna et al., 2011).

A CCM can occur as an isolated finding, but is more commonly associated with a brain maldevelopment (Schell-Apacik et al., 2008; Tang et al., 2009). Accordingly, the prognosis varies considerably from a mild (Moutard et al., 2003; Sotiriadis and Makrydimas, 2012) to a severe neurological deficit (Siffredi et al., 2013), depending presumably on the underlying cause rather than the CCM itself. The main symptoms are speech delay, feeding problems, epilepsy, social behavior difficulties, hyperactivity attention disorders or mental retardation. CCM can be caused by exogenous factors (alcohol, CMV), chromosome abnormalities, or be part of a Mendelian condition. Genetic causes are highly heterogeneous and the increased use of Comparative Genomic Hybridization (CGH) has identified several genomic loci involved in CC development (O'Driscoll et al., 2010). For

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

example there are over 350 clinical entities associated with CCM in OMIM or the London Medical Databases.

In the present study, we reviewed retrospectively the data obtained on fetuses with CCM referred to our department between 2000 and 2015 in order to evaluate 1) the impact of autopsy to identify associated findings, 2) to delineate the neuropathological findings and 3) to summarize the underlying genomic etiology using CGH.

## MATERIAL AND METHODS

### *1/ Characteristics of the cohort:*

Between 2000 and 2015, 179 fetuses with CCM were documented either on prenatal ultrasound examination or after post-mortem examination. In 25 cases, the pregnancy continued. Among interrupted pregnancies no neuropathological examination was performed in 9 fetuses either because the parents refused autopsy (5), or because a selective termination of a twin pregnancy was performed (4). Seven fetuses were excluded from the study because CCM was considered as a "pseudoagenesis", i.e. absence of CC due to another primary condition such as holoprosencephaly (Figure S1).

The male to female ratio of the fetal series was 74/64, consistent with previous findings (Jeret et al., 1987; Goodyear et al., 2001). Under the French law, termination of pregnancy is allowed without any term limit. For this reason, in this series, most of the terminations of pregnancy (N=84) were performed after 24 weeks of gestation. At the time of termination of pregnancy, 134 fetuses remained without a diagnosis (Figure S1).

### *2/ Autopsy :*

The autopsies were performed after parental consent and in accordance with the French Health Authority recommendations. For each fetus, pictures, radiological examination, biometrical measurements and external and internal examination were carried out. Histological examination of each organ was performed on samples and a neuropathological examination was conducted after 6 weeks of fixation.

### *3/Imaging :*

All fetuses had a prenatal ultrasound examination and 50 fetuses underwent an MRI, performed on a 1.5-Tesla unit (Signa; GE, Milwaukee, Wisconsin), using a phased-array abdominal coil. The MRI protocol included: (i) an anatomic MRI sequence of the whole fetus in three orthogonal planes; (ii) A FIESTA 2D sequence: TR 3.7 ms, TE 1.6 ms; matrix 512 x 512; FA: 60°, section thickness, 6

1  
2  
3 mm; (iii) an anatomical analysis of the fetal brain with a T2 weighted sequence in  
4 the three orthogonal planes; (iv) T2 Fast Spin Echo: TR 10000ms, TE 120ms;  
5 matrix 256 x 256; cm; FA: 90°, section thickness: 4 mm.  
6  
7  
8  
9

#### 10 **4/Molecular Cytogenetics**

11 In our center, since 2008, a micro-array based CGH study is performed  
12 systematically in all fetuses with a malformation, and but standard karyotyping  
13 and/or targeted *in situ* fluorescent hybridization (FISH) was performed prior to  
14 2008. A CGH was performed retrospectively on fetuses whose termination was  
15 performed previous to 2008.

16 Array CGH on DNA extracted from uncultured amniocytes or fetal tissues was  
17 performed on an Agilent 60K oligonucleotide microarray customized for our  
18 laboratory (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Fluorescence *in situ*  
19 hybridization (FISH) analysis using BAC clones on uncultured amniocytes or  
20 fetal tissues was used to confirm the rearrangements. Parental testing was  
21 performed when a DNA sample was not available. Genomic positions are relative  
22 to human genome GRCh37/hg19.  
23  
24  
25  
26  
27

## 28 **RESULTS AND DISCUSSION**

### 29 **1/ Imaging findings**

30 After prenatal imaging, 138 fetuses were classified into four groups (Figure 1):  
31 isolated CCM (N=40), CCM associated with other neurological defects (N=57),  
32 associated with extra-neurological defects (N=21) or both (N=20). On prenatal  
33 imaging, the CC was completely absent in 78 fetuses and described as partially  
34 absent in 2; hypoplasia was described in 13 fetuses and dysmorphism in 3  
35 fetuses. For the other cases, CCM was not described precisely because it was  
36 associated with a polymalformative syndrome or a major brain maldevelopment  
37 (Figure S2).  
38  
39  
40  
41  
42

### 43 **2/ Neuropathological findings**

44 Neuropathological findings of 138 fetuses were reviewed, and classified into four  
45 major groups (Figures 2,3A):

46 -Group I: total (N=53) and partial (N=2) agenesis of the CC (ACC) associated with  
47 Probst Bundles where axons form but do not cross the midline. Among them, 7  
48 chromosome abnormalities, and 4 mendelian conditions were identified.

49 -Group II: abnormal size of the CC (N=30). In this group (also known as CC  
50 hypoplasia; CCH) the CC is thinner or shorter than usual but all segments are  
51 present. Among them, 8 chromosome abnormalities 3 mendelian conditions and  
52 1 teratogenic etiology (diabetes) were identified.

53 -Group III: dysmorphic CC (DCC)(N=24) It included either a hump-shaped CC or  
54 a CCM with an interhemispheric cyst. Among them, 3 chromosome  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

abnormalities, 2 monogenic diseases and one teratogenic cause (CMV) were found.

-Group IV: associated with a cortical maldevelopment (N=29). It concerns a CC where the cortex or the white matter is altered. In particular the axons of the CC are not formed. Among them, 4 chromosome abnormalities and 11 monogenic conditions were found.

As described previously (Goodyear et al., 2001) in our cohort of fetuses a complete ACC (ACCc, N=64), was found much more frequent than partial ACC (ACCp N=20). However, most of the fetuses with ACCp had an etiological diagnosis (13/20; 65%), namely 8 mendelian conditions and 3 chromosome abnormalities. In contrast, only 20 % of the fetuses with ACCc had a diagnosis (13/64) namely 7 mendelian conditions and 6 chromosome abnormalities (Figure 3B).

### ***3/ Associated findings***

Based on prenatal imaging only isolated CCMs were less frequently observed than expected. Indeed, following autopsy, only 16/40 cases of CCM were considered as isolated (Figure 1). In particular 14 had total ACC by absence of decussation, and 2 had CCH (data not shown). Etiology is seldom established among these isolated cases. For example only one ACCc case was diagnosed with a partial trisomy 8q (Figure 3C). Thirty nine cases were associated with other CNS signs, mainly an abnormal sulcation or heterotopia (N=32), microcephaly (N=22) and a hindbrain malformation (N=28). Ten diagnoses were made in this group (18%), namely 3 chromosome abnormalities and 7 mendelian conditions observed on neuropathological examination and confirmed by targeted Sanger sequencing (Figure 3C; Table 2).

The larger group in terms of number of cases and number of diagnoses concerns fetuses with both CNS and extra CNS findings (N=83). In this group, 40% of diagnoses could be established, with one CMV infection, 18 chromosome abnormalities, 14 mendelian conditions, and one case of maternal diabetes (Figure 3C). Extra-CNS findings were mainly limb (N=25) and craniofacial (N=37) birth defects.

CCM of group I were isolated in 26% of cases (14/53). Both CCH and DCC were mostly associated with other CNS anomalies (27/30 and 20/24 respectively) or extra-CNS findings (21/30 and 20/24 respectively). In these two groups only two CCH cases remained apparently isolated after autopsy (Figure 4A). ACCc was isolated in 22% of the cases (14/64) whereas none of the ACCp cases were isolated (Figure 4B).

### ***4/ Chromosome abnormalities***

In this series, 21 chromosome abnormalities were detected using standard karyotyping or CGH (Table 1). Many loci were already described in CCM (Schell-Apacik et al., 2008). The most interesting findings are the followings.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Two cases of 17q21.31 deletion were identified by CGH in our series. Deletions of this region or *KANSL1* mutations lead to Koolen-de Vries syndrome (KDVS, MIM 610443), characterized by intellectual disability, hypotonia, friendly demeanor, recognizable dysmorphic features, and less frequently cardiac or genitourinary anomalies and seizures. One of our fetal cases was reported (Egloff et al., 2014) It is noteworthy that a CCM is observed in 20% of deleted patients, while KDVS patients with *KANSL1* mutations do not present a CCM (Zollino et al., 2012)(Koolen et al., 2012). This suggests that another gene within the deletion might be responsible for this endophenotype.

Another interesting finding is the 11p13 deletion found in fetus EFP1200363. In this family, the father presented aniridia but no *PAX6* mutation was identified. Another pregnancy of this couple was terminated for a vermian hypoplasia. CGH performed on the fetus identified a 384 kb 11p13 deletion inherited from the father and present in the first sib. The deletion encompasses the *ELP4* locus, which harbors a *PAX6*-specific long-range control element (Kleinjan et al., 2006). Deletions of this element were previously reported to cause aniridia by a position effect (Bayrakli et al., 2009) as observed here in the father. In addition to the eye, *PAX6* is important for brain development. Heterozygous mutations have been described in individuals with eye defects and midline brain commissural defects (Abouzeid et al., 2009), absence of the pineal gland or unilateral polymicrogyria (Mitchell et al., 2003). Compound heterozygosity for *PAX6* mutations are also responsible for a more severe phenotype involving brain malformations (Glaser et al., 1994) (Schmidt-Sidor et al., 2009). *PAX6* sequencing in our case failed to find another molecular alteration. To our knowledge this is the first case of CCM with a deletion encompassing the *ELP4* locus, and harbouring a regulatory element of *PAX6*.

Fetus EFP1200269 had a monosomy 21 associated with a ring chromosome 21, classically associated with CCM. Interestingly, fetus EFP1400339 had a 7Mb gain at 21q21.1q21.3 containing 8 genes outside the Down syndrome Critical Region (DCR). Trisomy 21 is not associated with CCM, but some cases have been reported previously (Jacob et al., 2013).

Two fetuses had a 1q43.q44 CNV. Deletions of 1q42-q44 (612337) have been reported in a variety of developmental defects involving the brain, including microcephaly and ACC. This has been ascribed to a loss of the *AKT3* gene required for developmental regulation of brain size and callosal development in the mouse (Boland et al., 2007). Fetus EFP0800250 with ACCp, microcephaly and polymicrogyria had a 1q43.q44 deletion encompassing *AKT3*. Unfortunately for fetus IPP095098 with ACCc and cerebellar hypoplasia no DNA was available to further characterize the breakpoints. Fetus EFP1000281 with Wolf Hirschhorn syndrome (WHS)(#194190) had a 4p deletion and an 8p trisomy derived from a (4p;8p) mediated by olfactory-receptor gene cluster rearrangements leading to non allelic homologous recombination (Giglio et al., 2001). Interestingly CCM is the most common finding upon neuroimaging in children with WHS (Verbrugge et al., 2009).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Fetus EFP1200113, presenting with ACCp associated with pachygyria, had a *de novo* 14q12 deletion with a centromeric breakpoint localized 400 to 800 kb downstream of the *FOXP1* gene, a region containing *FOXP1* cis regulatory elements. A position effect due to deletions of this region, and causing altered expression of *FOXP1*, has been described previously in a patient with a partial ACC (Kortüm et al., 2011).

Fetus EFP0800110 with CCH, cerebellar hypoplasia and hydrocephaly due to an aqueductal stenosis had a 6q27 deletion associated with a ring chromosome 6. The phenotype of patients with a ring chromosome 6 is highly variable ranging from normal to severe mental retardation. All of these features have been described previously in fetuses with a ring chromosome 6 and hydrocephalus in particular. CCM observed in individuals with a ring chromosome 6 are either hypoplasia or partial or total agenesis (Urban et al., 2002). Interestingly, deletions of genes responsible for structural brain abnormalities have been identified in terminal deletions of chromosome 6q27. In particular the Smallest Region of Overlap (SRO) may include the critical interval mediating CC abnormalities (Peddibhotla et al., 2015; O'Driscoll et al., 2010). Finally, 2 fetuses had a partial 8p trisomy, which is known to be associated with CCM. Indeed, partial duplications of chromosome 8p are the most frequent duplications observed in patients with CCM (Schell-Apacik et al., 2008).

All together, these results further emphasize the added value of CGH versus karyotyping in prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities (Saldarriaga et al., 2015).

#### 5/ Other causes

Twenty three non-chromosomal diagnoses were made either during pregnancy or after autopsy. Two teratogenic causes were identified: one CMV infection and one maternal diabetes. Two metabolic diseases were diagnosed based on past medical history, imaging findings and biochemical testing during pregnancy. A Zellweger syndrome case was characterized by the combination of centrosylvian pachygyria-polymicrogyria and a large cavum as described previously (Mochel et al., 2006). The diagnosis was confirmed biochemically. Indeed elevated long chain fatty acids were found in the amniotic fluid. Also fetal autopsy showed renal microcysts as expected. In one case PDH deficiency was suspected and confirmed on cultured amniocytes. Finally a clinical diagnosis of Opitz syndrome was made in one fetus because the mother presented with a marked hypertelorism.

Fetopathological examination suggested 18 diagnoses of mendelian conditions, based on either the associated findings or neuropathological examination. Namely five cases of tubulinopathies, one case of lissencephaly type 1, four cases of lissencephaly type 2, one case of porencephaly type 2, two cases of Bicker Adams syndrome, two cases of Smith Lemli Opitz syndrome, one case of Oro-Facio-Digital syndrome, one case of CHARGE syndrome, and one case of



1  
2  
3 abnormal gyration with microcephaly. Clinical data of each fetus are given in  
4 Table S1 and genetic details are summarized in Table 2.  
5  
6  
7

## 8 9 **CONCLUSION**

10  
11 Although the use of MRI makes it possible to assess associated neurological signs  
12 antenatally the characterization of the type of CCM remains a challenge. A  
13 neuropathological examination of this large cohort of fetuses allowed us to  
14 classify them into four distinct groups based on the morphology of the CC and  
15 the presence or absence of Probst bundles. The underlying causes are very  
16 heterogeneous. Chromosome abnormalities were found in 15% of cases. In our  
17 series, as expected, chromosome abnormalities were found mostly in CCM  
18 associated with other findings, and in the group of CCH. Also the added value of  
19 CGH in determining the cause of CCM is obvious as 7/21 cases (33%) have been  
20 detected only by CGH.  
21

22 In fetuses with CCM and cortical maldevelopment, the neuropathological  
23 examination usually drives the diagnosis, including the type of lissencephaly  
24 (type I vs II) or tubulinopathy, making up 50% of the diagnosis in this category.  
25 There are two groups where few diagnoses were established following  
26 neuropathology and CGH namely the group associated with decussation  
27 anomalies, and the group of apparently isolated CCMs associated with Probst  
28 bundles and described previously in an MRI series of living individuals (Hetts et  
29 al., 2006). Interestingly, a minority of the CCMs classified as isolated by prenatal  
30 imaging remained as such after autopsy (16/40). Thus, after autopsy additional  
31 defects were reported in 60% (24/40). This frequency is probably  
32 underestimated because some clinical findings are not observed at the time of  
33 autopsy either because they are not morphologically visible or because they  
34 appear later in life (eg, intellectual disability, epilepsy, deafness, metabolic  
35 defects, ataxia, spasticity). A follow up study showed that additional defects were  
36 diagnosed postnatally in 15% of neonates having a prenatally ascertained  
37 isolated CCM (Mangione et al., 2011). In these cases, the uncertain prognosis is a  
38 real clinical concern. In our center, from 2010 to 2015, 20 fetuses had an isolated  
39 CCM on prenatal imaging. Among them, in 15 cases a termination of pregnancy  
40 was performed and five were born; 3 of them were asymptomatic and 2 were  
41 lost to follow up. Identifying the genetic cause of isolated CCMs and their  
42 prognosis would be a real asset as it will allow to provide a more accurate  
43 prenatal counseling.  
44  
45  
46  
47

48 Incidence of associated findings is around 88% and 60% of them are extra-CNS  
49 malformations. Cortical, rhombencephalic, craniofacial and limb defects are the  
50 most frequent findings (Hetts et al., 2006; Gupta and Lilford, 1995; Goodyear et  
51 al., 2001 ). In terms of prenatal counseling, the neurodevelopmental outcome of  
52 CCM associated with other defects is generally described as poor. However, the  
53 importance of establishing a diagnosis is crucial for the management of future  
54 pregnancies and genetic counseling. From this point of view, the main challenge  
55 in future studies will be to establish a diagnosis in these cases (68% in our  
56 series).  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## SUMMARY

CCM is a very heterogeneous condition. The histological classification of our series of fetuses provides a framework to understand the etiopathogeny of CCM, which may involve abnormal midline patterning, abnormal axon guidance, abnormal neuronal and glial proliferation, abnormal callosal migration and specification (Edwards et al., 2014) or cortical maldevelopment (Barkovich et al., 2012). This present study highlights the importance of clinical examination and the need to perform a detailed fetal autopsy to support a phenotype-driven candidate gene screening approach.

Since the completion of the Human Genome Project in 2003, the rapid development of CGH and SNP arrays allows the quantitative analysis of the whole genome. It is now the gold standard for prenatal diagnosis of malformations. In parallel, next generation sequencing (NGS) allowing rapid sequencing of whole genomes, exomes or targeted panels has enabled the identification of many new genes involved in human pathology. The application of NGS in the clinical diagnosis of CCM holds much promise and will hopefully enable us to identify pathogenic variants and hence the diagnosis, genetic counseling and treatment of this condition

### Acknowledgments:

We thank the patients and their families for participation.  
This work was supported by grants from ANR 2013 CILAXAL N° ANR-13-BSV1-0027 and Agence de la Biomedecine AOR 2010 to TAB.  
Caroline Alby is funded by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM).  
Patrick Calvas and Nicolas Chassaing for *PAX6* sequencing in fetus EFP1200363).

## LEGENDS TO TABLE AND FIGURE

### Table 1: Cytogenetic findings in our series

CNVp : Copy Number Variation considered as pathogenic. VOUS: variant of unknown significance.

### Table 2: Genetic findings in our series

H: mode of inheritance of the disease

1  
2  
3 \* Mutations in tubulin genes are frequent causes of various fetal malformations  
4 of cortical development including microlissencephaly. Acta Neuropathologica  
5 Communications. 2014. Fallet Bianco et al.

6 \*\* Identification of Mutations in *TMEM5* and *ISPD* as a cause of severe  
7 Cobblestone Lissencephaly. Am J Hum Genet. 2012. Vuillaumier-Barrot et al.  
8  
9

10  
11  
12 **Figure 1: Associated findings in our series**

13 Findings associated to corpus callosum malformations (CCM) after prenatal  
14 imaging (left, N=141) or following autopsy (right, N=133), classified in 4 groups:  
15 Isolated (no associated signs), CNS (CCM with central nervous system  
16 anomalies), Extra CNS (CCM with extra-neurological signs), and CNS+extraCNS  
17 (CCM with both central nervous system and at least another congenital  
18 anomaly).  
19

20  
21  
22 **Figure 2: Examples representative of each neuropathological group**

23 Group 1: Abnormal decussation: (a) Coronal section of cerebral hemispheres  
24 showing the complete absence of corpus callosum. (b) whole mount histological  
25 preparation (H&E stain) showing lack of the interhemispheric commissure  
26 replaced by Probst Bundles (arrows)  
27

28 Group 2: small CC size (hypoplasia). (c) Midsagittal section of cerebral  
29 hemispheres showing a short but complete CC with a recognizable genu, body  
30 and splenium.

31 Group 3: Abnormally shaped CC. (d): Midsagittal section of cerebral hemispheres  
32 showing an abnormally shaped CC well developed anteriorly but reduced in size  
33 posteriorly.  
34

35 Group 4: Cortical plate malformations (e): Coronal section of cerebral  
36 hemispheres with an abnormally shaped insular region and a thickened mantle  
37 due to a cortical maldevelopment with a lissencephaly-like four-layered pattern  
38 shown in (f) on a whole mount histological preparation of a cerebral hemisphere  
39 stained with H&E.  
40

41  
42 **Figure 3: Etiology versus phenotype.**

43 Overall causes found in this series following autopsy and genetic screening,  
44 according to (A) the neuropathological classification, (B) complete or partial  
45 agenesis in groups I et IV (C) the apparently isolated CCM or the associated signs.  
46 Chromosome abnormalities were found mostly in CCM associated with other  
47 findings, and in the group of CCH, monogenic causes in CCM with malformation  
48 of cortical development, while isolated forms and complete agenesis of corpus  
49 callosum remain largely undiagnosed.  
50  
51

52  
53 **Figure 4: Associated findings among each neuropathological class**

54 Isolated corpus callosum malformation are mostly found among the group I, and  
55 only in complete agenesis.  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**LITERATURE CITED**

- Abouzeid, H, Youssef, MA, ElShakankiri, N, Hauser, P, Munier, FL, Schorderet, DF. 2009. PAX6 aniridia and interhemispheric brain anomalies. *Mol. Vis.* 15: 2074–2083.
- Barkovich, AJ, Guerrini, R, Kuzniecky, RI, Jackson, GD, Dobyns, WB. 2012. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012. *Brain* 135: 1348–1369.
- Bayrakli, F, Guney, I, Bayri, Y, Ercan-Sencicek, AG, Ceyhan, D, Cankaya, T, Mason, C, Bilguvar, K, Bayrakli, S, Mane, SM, State, MW, Gunel, M. 2009. A novel heterozygous deletion within the 3' region of the PAX6 gene causing isolated aniridia in a large family group. *J. Clin. Neurosci.* 16: 1610–1614.
- Boland, E, Clayton-Smith, J, Woo, VG, McKee, S, Manson, FDC, Medne, L, Zackai, E, Swanson, EA, Fitzpatrick, D, Millen, KJ, Sherr, EH, Dobyns, WB, Black, GCM. 2007. Mapping of Deletion and Translocation Breakpoints in 1q44 Implicates the Serine/Threonine Kinase AKT3 in Postnatal Microcephaly and Agenesis of the Corpus Callosum. *Am. J. Hum. Genet.* 81: 292–303.
- Edwards, TJ, Sherr, EH, Barkovich, AJ, Richards, LJ. 2014. Clinical, genetic and imaging findings identify new causes for corpus callosum development syndromes. *Brain* 137: 1579–1613.
- Egloff, M, Encha-Razavi, F, Garel, C, Bonnière-Darcy, M, Millischer, A-E, Lapierre, J-M, Fontaine, S, de Blois, M-C, Vekemans, M, Turleau, C, Ville, Y, Malan, V. 2014. 17q21.31 microdeletion: brain anomalies leading to prenatal diagnosis. *Cytogenet. Genome Res.* 144: 178–182.
- Erdogmus, B, Yazici, B, Ozdere, BA. 2005. Hump-shaped corpus callosum. *Acta Radiol. Stockh. Swed.* 1987 46: 616–617.
- Giglio, S, Broman, KW, Matsumoto, N, Calvari, V, Gimelli, G, Neumann, T, Ohashi, H, Voullaire, L, Larizza, D, Giorda, R, Weber, JL, Ledbetter, DH, Zuffardi, O. 2001. Olfactory Receptor–Gene Clusters, Genomic-Inversion Polymorphisms, and Common Chromosome Rearrangements. *Am. J. Hum. Genet.* 68: 874–883.
- Glaser, T, Jepeal, L, Edwards, JG, Young, SR, Favor, J, Maas, RL. 1994. PAX6 gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects. *Nat. Genet.* 7: 463–471.
- Goodyear, PW, Bannister, CM, Russell, S, Rimmer, S. 2001. Outcome in prenatally diagnosed fetal agenesis of the corpus callosum. *Fetal Diagn. Ther.* 16: 139–145.
- Gupta, JK, Lilford, RJ. 1995. Assessment and management of fetal agenesis of the corpus callosum. *Prenat. Diagn.* 15: 301–312.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- Hanna, RM, Marsh, SE, Swistun, D, Al-Gazali, L, Zaki, MS, Abdel-Salam, GM, Al-Tawari, A, Bastaki, L, Kayserili, H, Rajab, A, Boglárka, B, Dietrich, RB, Dobyns, WB, Truwit, CL, Sattar, S, Chuang, NA, Sherr, EH, Gleeson, JG. 2011. Distinguishing 3 classes of corpus callosal abnormalities in consanguineous families. *Neurology* 76: 373-382.
- Hetts, SW, Sherr, EH, Chao, S, Gobuty, S, Barkovich, AJ. 2006. Anomalies of the Corpus Callosum: An MR Analysis of the Phenotypic Spectrum of Associated Malformations. *Am. J. Roentgenol.* 187: 1343-1348.
- Jacob, FD, Dobson, LJ, Estroff, JA, Khwaja, OS. 2013. Monozygotic twins with trisomy 21 and partial agenesis of the corpus callosum. *Pediatr. Neurol.* 48: 314-316.
- Jeret, JS, Serur, D, Wisniewski, KE, Lubin, RA. 1987. Clinicopathological findings associated with agenesis of the corpus callosum. *Brain Dev.* 9: 255-264.
- Kleinjan, DA, Seawright, A, Mella, S, Carr, CB, Tyas, DA, Simpson, TI, Mason, JO, Price, DJ, van Heyningen, V. 2006. Long-range downstream enhancers are essential for Pax6 expression. *Dev. Biol.* 299: 563-581.
- Koolen, DA, Kramer, JM, Neveling, K, Nillesen, WM, Moore-Barton, HL, Elmslie, FV, Toutain, A, Amiel, J, Malan, V, Tsai, AC-H, Cheung, SW, Gilissen, C, Verwiél, ETP, Martens, S, Feuth, T, Bongers, EMHF, de Vries, P, Scheffer, H, Vissers, LELM, de Brouwer, APM, Brunner, HG, Veltman, JA, Schenck, A, Yntema, HG, de Vries, BBA. 2012. Mutations in the chromatin modifier gene KANSL1 cause the 17q21.31 microdeletion syndrome. *Nat. Genet.* 44: 639-641.
- Kortüm, F, Das, S, Flindt, M, Morris-Rosendahl, DJ, Stefanova, I, Goldstein, A, Horn, D, Klopocki, E, Kluger, G, Martin, P, Rauch, A, Roumer, A, Saitta, S, Walsh, LE, Wiczorek, D, Uyanik, G, Kutsche, K, Dobyns, WB. 2011. The core FOXG1 syndrome phenotype consists of postnatal microcephaly, severe mental retardation, absent language, dyskinesia, and corpus callosum hypogenesis. *J. Med. Genet.* 48: 396-406.
- Mangione, R, Fries, N, Godard, P, Capron, C, Mirlesse, V, Lacombe, D, Duyme, M. 2011. Neurodevelopmental outcome following prenatal diagnosis of an isolated anomaly of the corpus callosum. *Ultrasound Obstet. Gynecol. Off. J. Int. Soc. Ultrasound Obstet. Gynecol.* 37: 290-295.
- Mitchell, TN, Free, SL, Williamson, KA, Stevens, JM, Churchill, AJ, Hanson, IM, Shorvon, SD, Moore, AT, van Heyningen, V, Sisodiya, SM. 2003. Polymicrogyria and absence of pineal gland due to PAX6 mutation. *Ann. Neurol.* 53: 658-663.
- Mochel, F, Gréville, A-G, Benachi, A, Martinovic, J, Razavi, F, Rabier, D, Simon, I, Boddaert, N, Brunelle, F, Sonigo, P. 2006. Contribution of Fetal MR Imaging in the Prenatal Diagnosis of Zellweger Syndrome. *Am. J. Neuroradiol.* 27: 333-336.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- Moldrich, RX, Gobius, I, Pollak, T, Zhang, J, Ren, T, Brown, L, Mori, S, de Juan, C, Britanova, O, Tarabykin, V, Richards, LJ. 2010. Molecular regulation of the developing commissural plate. *J. Comp. Neurol.* 518: 3645-3661.
- Moutard, M-L, Kieffer, V, Feingold, J, Kieffer, F, Lewin, F, Adamsbaum, C, Gélot, A, Campistol I Plana, J, van Bogaert, P, André, M, Ponsot, G. 2003. Agenesis of corpus callosum: prenatal diagnosis and prognosis. *Childs Nerv. Syst. ChNS Off. J. Int. Soc. Pediatr. Neurosurg.* 19: 471-476.
- O'Driscoll, MC, Black, GCM, Clayton-Smith, J, Sherr, EH, Dobyns, WB. 2010. Identification of genomic loci contributing to agenesis of the corpus callosum. *Am. J. Med. Genet. A.* 152A: 2145-2159.
- Peddibhotla, S, Nagamani, SC, Erez, A, Hunter, JV, Holder Jr, JL, Carlin, ME, Bader, PI, Perras, HM, Allanson, JE, Newman, L, Simpson, G, Immken, L, Powell, E, Mohanty, A, Kang, S-HL, Stankiewicz, P, Bacino, CA, Bi, W, Patel, A, Cheung, SW. 2015. Delineation of candidate genes responsible for structural brain abnormalities in patients with terminal deletions of chromosome 6q27. *Eur. J. Hum. Genet.* 23: 54-60.
- Rash, BG, Richards, LJ. 2001. A role for cingulate pioneering axons in the development of the corpus callosum. *J. Comp. Neurol.* 434: 147-157.
- Saldarriaga, W, García-Perdomo, HA, Arango-Pineda, J, Fonseca, J. 2015. Karyotype versus genomic hybridization for the prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities: a metaanalysis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 212: 330.e1-330.e10.
- Santo, S, D'Antonio, F, Homfray, T, Rich, P, Pilu, G, Bhide, A, Thilaganathan, B, Papageorgiou, AT. 2012. Counseling in fetal medicine: agenesis of the corpus callosum. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 40: 513-521.
- Schell-Apacik, CC, Wagner, K, Bihler, M, Ertl-Wagner, B, Heinrich, U, Klopocki, E, Kalscheuer, VM, Muenke, M, von Voss, H. 2008. Agenesis and dysgenesis of the corpus callosum: Clinical, genetic and neuroimaging findings in a series of 41 patients. *Am. J. Med. Genet. A.* 146A: 2501-2511.
- Siffredi, V, Anderson, V, Leventer, RJ, Spencer-Smith, MM. 2013. Neuropsychological Profile of Agenesis of the Corpus Callosum: A Systematic Review. *Dev. Neuropsychol.* 38: 36-57.
- Sotiriadis, A, Makrydimas, G. 2012. Neurodevelopment after prenatal diagnosis of isolated agenesis of the corpus callosum: an integrative review. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 206: 337.e1-5.
- Tang, PH, Bartha, AI, Norton, ME, Barkovich, AJ, Sherr, EH, Glenn, OA. 2009. Agenesis of the Corpus Callosum: An MR Imaging Analysis of Associated Abnormalities in the Fetus. *Am. J. Neuroradiol.* 30: 257-263.
- Urban, M, Bommer, C, Tennstedt, C, Lehmann, K, Thiel, G, Wegner, R-D, Bollmann, R, Becker, R, Schulzke, I, Körner, H. 2002. Ring chromosome 6 in three

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

fetuses: case reports, literature review, and implications for prenatal diagnosis. *Am. J. Med. Genet.* 108: 97-104.

Verbrugge, J, Choudhary, AK, Ladda, R. 2009. Tethered cord, corpus callosum abnormalities, and periventricular cysts in Wolf-Hirschhorn syndrome. Report of two cases and review of the literature. *Am. J. Med. Genet. A.* 149A: 2280-2284.

Wahl, M, Lauterbach-Soon, B, Hattingen, E, Jung, P, Singer, O, Volz, S, Klein, JC, Steinmetz, H, Ziemann, U. 2007. Human Motor Corpus Callosum: Topography, Somatotopy, and Link between Microstructure and Function. *J. Neurosci.* 27: 12132-12138.

Wahl, M, Strominger, Z, Jeremy, RJ, Barkovich, AJ, Wakahiro, M, Sherr, EH, Mukherjee, P. 2009. Variability of Homotopic and Heterotopic Callosal Connectivity in Partial Agenesis of the Corpus Callosum: A 3T Diffusion Tensor Imaging and Q-Ball Tractography Study. *Am. J. Neuroradiol.* 30: 282-289.

Wang, LW, Huang, CC, Yeh, TF. 2004. Major brain lesions detected on sonographic screening of apparently normal term neonates. *Neuroradiology* 46: 368-373.

Zollino, M, Orteschi, D, Murdolo, M, Lattante, S, Battaglia, D, Stefanini, C, Mercuri, E, Chiurazzi, P, Neri, G, Marangi, G. 2012. Mutations in KANSL1 cause the 17q21.31 microdeletion syndrome phenotype. *Nat. Genet.* 44: 636-638.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

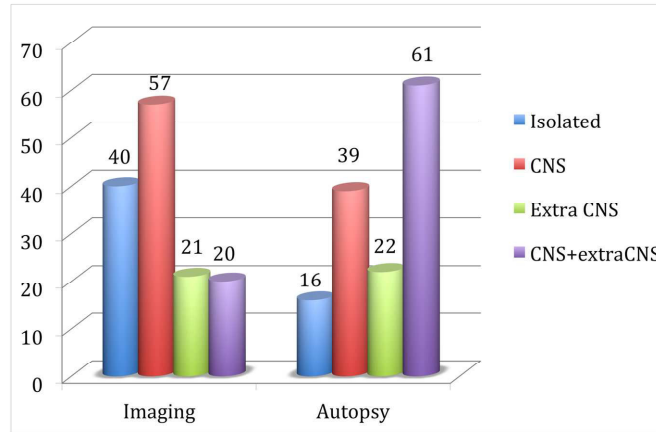


Figure 1

Associated findings in our series  
149x112mm (300 x 300 DPI)

review

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

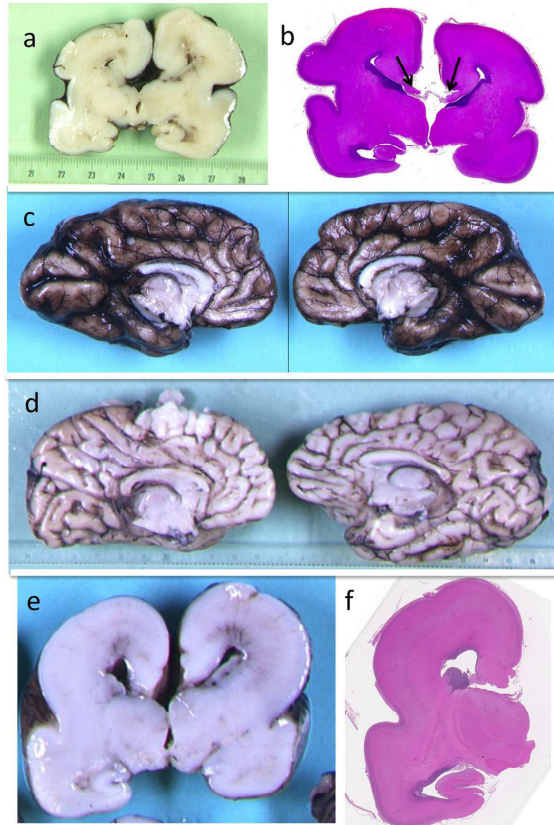


Figure 2

Examples representative of each neuropathological group  
266x355mm (300 x 300 DPI)



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

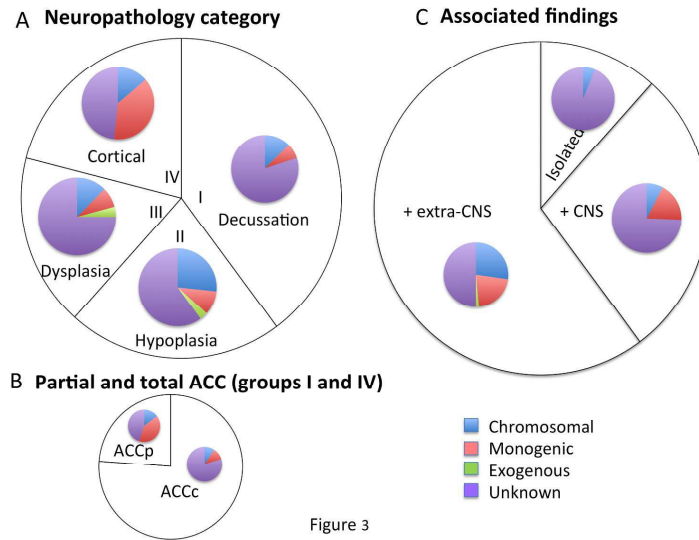


Figure 3

Etiology versus phenotype  
999x749mm (120 x 120 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

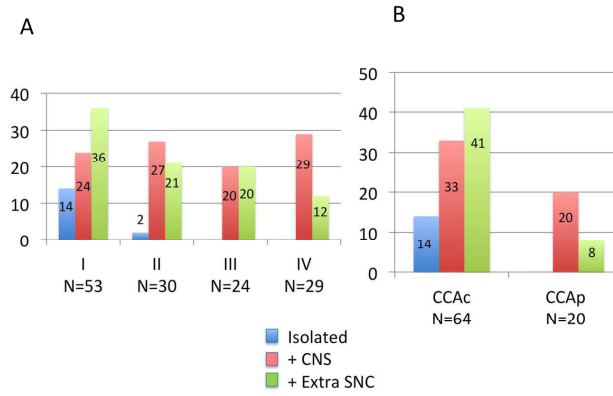


Figure 4

Associated findings among each neuropathological class  
 149x112mm (300 x 300 DPI)

Detection technique	Hist. class	Individual	Nomenclature	Chromosome region and size
CNVp detected by karyotype	I	IPP095098	46,XX,rec(1)dup(1p)inv(1)(p35q43) mat	Duplication 1pter Deletion 1qter
	IV	EFP0800250	46,XY,del(1)(q43q44).ish del(1)(CTD-3237H9- CTD-2600C10-,CTB-160H23+)dn	Interstitial Del1q44
	II	EFP1000281	46;XY,der(4)t(4;8)(p16.1;p23.3).arr 4p16.3p16.1(71,552_8,889,074)x1,8p23;1p23.3 (221,611_7,753,583)x3dn	Del4p 9 Mb dup8q 7 Mb
	II	EFP0800110	45,XY,-6[18]/46,XY,r(6)[3].arr 6q27(166,782,209-170,890108)x1	Del6q 4 Mb
	II	EFP1000019	46,XY, der(X)t(X;7)(p22.3;q22.1). Ish der(X)t(X;7)(pcpX+,DXYS129-,wcp7+) arr 7q22.1q36.3(103,237,760-158,811,268)x3.	Dup7q 55 Mb
	I	EFP1000294	46,XX,der(7)t(7;8)(q36.3;p24.3). ish der(7)t(7;8)(wcp7+,CTD-2330F20-,RP11-6903-, RP11-1072H3+,wcp8+)dn	Monosomy 7q36.3 1.4 Mb Trisomy 8p23.3 0.8 Mb
	I	EFP1100085	47,XY,i(9)(p10).ish i(9)(p10)(wcp9+)?	Iso9p10
	II	EFP0800154	47,XX,+18	T18
	III	EFP0500220	47,XY,+18	T18
	IV	EFP1200269	46,XX,r(21)(p12q13)[5]/45,XX,-21[22].ish r(21)(wcp21+,RP1- 270M7+,LSI21+,VUyRM2029+)	Mosaicism ring21/ Monosomy21
CNVp visible on K and detected by CGH	I	EFP1100086	arr 3q13.31q21.3(111,087,175- 125,870,354)x1dn	Del3q 15 Mb
	I	EFP0800002	arr 8p12p11.22(34,169,768-43,172,139)x3, 8q11.1q24.3(47,681,335-146,280,020)x3 dn	Dup8p8q 98 Mb
	II	EFP1200455	arr 8p12q21.3(35,698,161-81,070,358x3)x2~3	Dup8p8q 45 Mb
CNVp not visible on K and detected by FISH	II	EFP100095	46XX.ish del(17)(p13.3)(CTD-2386E6-)dn	Del17p
CNVp not visible on karyotype and detected by CGH	IV	EFP1200113	arr 14q12(29,864,986-32,257,097)x1dn	Del14q 2 Mb
	II	EFP0500091	17q21.31 (43,706,826-44,210,882)x1	Del17q 500 Kb
	II	EFP1300051	17q21.31 (43,706,826-44,210,882x1) (oocyte donation)	Del17q 500 Kb (Egloff et al., 2014)
	II	EFP1000407	arr 19p13.3p13.2(0,258,667-7,442,292)x3dn	Dup19p 7 Mb
	II	EFP1400339	46,XY, dup(21)(q21 ?). ish dup(21)(q21 ?)(WCP21+). arr 21q21.1q21.3 (20,737,293x2, 20,891,357- 28,315,834x3,28,379,126x2) pat	Dup21q 7 Mb
VOUS not visible on karyotype and detected by CGH	III	EFP0118070	arr 10q26.2q26.3(129,100,919- 131,197,707)x1~2	Del10q 2 Mb
	I	EFP1200363	arr 11p13(31,391,145-31,775,517)x1 pat	Del11p13.3 384 Kb

Table 1 : Cytogenetics findings in our series

CNVp : Copy Number Variation considered as pathogenic.

VOUS: variant of unknown significance

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

	Disease	Gene	H	Refseq	Mutation	Inheritance
EFP1000388	Opitz syndrome	<i>MID1</i>	RXL	NM_000381.3	c.829C>T, p.Arg277*	Maternal
EFP1400019	Zellweger syndrome	<i>PEX1</i>	AR	NM_000466.3	c.2097dup, p.Ile700TyrfsX42 c.1435_1439dup, p.Leu480Phefs*4	ongoing
EFP1400152	PDH deficiency				Ongoing	
EFP0900192	Tubulinopathy	<i>TUBA1A*</i>	AD	NM_001270399.1	c.978A>C, p.Lys326Asn	<i>De novo</i>
EFP1000414	Tubulinopathy	<i>TUBA1A*</i>	AD	NM_001270399.1	c.791G>A, p.Arg264His	<i>De novo</i>
EFP1300345	Tubulinopathy	<i>TUBA1A</i>	AD	NM_001270399.1	c.5G>A, p.Arg2His	<i>De novo</i>
EFP0500151	Tubulinopathy	<i>TUBB3*</i>	AD	NM_006086.3	c.1162A>G, p.Met388Val	<i>De novo</i>
EFP1300584	Tubulinopathy	<i>TUBB3</i>	AD	NM_006086.3	c.817C>T, p.Leu273Phe	<i>De novo</i>
EFP0800204	Type 1 lissencephaly	<i>PAFAH1B1</i>	AD	NM_00430.3	exons 2 -11 deletion	<i>De novo</i>
EFP1400119	Type 2 lissencephaly	<i>POMT2</i>	AR	NM_013382.5	c.353G>A, p.Gly118Asp c.1891G>A, p.Gly631Arg	Maternal Paternal
EFP1400202	Type 2 lissencephaly				Ongoing	
EFP1000261	Type 2 lissencephaly	<i>ISPD**</i>	AR	NM_001101426.3	c.638T>G, p.Met213Arg	Maternal
EFP1100130					Deletion exons 3 to 6 at least	Paternal
EFP1300627	Type 2 porencephaly	<i>COL4A2</i>	AD	NM_001846.2	c.2980G>A, p.Gly994Arg	<i>De novo</i>
EFP1300162	Bicker-Adams syndrome	<i>L1CAM</i>	RXL	NM_001278116.1	c.3543-28_3671del, p.?	<i>De novo</i>
EFP0900237	Bicker-Adams syndrome	<i>L1CAM</i>	RXL	NM_001278116.1	c.892C>T, p.Gln298*	Maternal
EFP0500201	Smith-Lemli-Opitz syndrome	?	AR	?	Biochemical testing diagnosis. No molecular diagnosis	
EFP0017512	Smith-Lemli-Opitz syndrome	<i>DHCR7</i>	AR		c.976G>C, p.Val326Leu pat c.964-1G>C, p.? mat	Paternal Maternal
EFP1100178	Oro-facio-digital syndrome	<i>OFD1</i>	DXL	NM_003611.2	c.710 del, p.Lys237Serfs*6	<i>De novo</i>
EFP1300297	CHARGE syndrome	<i>CHD7</i>	AD	NM_017780.3	c.7957C>T, p.Arg2653*	<i>De novo</i>
EFP1200370	Microcephaly 5	<i>ASPM</i>	AR	NM_0018136.4	c.7642C>T, p.Gln2548* mat; c.1055_1056insGG, p.Ile3352Metfs*30 pat	Maternal Paternal

Table 2 : Genetic findings in our series

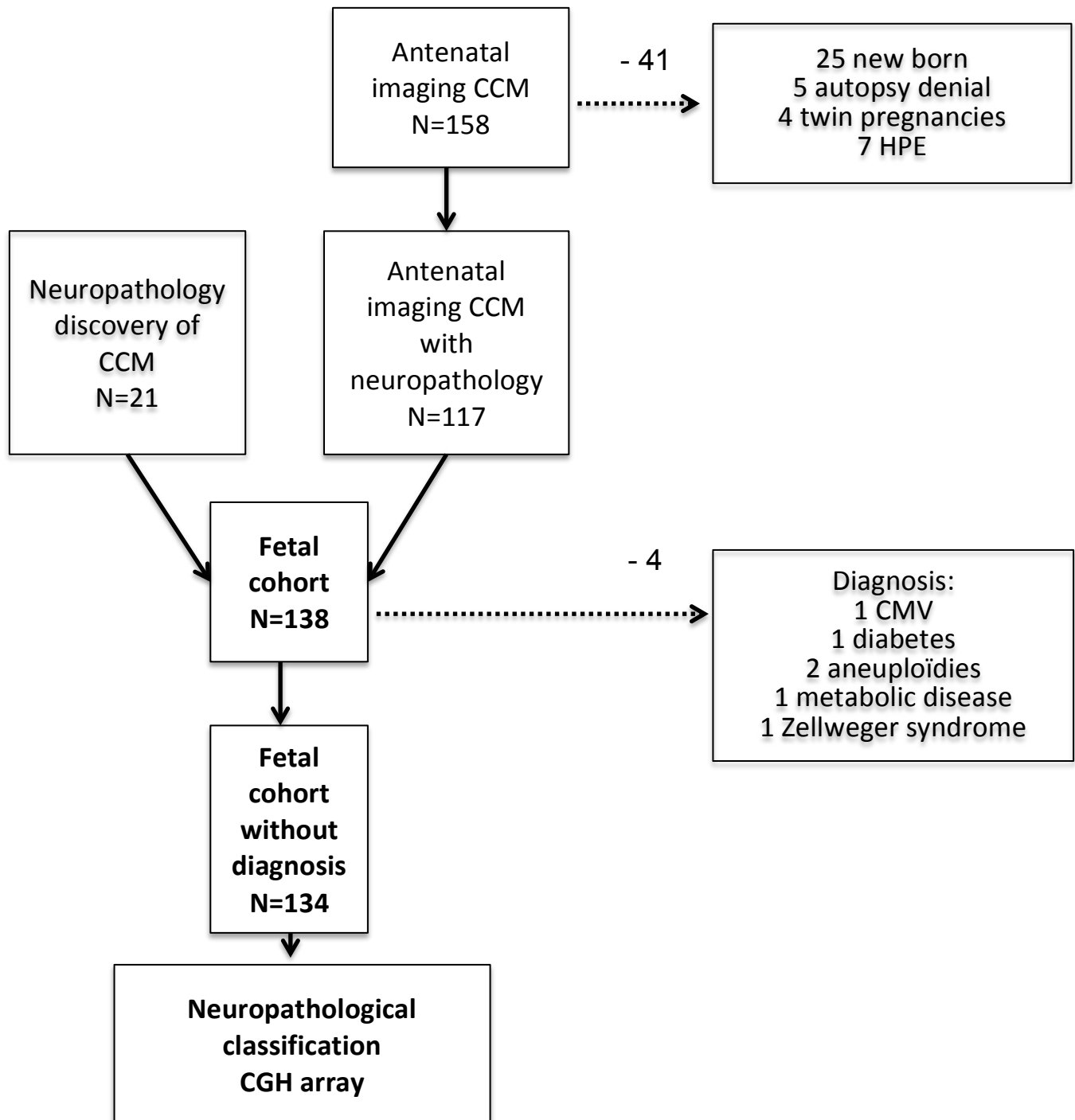
H: mode of inheritance of the disease

\* Mutations in tubulin genes are frequent causes of various fetal malformations of cortical development including microlissencephaly. Acta Neuropathologica Communications. 2014. Fallet Bianco et al.

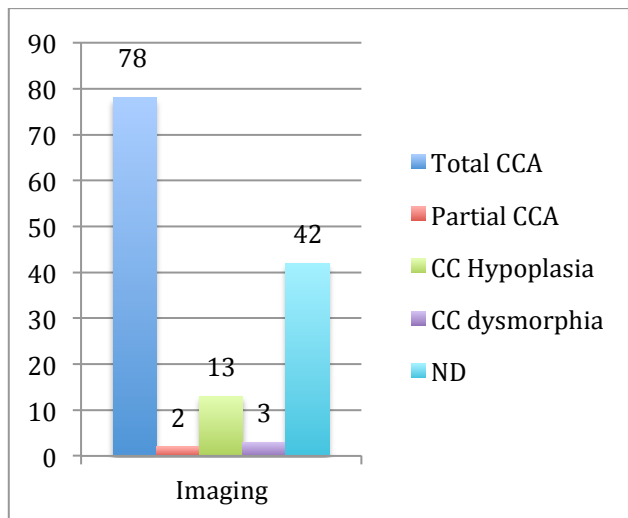
\*\* Identification of Mutations in *TMEM5* and *ISPD* as a cause of severe Cobblestone Lissencephaly. Am J Hum Genet. 2012. Vuillaumier-Barrot et al.





Supplementary data**Figure S1:****Flow chart of the cohort of CCM:**

Monocentric retrospective study of 179 fetuses with CCM between 2000 and 2015, among which a fetal cohort of 138 fetuses with neuropathological and CGH array analysis.



**Figure S2 :**

**CCM type on prenatal imaging in the fetal cohort of 138 fetuses**

78 fetuses with total corpus callosum agenesis ; 2 fetuses with partial agenesis ; 13 with corpus callosum hypoplasia ; 3 with corpus callosum dysmorphia and 42 with undetermined corpus callosum malformation.



## **ANNEXE 3**

**Alby et al., AJHG, 2015**

## Mutations in *KIAA0586* Cause Lethal Ciliopathies Ranging from a Hydrolethalus Phenotype to Short-Rib Polydactyly Syndrome

Caroline Alby,<sup>1,2</sup> Kevin Piquand,<sup>1</sup> Céline Huber,<sup>3</sup> André Megarbané,<sup>4</sup> Amale Ichkou,<sup>1,2</sup> Marine Legendre,<sup>5</sup> Fanny Pelluard,<sup>6</sup> Ferechté Encha-Ravazi,<sup>1,2</sup> Georges Abi-Tayeh,<sup>7</sup> Bettina Bessières,<sup>2</sup> Salima El Chehadé-Djebbar,<sup>8</sup> Nicole Laurent,<sup>8</sup> Laurence Faivre,<sup>8</sup> László Sztriha,<sup>9</sup> Melinda Zombor,<sup>9</sup> Hajnalka Szabó,<sup>9</sup> Marion Failler,<sup>10</sup> Meriem Garfa-Traore,<sup>11</sup> Christine Bole,<sup>12</sup> Patrick Nitschké,<sup>13</sup> Mathilde Nizon,<sup>2,3</sup> Nadia Elkhartoufi,<sup>1,2</sup> Françoise Clerget-Darpoux,<sup>1</sup> Arnold Munnich,<sup>1,2</sup> Stanislas Lyonnet,<sup>1,2</sup> Michel Vekemans,<sup>1,2</sup> Sophie Saunier,<sup>10</sup> Valérie Cormier-Daire,<sup>2,3</sup> Tania Attié-Bitach,<sup>1,2</sup> and Sophie Thomas<sup>1,\*</sup>

*KIAA0586*, the human ortholog of chicken *TALPID3*, is a centrosomal protein that is essential for primary ciliogenesis. Its disruption in animal models causes defects attributed to abnormal hedgehog signaling; these defects include polydactyly and abnormal dorsoventral patterning of the neural tube. Here, we report homozygous mutations of *KIAA0586* in four families affected by lethal ciliopathies ranging from a hydrolethalus phenotype to short-rib polydactyly. We show defective ciliogenesis, as well as abnormal response to SHH-signaling activation in cells derived from affected individuals, consistent with a role of *KIAA0586* in primary cilia biogenesis. Whereas centriolar maturation seemed unaffected in mutant cells, we observed an abnormal extended pattern of CEP290, a centriolar satellite protein previously associated with ciliopathies. Our data show the crucial role of *KIAA0586* in human primary ciliogenesis and subsequent abnormal hedgehog signaling through abnormal GLI3 processing. Our results thus establish that *KIAA0586* mutations cause lethal ciliopathies.

Ciliopathies are a continuum of genetically highly heterogeneous disorders with varying severity and organ involvement and are all caused by genes involved in ciliary function or biogenesis. Among the most severe ciliopathies are the short-rib polydactyly (SRP) group of lethal skeletal dysplasia (SRPI [MIM: 613091], SRPII [MIM: 263520], SRPIII [MIM: 613091], and SRPIV [MIM: 269860]), hydrolethalus syndrome (HLS [MIM: 236680]), and Meckel syndrome (MKS [MIM: 249000]). All three represent the extreme phenotype of viable ciliopathies, namely Jeune asphyxiating thoracic dystrophy (MIM: 208500) and Ellis-van Creveld syndrome (MIM: 225500),<sup>1</sup> acrocallosal syndrome (MIM: 200990),<sup>2</sup> and Joubert syndrome (MIM: 213300),<sup>3–5</sup> respectively.

Here, we examined a consanguineous Lebanese family (family 1; Figure 1A) with two 15 gestational week (gw)-old fetuses presenting with severe hydrocephaly, polydactyly of the hands and feet, a cleft palate, and skeletal abnormalities (Figure 1B, Table 1, and supplemental case reports). We considered this phenotype to be similar to that of HLS and therefore sequenced *HYLS1* (MIM:

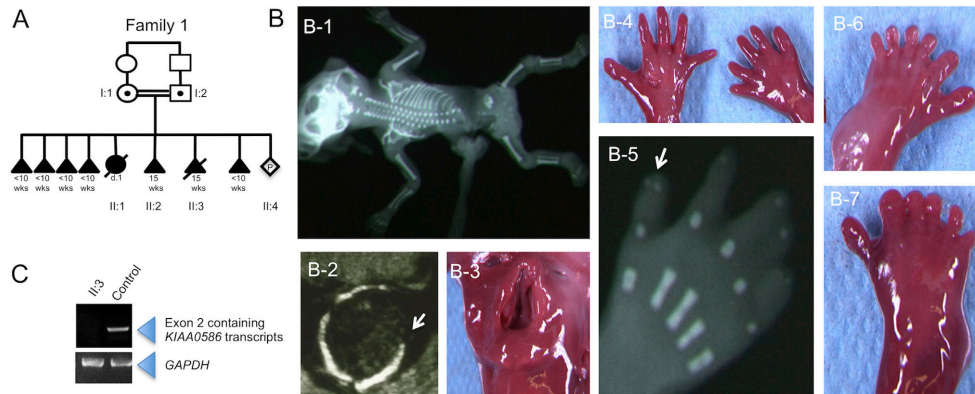
610693) and *KIF7* (MIM: 611254) but found no mutation. Because HLS is now known as a ciliopathy, we then combined a targeted capture strategy for candidate ciliary genes with next-generation sequencing, as described previously, by using DNA from fetus II:3.<sup>6,7</sup> In brief, ciliary exome-targeted sequencing and bioinformatics filtering were conducted with a Custom SureSelect Capture Kit (Agilent Technologies) targeting 4.5 Mb of 20,168 exons (1,221 ciliary candidate genes). Agilent SureSelect libraries were prepared from 3 µg of genomic DNA sheared with a Covaris S2 Ultrasonicator according to manufacturer's instructions. The Ovation Ultralow System (NuGEN Technologies) was used to prepare HiSeq 2500 pre-capture barcoded libraries. The ciliome capture by hybridization was performed on a pool of 10–16 barcoded pre-capture libraries. Sequencing performed on a HiSeq 2500 (Illumina) was done on pools of barcoded ciliome libraries (16 ciliome libraries per lane of HiSeq FlowCell). Paired-end reads (100 100-bp reads) were generated and mapped on a human genome reference (NCBI Genome browser build 37) with the Burrows-Wheeler Aligner (Illumina).

<sup>1</sup>INSERM U1163, Laboratory of Embryology and Genetics of Congenital Malformations, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité and Imagine Institute, 75015 Paris, France; <sup>2</sup>Département de Génétique, Hôpital Necker – Enfants Malades, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, 75015 Paris, France; <sup>3</sup>INSERM U1163, Laboratory of Molecular and Physiopathological Bases of Osteochondrodysplasia, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité and Imagine Institute, 75015 Paris, France; <sup>4</sup>Medical Genetics Unit, Saint Joseph University, Rue de Damas, BP 175208, Mar Mikhaël, Beyrouth 1104, Lebanon; <sup>5</sup>Department of Genetics, Poitiers University Hospital, 2 Rue de la Milétrie, 86021 Poitiers, France; <sup>6</sup>Unité de Pathologie Fœtoplacentaire, Groupe Hospitalier Pellegrin, Centre Hospitalier Universitaire, Place Amélie Raba-Léon, 33076 Bordeaux Cedex, France; <sup>7</sup>Service de Gynécologie Obstétrique, Hôtel-Dieu de France, BP 166830, Achrafieh, Beyrouth 1100, Lebanon; <sup>8</sup>Génétique et Anomalies du Développement EA4271, Université de Bourgogne, 21000 Dijon, France; <sup>9</sup>Department of Paediatrics, Faculty of Medicine, University of Szeged, Korányi fasor 14-15, 6725 Szeged, Hungary; <sup>10</sup>INSERM U1163, Laboratory of Inherited Kidney Diseases, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité and Imagine Institute, 75015 Paris, France; <sup>11</sup>Cell Imaging Platform, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité and Imagine Institute, 75015 Paris, France; <sup>12</sup>Genomic Core Facility, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité and Imagine Institute, 75015 Paris, France; <sup>13</sup>Bioinformatics Core Facility, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, 75015 Paris, France

\*Correspondence: [sophie.thomas@inserm.fr](mailto:sophie.thomas@inserm.fr)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.06.003>. ©2015 by The American Society of Human Genetics. All rights reserved.





**Figure 1. Pedigree and Phenotype of Family 1, Subject II:3 with a KIAA0586 Nonsense Variation**

(A) Family 1 pedigree. The c.230C>G (p.Ser77\*) variant segregated with the expected patterns of autosomal-recessive inheritance in all available family members.

(B) Phenotype of affected subject II:3. A fetal X-ray shows a frontal view (B-1). Ultrasound imaging shows exencephaly (axial view) with an occipital defect (arrow; B-2). Photographs show cleft lip and palate (B-3), polysyndactyly (B-4) with duplication of transcript phalange of thumbs on X-ray of the right hand (arrow; B-5), and preaxial polydactyly of the feet (B-6 and B-7).

(C) RT-PCR amplification on mRNA extracted from affected and age-matched-control tissue; amplification shows complete degradation of transcripts containing KIAA0586 exon 2 in mutant tissue. GAPDH was used as cDNA quality and quantity control.

Downstream processing was carried out with the Genome Analysis Toolkit, SAMtools, and Picard Tools according to documented best practices from the Broad Institute. All variants were annotated with a software system developed by the Paris Descartes University bioinformatics platform. Informed consent was obtained for all participating families, and the study was approved by the ethical committee of Paris Ile de France II. Genomic DNA was extracted from frozen tissue or amniocyte cultured cells for fetal subjects and from peripheral-blood samples for parents. Finally, a total of 6,263 variants were identified, and after we filtered data by removing known SNPs and synonymous coding sequence variations and by using a recessive model of inheritance, a unique nonsense homozygous mutation remained (Table S1) in KIAA0586 (MIM: 610178). KIAA0586, the ortholog of chicken KIAA0586, was considered an excellent candidate gene given that its disruption in animal models causes defects, including polydactyly and abnormal dorsoventral patterning of the neural tube, attributed to abnormal hedgehog signaling.<sup>8–11</sup> The c.230C>G (p.Ser77\*) variant (GenBank: NM\_001244189.1) segregated with the expected patterns of autosomal-recessive inheritance in all available family members and is absent from dbSNP, the NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) Exome Variant Server (EVS), the Exome Aggregation Consortium (ExAC) Browser, and 300 Lebanese control chromosomes. This homozygous nonsense variation is located in KIAA0586 exon 2, and mRNAs produced are predicted to be targeted for nonsense-mediated decay (NMD). To test this, we extracted mRNA from the tissue of an affected individual

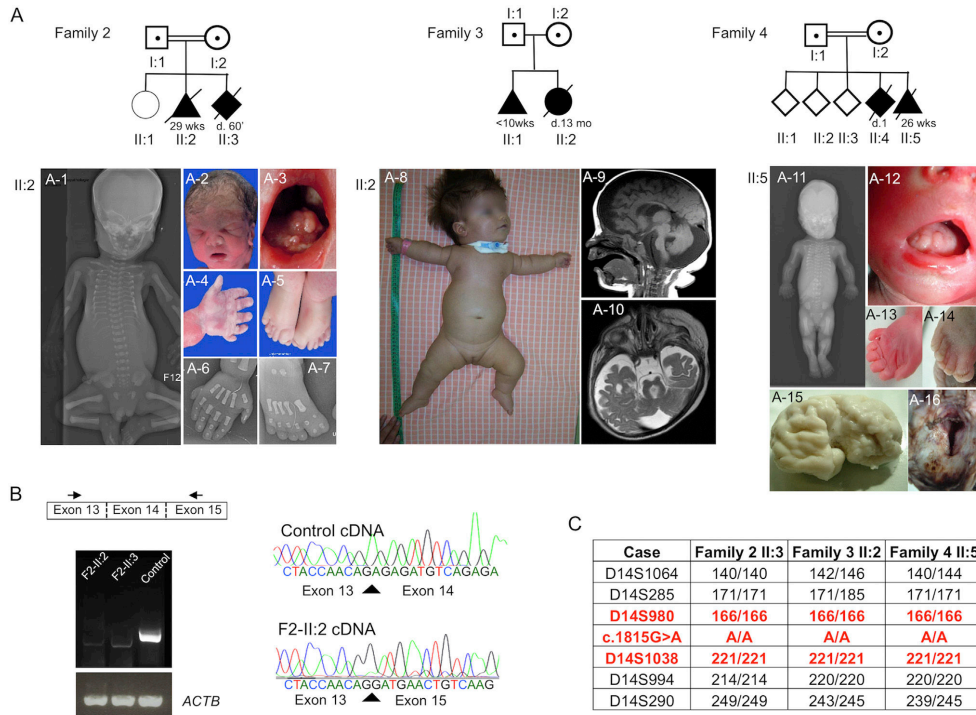
(subject II:3, family 1) and age-matched control individuals and subsequently performed reverse transcription. Compared to control mRNA, mRNA extracted from the affected subject, showed a total absence of transcript containing KIAA0586 exon 2. Importantly, GAPDH amplification was similar in both samples (Figure 1C). We next tested KIAA0586 expression in different tissues at different human developmental stages and found those specific transcripts containing KIAA0586 exon 2 were expressed as early as 6 gw (Carnegie stage 16) in humans. They appeared ubiquitously expressed during fetal development and persisted postnatally in all human adult tissues tested (Figure S1).

We performed additional next-generation sequencing of ciliary genes for 150 subjects presenting with lethal ciliopathies with various combinations of brain and skeletal abnormalities. This screen led us to identify a c.1815G>A (p.=) homozygous silent variant (GenBank: NM\_001244189.1) in three subjects from three unrelated families (II:2 in family 2, II:2 in family 3, and II:5 in family 4) originating from Romania (family 2), Hungary (family 3), and Kosovo (family 4). The variant segregates with the expected patterns of autosomal-recessive inheritance in all available family members. All three subjects had a SRP syndrome with similar cerebral anomalies, preaxial polydactyly of the feet and postaxial polydactyly of the hands, and long-bone shortening, including short ribs. Upon neuropathological examination, all three affected subjects displayed vermis agenesis and brainstem anomalies evocative of a molar tooth sign (Figure 2A, Table 1, and supplemental case reports). The variation involves

**Table 1. Clinical Data of Affected Individuals in the Four Families Studied**

Family (ID)	Subject	Age	Sex	Origin	PD	CK	BDP	CP	MTS	Brain Anomalies	Skeletal Anomalies	Other Anomalies	Variation	Exon	Inheritance
1 (HE)	II:2	15 gw	ND	Lebanon	+	ND	ND	+		major hydrocephaly	no clavicle	diaphragmatic hernia	no DNA	ND	ND
	II:3	15 gw	female	Lebanon	+	-	ND	+		major hydrocephaly, occipital defect	flat and wide iliac wings	fetal hydrops	c.230C>G (p.Ser77*)	2	homozygous
2 (CI)	II:2	29 gw	male	Romania	+	-	-	+	+	VH, polymicrogyria, absent olfactory bulb, ventriculomegaly	short ribs	tongue hamartomas, multiple frenulae	c.1815G>A (splice)	14	homozygous
	II:3	39 gw (died 1 hr after birth)	ND	Romania	+	-	ND	ND	+	VH, abnormal gyration, mega cisterna magna	short ribs, short limbs	ND	c.1815G>A (splice)	14	homozygous
3 (FA)	II:1	spontaneous fetal death (<10 weeks)	ND	Hungary	ND	ND	ND	ND	ND	anencephaly	ND	ND	no DNA	ND	ND
	II:2	died at 13 months	female	Hungary	+	-	-	-	+	occipital meningocele, VH, hypoplasia of the hemispheres and corpus callosum, abnormal basal ganglia, pontocerebellar hypoplasia	short ribs, short limbs, PD of hands and feet	dysplastic and low set ears, depressed nasal bridge, short neck, multiple frenulae	c.1815G>A (splice)	14	homozygous
4 (ME)	II:4	died at 1 day of life	ND	Kosovo	+	-	-	+	+	described as identical to his sibling	described as identical to his sibling	described as identical to his sibling	no DNA	ND	ND
	II:5	26 gw	male	Kosovo	+	-	-	+	+	Occipital meningocele (key hole), hypoplastic brain stem, VH, CC and septal agenesis, temporal polymicrogyria	Short ribs, short limbs (-6 to -8 SD), superior limb incurvation, bilateral postaxial PD of hands and feet	Retinal dysplasia with retinal coloboma, brachyphalangism, facial dysmorphism, micropenis, frenulae nodules	c.1815G>A (splice)	14	homozygous

The *KIAA0586* reference sequence used was GenBank: NM\_001244189.1. Chromosome analysis and clinicopathological examination were performed for all affected subjects. Abbreviations are as follows: BDP, bile duct proliferation of liver; CC, corpus callosum; CK, cystic kidneys; CP, cleft palate; MTS, molar tooth sign; PD, polydactyly; VH, vermis hypoplasia; ND, no data.



**Figure 2. Pedigree, Phenotype, and Haplotype Analyses in Families 2–4 Lead to the Identification of a *KIAA0586* Homozygous Splice-Site Mutation with a Founder Effect**

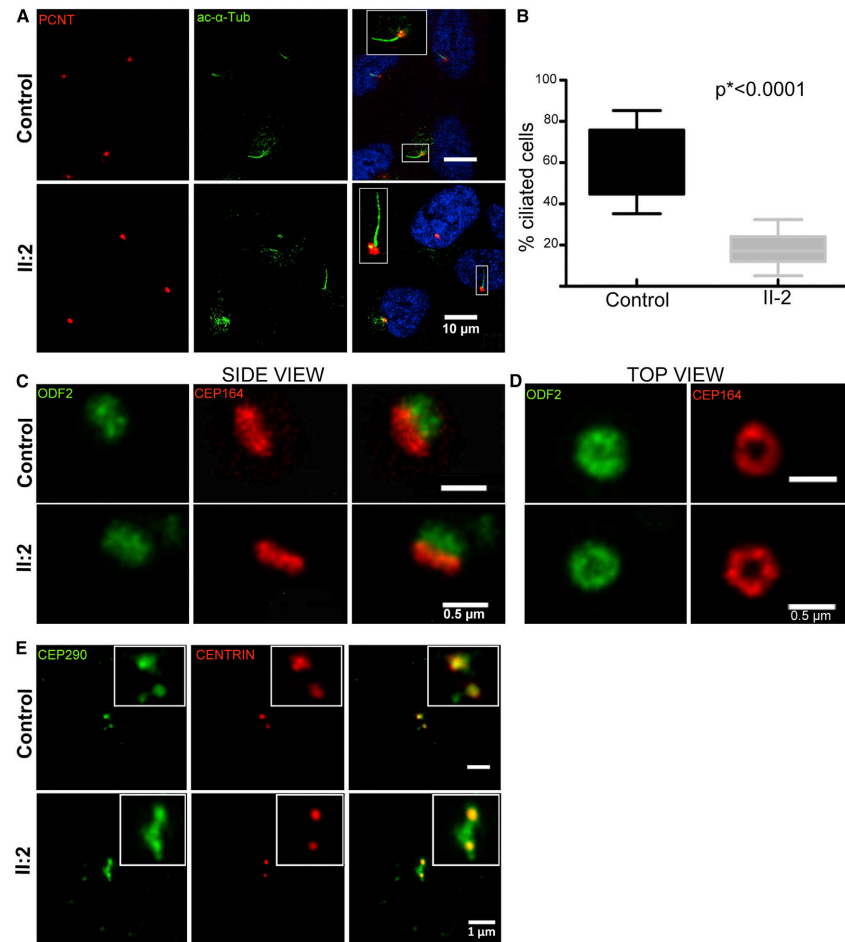
(A) Pedigrees. In subject II:2 of family 2, an X-ray (frontal view) shows shortening of ribs and micromelia with round metaphysal ends (A-1), and pictures and X-rays show dysmorphism (A-2), lingual hamartomas (A-3), postaxial polydactyly of the hand (A-4 and A-6), and preaxial polysyndactyly of the feet (A-5 and A-7). For subject II:2 in family 3, a picture shows short thorax and micromelia (A-8), and sagittal (A-9) and axial (A-10) views of brain MRI show a micro-brain with large ventricles and large subarachnoid spaces, corpus-callosum and ponto-cerebellar hypoplasia with a large fourth ventricle and cisterna magna, and a molar tooth aspect. In subject II:5 from family 4, an X-ray (frontal view) shows shortening of ribs and micromelia with round metaphysal ends (A-11), and pictures show lingual hamartomas (A-12), postaxial polydactyly of the right hand (A-13), preaxial polydactyly of the right foot (A-14), temporal polymicrogyria (A-15), and an occipital keyhole defect (A-16).

(B) The c.1815G>A *KIAA0586* variant affects the last base of exon 14 and is responsible for aberrant transcript lacking exon 14, as shown by RT-PCR and sequencing of *KIAA0586* mRNA from control and affected subjects (family 2, subjects II:2 and II:3). Total RNAs were extracted from frozen blood with the Nucleospin RNA Blood Kit and on-column DNase digestion (Macherey Nagel). *ACTB* was used as cDNA quality and quantity control.

(C) Haplotype at *KIAA0586* of affected subjects from families 2–4.

the last base of *KIAA0586* exon 14, is absent from dbSNP, the EVS, and the ExAC Browser, and is predicted in silico to abolish the intron 14 donor splice site (MaxEntScan, splice site prediction by Neural Network [NNSPLICE], and Human Splicing Finder). To confirm this hypothesis, we performed RT-PCR and subsequent cDNA sequencing on total mRNA extracted from blood samples from subjects II:2 and II:3 from family 2 and from control individuals. A unique transcript lacking *KIAA0586* exon 14 was observed in both affected subjects (Figure 2B) and is predicted to cause a shift in the reading frame with a premature stop codon.

Given the Eastern European origin of the three families, a founder effect was highly suspected. The distance to the common ancestor was estimated by a likelihood-based method.<sup>12</sup> We selected the polymorphic markers encompassing *KIAA0586* and found a similar haplotype in those three families (Figure 2C). The allele frequencies of the microsatellites used were found on the CEPH genotype database, and the mutation rate was chosen as  $10^{-3}$ . Because the genetic distances available for closely linked markers are generally not very accurate, we computed the rates of recombination between markers by using both the overall genetic length of the haplotype and the

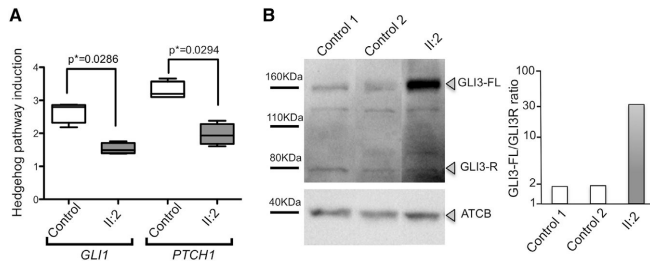


**Figure 3. Analysis of Ciliogenesis in KIAA0586 Mutant Cells**  
Cells from affected individuals were obtained from subject II:2 in family 2. (A and B) In control cells, primary cilia co-stained with acetylated alpha tubulin (ac- $\alpha$ -Tub, clone 6-11B-1, Sigma) and pericentrin (PCNT, Abcam Ab4448) protrude from 60% of cells ( $n = 500$ , three independent experiments), whereas only 20% of mutant cells ( $n = 500$ ) bear a primary cilia. The graph in (B) is a boxplot representing the distribution of the data. The boxes contain 50% of the values and the whiskers indicate the minimum and the maximum of the distribution. The p values were calculated with the Mann-Whitney two-tailed test. Confocal images were taken with a Leica SP5 confocal microscope. (C and D) High-resolution imaging of control and mutant cell centrioles co-stained with ODF2 (centriolar subdistal appendage protein; Abnova, H00004957-M01) and CEP164 (a centriolar distal appendage protein; Sigma, HPA037606) showed no defect in mutant cells, neither on side view (C) nor on top view (D). Super-resolution microscopy was performed with a Leica TCS SP8 STED (Stimulated Emission Depletion). (E) Immunostaining with CEP290 (Novus Biologicals, NB100-86991) and centrin (Clone 20H5, Millipore) antibodies, showing abnormal extended pattern of CEP290.

physical distances between markers.<sup>13</sup> The closest markers at which affected individuals do not share any alleles were determined on both sides of *KIAA0586*. The distance to the common ancestor was estimated to be approximately 480 years  $n = 16$  generations ago ( $n_{inf}$  [the lower bound of the

95% confidence interval (CI)] = 5;  $n_{sup}$  [the upper bound of the 95% CI] = 63;  $n_{end}$  [the total number of iterations performed] = 232; likelihood = -3.776324).

In animal and cell models, TALPID3 has been involved in very early stages of ciliogenesis, before the formation and



**Figure 4. SHH Signaling in *KIAA0586* Mutant Cells**

(A) *KIAA0586* mutant fibroblasts from subject II:2 in family 2 showed an altered response to smoothened agonist (SAG; sc-202814, Santa Cruz; 5  $\mu$ M for 18 hr), given that they induced less *GLI1* and *PTCH1* expression than did control cells. Primers used for real-time qRT-PCR are listed in Table S2. Values from five independent experiments were normalized to *GAPDH* and are presented as relative expression levels. The boxes contain 50% of the values and the whiskers indicate the minimum and the maximum of the distribution. The p values were calculated with the Mann-Whitney two-tailed test.

(B) Western blot analysis with a GLI3 antibody (AF3690, R&D Systems) showed that the amount of processing of GLI3-FL into its repressor form, GLI3-R, was much lower in *KIAA0586* mutant fibroblasts than in control cells. The samples were not run in contiguous lanes, and in the figure presented here, lanes were spliced together (the entire photograph of the immunoblot is presented in Figure S3). A graphical evaluation of the GLI3-FL/GLI3-R ratio, with actin as a loading control and ImageJ software for densitometry, is presented.

docking of a primary ciliary vesicle at the distal appendage.<sup>14</sup> TALPID3 interacts with CP110 and co-localizes to the distal ends of centrioles. CP110 and its protein-interaction network (including CEP97, CEP290, and KIF24) have been found to modulate cilium assembly (reviewed in Tsang et al.<sup>15</sup>). In addition, TALPID3 localizes near the distal appendages,<sup>14</sup> which localize to the site of centriole-to-membrane docking and are required for the centriole to be converted to a basal body and thus for ciliogenesis.<sup>16</sup>

In order to examine the effect of *KIAA0586* loss on cilia assembly in humans, we induced ciliogenesis by using serum-starvation-mediated cell-cycle arrest in confluent fibroblasts from both affected (family 2, subject II:2) and control subjects and visualized cilia by co-immunostaining with antibodies to ARL13B (a cilia marker), glutamylated tubulin (GT335) or acetylated  $\alpha$ -tubulin, and pericentrin (Figure 3A and data not shown). In control fibroblasts with wild-type *KIAA0586*, cilia were evident in 60% of the total stained cells by 48 hr of serum starvation, and nearly all were co-stained with all markers. In mutant fibroblasts, only 20% of cells presented with cilia (Figures 3A and 3B). This result indicates that *KIAA0586* is necessary for cilia biogenesis in humans, in accordance with its function in animal and cell models.

We then checked centriolar morphogenesis and targeting of crucial proteins and found no differences in the staining patterns of CEP164 (distal appendages of mother centrioles) and ODF2 (subdistal appendages), indicating that assembly of these proteins to centrioles is not affected by *KIAA0586* loss (Figures 3C and 3D). Finally, as suggested by TALPID3 siRNA depletion studies in which TALPID3 is required for centriolar satellite dispersal preceding the formation of mature ciliary vesicles,<sup>14</sup> we compared the distribution of the CP110-interacting protein CEP290 in affected cells to the distribution in control cells and found an abnormal extended pattern of this satellite protein in asynchronously growing conditions (Figure 3E).

We next tested the transduction of the SHH pathway in mutant fibroblasts by assaying the expression of *PTCH1*

and *GLI1*, two transcriptional targets of SHH signaling, after pathway activation by the addition of smoothened agonist. We found that both *PTCH1* and *GLI1* were less induced in mutant fibroblasts than in controls (Figure 4A). We also analyzed GLI3 processing by western blot and found that *KIAA0586* mutant fibroblasts exhibited increased amounts of full-length, unprocessed GLI3 (GLI3-FL) and an abnormal GLI3-FL/GLI3-R ratio (Figure 4B and Figure S3). Thus, *KIAA0586* mutant cells exhibit abnormal SHH responsiveness, suggesting that at least some of the defects in affected individuals with *KIAA0586* variations might be secondary to abnormal SHH signaling, as observed in animal models.<sup>8–11,17</sup>

In this study, using a targeted high-throughput sequencing strategy for candidate ciliary genes, we identified homozygous nonsense and splicing *KIAA0586* mutations as responsible for lethal ciliopathies. This candidate-gene strategy previously succeeded in identifying ciliopathy genes, including *TCTN3* (MIM: 613847), which is associated with Mohr-Majewski syndrome (OFD4 [MIM: 258860]).<sup>6</sup>

The phenotype of *KIAA0586*-affected subjects ranges from a hydroletharus phenotype to SRP syndrome in four unrelated families. In particular, cerebral phenotypes range from anencephaly or large occipital meningocele to vermian agenesis associated with brainstem anomalies; such anomalies are classically suggestive of ciliopathies. Importantly, the only living SRP-affected individual reported in this study also presented with a molar tooth sign on brain MRI, consistent with the conclusions of neuropathological examination on fetal subjects. All affected subjects display skeletal anomalies, including a consistent polydactyly, short ribs, and micromelia with round femoral ends in families 2–4. In addition, most of the affected subjects have a large median cleft palate. These features are reminiscent of the spectrum of SRPII and SRPIV.<sup>1,18,19</sup>

Thus, fetuses and individuals reported in this study all display lethal phenotypes consistent with a hedgehog-signaling defect and similar to the phenotype described



in *KIAA0586* animal models.<sup>8–11,17</sup> In particular, the *KIAA0586* chicken with a frameshift mutation in exon 7 (corresponding to human exon 9) closely models the human SRP ciliopathy phenotype, including a small rib cage and polydactyly, as well as lung anomalies.<sup>17</sup> Interestingly, the c.1815G>A variation identified in families 2–4 leads to the deletion of human exon 14, corresponding to mouse exon 12 (Figure S2), which has been shown to be essential for the function of the protein.<sup>9,10</sup> Indeed, *Talpid3*<sup>-/-</sup> mice in which exons 11 and 12 are constitutively deleted show abnormal Shh signaling and embryonic lethality as early as embryonic day 10.5. The c.230C>G (p.Ser77\*) nonsense variation of family 1 leads to NMD of exon-2-containing transcripts shown to be expressed early in human embryos and throughout fetal development.

Finally, ciliogenesis was severely impaired in *KIAA0586* mutant cells, and the SHH signaling pathway was abnormal, characteristic of other severe human ciliopathies, such as Mohr-Majewski or hydrolethalus syndromes, associated with *TCTN3* and *KIF7* variations,<sup>2,6</sup> respectively, or Meckel syndrome.

Overall, these results highlight the conserved function of *KIAA0586* among species and its involvement in human ciliopathies. In view of the wide phenotypic spectrum of ciliopathy genes, the lethal phenotype reported here might represent the severe end of the phenotypic spectrum associated with *KIAA0586* variations.

#### Supplemental Data

Supplemental Data include case reports, three figures, and two tables and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.06.003>.

#### Acknowledgments

We thank the families for their participation. We also thank Leila Hakkakian, Judite De Oliveira, and Nadège Gigot for technical assistance and Prof. Andrew Green for referral of affected subjects, and we are grateful to the French Society of Fetal Pathology for participating in the study. This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR; 2010 fetal ciliopathies grant BLAN-1122-01 and 2013 cilia, axonal guidance, and corpus callosum grant ANR-13-BSV1-0027 to T.A.B.). C.A. is funded by the Fondation pour la Recherche Médicale and K.P. by grants from ANR. The Institut Imagine is supported by an ANR grant (ANR-A0-IAHU-01).

Received: March 13, 2015

Accepted: June 8, 2015

Published: July 9, 2015

#### Web Resources

The URLs for data presented herein are as follows:

Broad Institute GATK Best Practices, <https://www.broadinstitute.org/gatk/guide/best-practices>

ClustalW2, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

Human *Splicing* Finder, <http://www.umd.be/HSF/>

MaxEntScan, [http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan\\_scoresseq\\_acc.html](http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoresseq_acc.html)

MultAlin, <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>

OMIM, <http://www.omim.org/>

PolyPhen-2, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>

Primer3Plus, <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>

SIFT, <http://sift.bii.a-star.edu.sg/>

Splice Site Prediction by Neural Network (NNSPLICE), [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)

UCSC Genome Browser, <http://genome.ucsc.edu>

#### References

- Huber, C., and Cormier-Daire, V. (2012). Ciliary disorder of the skeleton. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* *160C*, 165–174.
- Putoux, A., Thomas, S., Coene, K.L.M., Davis, E.E., Alanay, Y., Ogur, G., Uz, E., Buzas, D., Gomes, C., Patrier, S., et al. (2011). *KIF7* mutations cause fetal hydrolethalus and acrocallosal syndromes. *Nat. Genet.* *43*, 601–606.
- Baala, L., Romano, S., Khaddour, R., Saunier, S., Smith, U.M., Audollent, S., Ozilou, C., Faivre, L., Laurent, N., Foliguet, B., et al. (2007). The Meckel-Gruber syndrome gene, *MKS3*, is mutated in Joubert syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* *80*, 186–194.
- Delous, M., Baala, L., Salomon, R., Laclef, C., Vierkotten, J., Tory, K., Golzio, C., Lacoste, T., Besse, L., Ozilou, C., et al. (2007). The ciliary gene *RPGRIP1L* is mutated in cerebello-oculo-renal syndrome (Joubert syndrome type B) and Meckel syndrome. *Nat. Genet.* *39*, 875–881.
- Valente, E.M., Logan, C.V., Mougou-Zerelli, S., Lee, J.H., Silhavy, J.L., Brancati, F., Iannicelli, M., Travaglini, L., Romani, S., Illi, B., et al. (2010). Mutations in *TMEM216* perturb ciliogenesis and cause Joubert, Meckel and related syndromes. *Nat. Genet.* *42*, 619–625.
- Thomas, S., Legendre, M., Saunier, S., Bessières, B., Alby, C., Bonnière, M., Toutain, A., Loeuillet, L., Szymanska, K., Jossic, E., et al. (2012). *TCTN3* mutations cause Mohr-Majewski syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* *91*, 372–378.
- Failler, M., Gee, H.Y., Krug, P., Joo, K., Halbritter, J., Belkacem, L., Filhol, E., Porath, J.D., Braun, D.A., Schueler, M., et al. (2014). Mutations of *CEP83* cause infantile nephronophthisis and intellectual disability. *Am. J. Hum. Genet.* *94*, 905–914.
- Davey, M.G., Paton, I.R., Yin, Y., Schmidt, M., Bangs, F.K., Morrice, D.R., Smith, T.G., Buxton, P., Stamatakis, D., Tanaka, M., et al. (2006). The chicken *talpid3* gene encodes a novel protein essential for Hedgehog signaling. *Genes Dev.* *20*, 1365–1377.
- Yin, Y., Bangs, F., Paton, I.R., Prescott, A., James, J., Davey, M.G., Whitley, P., Genikhovich, G., Technau, U., Burt, D.W., and Tickle, C. (2009). The *Talpid3* gene (*KIAA0586*) encodes a centrosomal protein that is essential for primary cilia formation. *Development* *136*, 655–664.
- Bangs, F., Antonio, N., Thongnuek, P., Welten, M., Davey, M.G., Briscoe, J., and Tickle, C. (2011). Generation of mice with functional inactivation of *talpid3*, a gene first identified in chicken. *Development* *138*, 3261–3272.
- Ben, J., Elworthy, S., Ng, A.S.M., van Eeden, E., and Ingham, P.W. (2011). Targeted mutation of the *talpid3* gene in zebrafish reveals its conserved requirement for ciliogenesis and Hedgehog signalling across the vertebrates. *Development* *138*, 4969–4978.



12. Genin, E., Tullio-Pelet, A., Begeot, F., Lyonnet, S., and Abel, L. (2004). Estimating the age of rare disease mutations: the example of Triple-A syndrome. *J. Med. Genet.* *41*, 445–449.
13. Picard, C., Fieschi, C., Altare, F., Al-Jumaah, S., Al-Hajjar, S., Feinberg, J., Dupuis, S., Soudais, C., Al-Mohsen, I.Z., Génin, E., et al. (2002). Inherited interleukin-12 deficiency: IL12B genotype and clinical phenotype of 13 patients from six kindreds. *Am. J. Hum. Genet.* *70*, 336–348.
14. Kobayashi, T., Kim, S., Lin, Y.-C., Inoue, T., and Dynlacht, B.D. (2014). The CP110-interacting proteins Talpid3 and Cep290 play overlapping and distinct roles in cilia assembly. *J. Cell Biol.* *204*, 215–229.
15. Tsang, W.Y., and Dynlacht, B.D. (2013). CP110 and its network of partners coordinately regulate cilia assembly. *Cilia* *2*, 9.
16. Tanos, B.E., Yang, H.-J., Soni, R., Wang, W.-J., Macaluso, F.P., Asara, J.M., and Tsou, M.-F.B. (2013). Centriole distal appendages promote membrane docking, leading to cilia initiation. *Genes Dev.* *27*, 163–168.
17. Davey, M.G., McTeir, L., Barrie, A.M., Freem, L.J., and Stephen, L.A. (2014). Loss of cilia causes embryonic lung hypoplasia, liver fibrosis, and cholestasis in the talpid3 ciliopathy mutant. *Organogenesis* *10*, 177–185.
18. El Hokayem, J., Huber, C., Couvé, A., Aziza, J., Baujat, G., Bouvier, R., Cavalcanti, D.P., Collins, F.A., Cordier, M.-P., Delezoide, A.-L., et al. (2012). NEK1 and DYNC2H1 are both involved in short rib polydactyly Majewski type but not in Beemer Langer cases. *J. Med. Genet.* *49*, 227–233.
19. Schmidts, M. (2014). Clinical genetics and pathobiology of ciliary chondrodysplasias. *J. Pediatr. Genet.* *3*, 46–94.

The American Journal of Human Genetics

Supplemental Data

**Mutations in *KIAA0586* Cause Lethal Ciliopathies  
Ranging from a Hydrolethalmus Phenotype  
to Short-Rib Polydactyly Syndrome**

Caroline Alby, Kevin Piquand, Céline Huber, André Megarbané, Amale Ichkou, Marine Legendre, Fanny Pelluard, Ferehté Encha-Ravazi, Georges Abi-Tayeh, Bettina Bessières, Salima El Chehadeh-Djebbar, Nicole Laurent, Laurence Faivre, László Sztriha, Melinda Zombor, Hajnalka Szabó, Marion Failler, Meriem Garfa-Traore, Christine Bole, Patrick Nitschké, Mathilde Nizon, Nadia Elkhartoufi, Françoise Clerget-Darpoux, Arnold Munnich, Stanislas Lyonnet, Michel Vekemans, Sophie Saunier, Valérie Cormier-Daire, Tania Attié-Bitach, and Sophie Thomas

**Supplemental Note: Case reports**

For all the families, chromosomal analysis showed a normal karyotype. There was no history of intrauterine infection or exposure to drugs or toxic agents. In all fetuses in this study, pregnancies were terminated after genetic counseling, in accordance with local legislation.

**Family 1 :**

The parents are first cousins, from Lebanon. The mother had four early spontaneous abortions before 10 weeks. **Case II :1** was a female born at term who deceased a few hours after birth. The phenotype of this little girl is sparsely documented with a cleft and polydactyly described. **Case II :2** was another spontaneous abortion at 15 gestational weeks. Combined data of ultrasound and macroscopical examination found a polymalformative syndrome including severe hydrocephaly, medial cleft palate, post axial polydactyly of the four limbs, right diaphragmatic hernia and an absence of clavicle bone without more informations about other skeletal abnormalities. **Case II :3** The pregnancy was terminated at 15 gestational weeks. The fetus had a hydrops on prenatal ultrasound, a hydrocephaly with an occipital bone defect, a medial cleft palate, pre axial polydactyly of four limbs and polysyndactyly of the hands, and a flat and wide iliac wing on X rays.

**Family 2 :**

The parents are distant relatives, from Romania. **Case II :1** was born at term and healthy. **Case II :2** is a fetus terminated at 29 gestational weeks.

Prenatal ultrasound imaging found a hydramnios, with micromelia and short ribs/small thorax ; hydrocephaly with vermian hypoplasia and partial posterior agenesis of corpus callosum. Macroscopical examination showed dysmorphism, medial cleft palate with multiple frenulae and tongue hamartomas, narrow thorax with lung hypoplasia, pre axial polysyndactylies of the feet and postaxial polydactyly of

the hands. X rays confirmed short ribs, long bones with round femoral ends. Neuropathological examination showed olfactory bulbs agenesis, vermian hypoplasia and pre rolandic polymicrogyria. **Case II :3** is a 39 gestational weeks new born who died an hour after birth. Prenatal imaging at 22 gestational weeks showed a hydramnios, short ribs, micromelia, vermis hypoplasia, mega cisterna magna with abnormal cortical gyration pattern. The parents had decided to continue pregnancy.

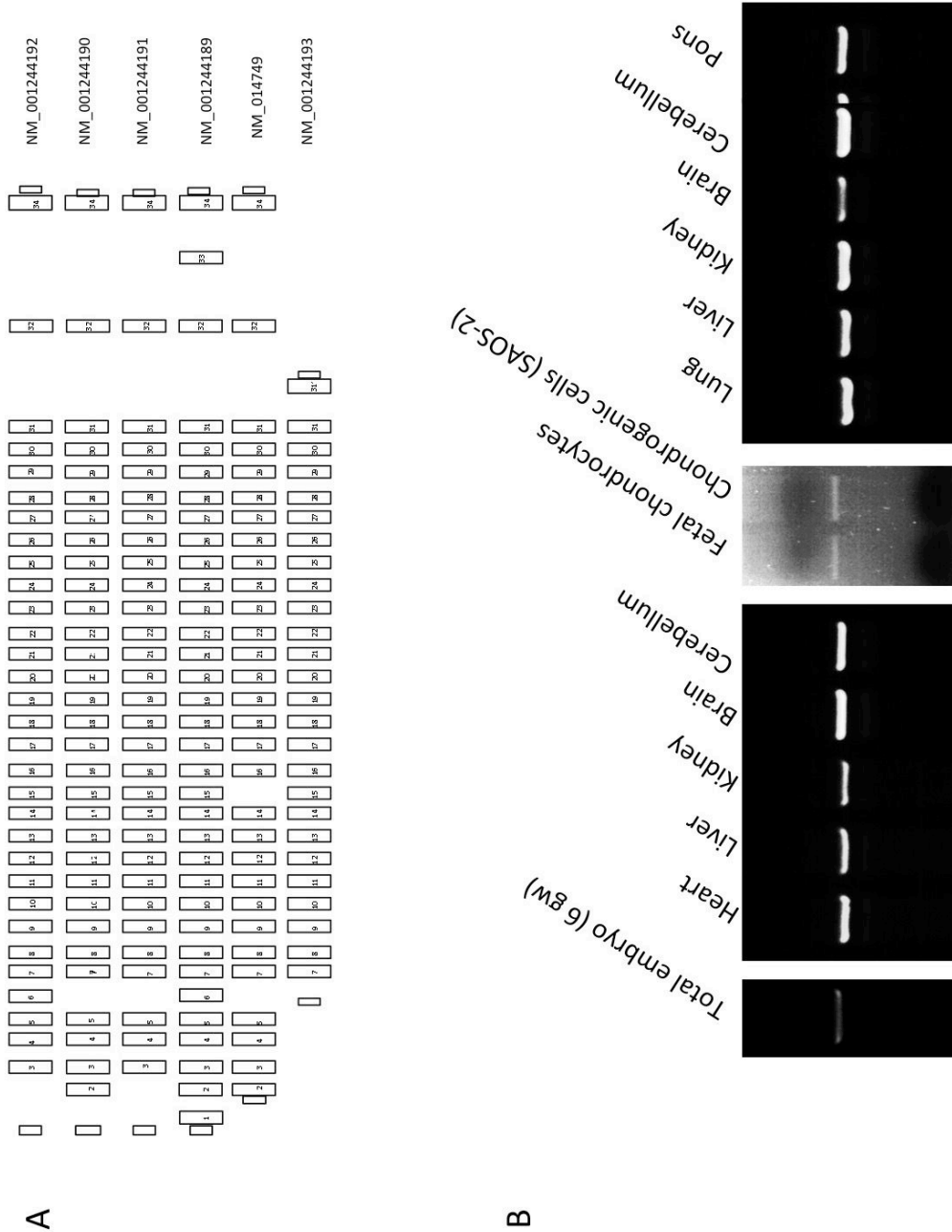
**Family 3 :**

The parents are unknown to be related, from Hungary. **Case II :1** was a spontaneous abortion before 10 gestational weeks in a context of anencephaly. Prenatal ultrasound screening was not performed. **Case II :2** was a girl born at 35 gestational weeks who died at one year. Pregnancy was marked by a polyhydramnios. The newborn required mechanical ventilation from birth to death. The chest was small and narrow, the arms and legs were short. Postaxial polydactyly was observed on both hands (the sixth fingers were removed at the age of two weeks) and left hallux was duplicated. The patient had low set ears, depressed nasal bridge and short neck. The upper lip was short and bound down by multiple small frenulae, the gums were hypoplastic. At one year of age, there were no teeth. She was unresponsive to visual stimuli. Small optic disk and retina coloboma were seen on both sides. There was no response to acoustic stimuli and brainstem auditory evoked potential (BAEP) test did not show any recognizable waves. Generalized hypotonia, lack of spontaneous movements and reduced deep tendon reflexes were observed. Brain magnetic resonance imaging performed at 6 months old showed a micro-brain with large ventricles and large subarachnoid spaces and reduced white matter volume, corpus callosum, hippocampi, pons, cerebellar (vermis) and medulla hypoplasia with large fourth ventricle and cisterna magna, a « molar tooth aspect » on axial slices (Figure 2). There was a small occipital meningocele near the craniocervical junction. Chest X-ray showed narrow elongated thorax with short ribs. Radiographic studies of the bones confirmed short

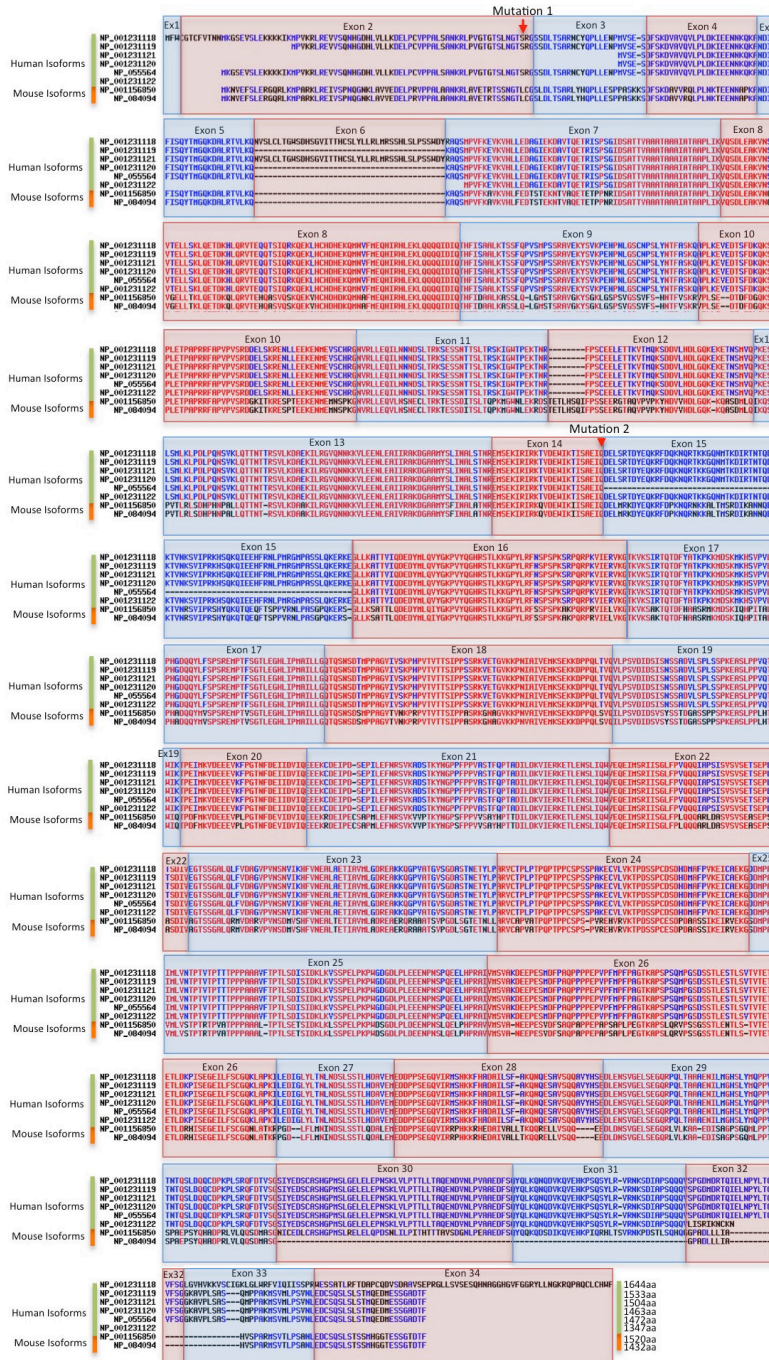
long bones. Cardiac ultrasound revealed an atrial septal defect. Kidney and liver function tests were normal. The patient died at the age of 13 months.

**Family 4 :**

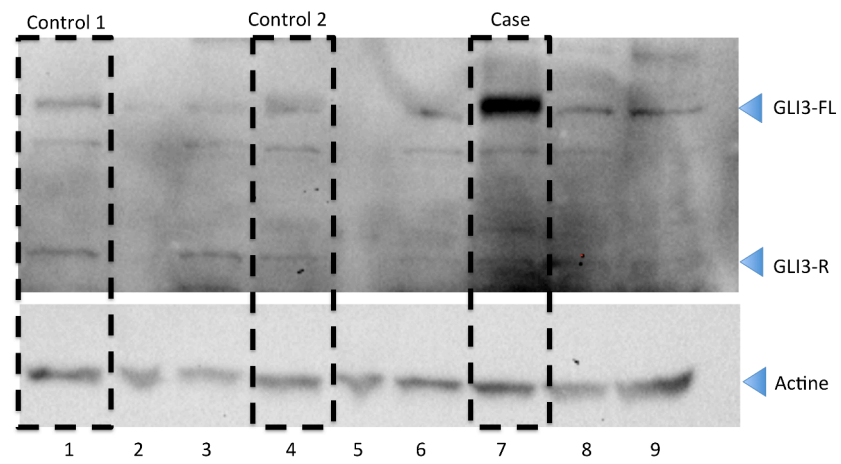
The parents are distantly related from Kosovo. **Case II :4** was born at term who died at one day of life and had a phenotype described as identical to his sib II :5. **Case II :5** is a fetus terminated at 26 gestational weeks. Autopsy showed dysmorphism, medial cleft palate, lingual hamartomas, occipital keyhole defect, narrow thorax and lung hypoplasia, pre axial polydactyly of right foot, post axial polydactyly of left foot, postaxial polydactyly and brachyphalangy of the hands and micropenis; X rays showed micromelia with round femoral ends and curved forearm bones and short ribs. Neuropathological examination showed corpus callosum agenesis with Probst bundles, vermian hypoplasia with a « molar tooth aspect », temporal polymicrogyria and a retinal coloboma.



**Figure S1: *KIAA0586* gene structure and expression in embryonic, fetal and adult control tissues.** (1) *KIAA0586* transcript isoforms, NM\_001244189 being the longest one comprising 34 exons including exon 2. (2) RT-PCR amplification of *KIAA0586* exon 2 containing transcripts in human embryonic, fetal and adult tissues.



**Figure S2: Alignment of human and mouse KIAA0586 protein sequences.** The six human isoforms NP\_001231118, NP\_001231119, NP\_001231121, NP\_001231120, NP\_055564 AND NP\_001231122 correspond respectively to NM\_001244189 Isoform 1, NM\_001244190 Isoform 2, NM\_001244191 Isoform 3, NM\_001244192 Isoform 4, NM\_001244193 Isoform 5 and NM\_001244194 Isoform 6) and the two mouse protein sequences NP\_001156850 and NP\_084094 correspond to NM\_001163378 Isoform 1 and NM\_029818 Isoform 2.



**Figure S3: Original immunoblot photograph after GLI3 antibody (R&D Systems AF3690) incubation.** Lanes 1, 4 and 7 corresponding to controls 1 & 2 and case II:2 from family 2 with very similar actin levels have been spliced together in figure 4B.



<b>Exome sequencing of ciliary genes</b>	Number of variations	Number of genes
Total variants called	6263	1306
Exonic and splice site variants	1875	687
With consequence (frameshift, splice site, non synonymous missense)	1120	504
Unknown (dbSNP; 1Kgenome; inhouse database)	31	30
Homozygous variations	1	1

**Table S1 : Filtering data of NGS sequencing of ciliary genes in family 1.**

<b>KIAA0586 genomic sequencing primers</b>	
KIAA0586-2F	CTTTGTGGATGTTTCGACATTTT
KIAA0586-2R	GGGTCAGTTTTCAAACATCTGTA
KIAA0586-14F	TTAGGATAGCAGGTTCACTACTAGA
KIAA0586-14R	AATGCCTGTAAATTGGAATCAA

<b>KIAA0586 RT-PCR primers</b>	
KIAA0586-RT-2F	GGAACATCACGTGGTTCATCA
KIAA0586-RT-7R	CATCCTTCTCTATGCCTGCA
KIAA0586-RT-13F	CGTGCAAAAGATGGAGCTGC
KIAA0586-RT-15R	TCTGTAAACTTGAAGCAGGCATG

<b>GLI1 and PTCH1 real time RT-PCR primers</b>	
GLI1-F	AGAGGGTGCCATGAAGCCAC
GLI1-R	AAGGTCCCTCGTCCAAGCTG
PTCH1-F	GCTACTTACTCATGCTCGCC
PTCH1-R	TCCGATCAATGAGCACAGGC

**Table S2: Primers used for *KIAA0586* genomic sequencing and RT-PCR and for *PTCH1* and *GLI1* real time RT-PCR.**

## BIBLIOGRAPHIE

1. Witelson SF. Hand and sex differences in the isthmus and genu of the human corpus callosum. A postmortem morphological study. *Brain J Neurol.* 1989 Jun;112 ( Pt 3):799–835.
2. Raybaud C. The corpus callosum, the other great forebrain commissures, and the septum pellucidum: anatomy, development, and malformation. *Neuroradiology.* 2010 Jun;52(6):447–77.
3. Hetts SW, Sherr EH, Chao S, Gobuty S, Barkovich AJ. Anomalies of the Corpus Callosum: An MR Analysis of the Phenotypic Spectrum of Associated Malformations. *Am J Roentgenol.* 2006 Nov 1;187(5):1343–8.
4. Basser PJ, Pajevic S, Pierpaoli C, Duda J, Aldroubi A. In vivo fiber tractography using DT-MRI data. *Magn Reson Med.* 2000 Oct;44(4):625–32.
5. Chao Y-P, Cho K-H, Yeh C-H, Chou K-H, Chen J-H, Lin C-P. Probabilistic topography of human corpus callosum using cytoarchitectural parcellation and high angular resolution diffusion imaging tractography. *Hum Brain Mapp.* 2009 Oct 1;30(10):3172–87.
6. De Sousa A. Towards An Integrative Theory Of Consciousness: Part 1 (Neurobiological And Cognitive Models). *Mens Sana Monogr.* 2013;11(1):100–50.
7. Tovar-Moll F, Moll J, Oliveira-Souza R de, Bramati I, Andreiuolo PA, Lent R. Neuroplasticity in Human Callosal Dysgenesis: A Diffusion Tensor Imaging Study. *Cereb Cortex.* 2007 Mar 1;17(3):531–41.
8. Just MA, Cherkassky VL, Keller TA, Kana RK, Minshew NJ. Functional and Anatomical Cortical Underconnectivity in Autism: Evidence from an fMRI Study of an Executive Function Task and Corpus Callosum Morphometry. *Cereb Cortex.* 2007 Apr 1;17(4):951–61.
9. Suárez R, Gobius I, Richards LJ. Evolution and development of interhemispheric connections in the vertebrate forebrain. *Front Hum Neurosci [Internet].* 2014 Jul 14 [cited 2015 Jun 18];8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4094842/>
10. Nadarajah B, Parnavelas JG. Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci.* 2002 Jun;3(6):423–32.
11. Alcamo EA, Chirivella L, Dautzenberg M, Dobreva G, Fariñas I, Grosschedl R, et al. *Satb2* Regulates Callosal Projection Neuron Identity in the Developing Cerebral Cortex. *Neuron.* 2008 Feb 7;57(3):364–77.
12. Rakic P, Yakovlev PI. Development of the corpus callosum and cavum septi in man. *J Comp Neurol.* 1968 Jan;132(1):45–72.

13. Silver J, Lorenz SE, Wahlsten D, Coughlin J. Axonal guidance during development of the great cerebral commissures: Descriptive and experimental studies, in vivo, on the role of preformed glial pathways. *J Comp Neurol*. 1982 Sep 1;210(1):10–29.
14. Lent R, Uziel D, Baudrimont M, Fallet C. Cellular and molecular tunnels surrounding the forebrain commissures of human fetuses. *J Comp Neurol*. 2005 Mar 21;483(4):375–82.
15. Hankin MH, Silver J. Mechanisms of axonal guidance. The problem of intersecting fiber systems. *Dev Biol N Y N* 1985. 1986;2:565–604.
16. Livy D j., Wahlsten D. Retarded formation of the hippocampal commissure in embryos from mouse strains lacking a corpus callosum. *Hippocampus*. 1997 Jan 1;7(1):2–14.
17. Hayashi K, Kubo K, Kitazawa A, Nakajima K. Cellular dynamics of neuronal migration in the hippocampus. *Neurogenesis*. 2015;9:135.
18. Katz MJ, Lasek RJ, Silver J. Ontophyletics of the nervous system: development of the corpus callosum and evolution of axon tracts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983 Oct;80(19):5936–40.
19. Sotiriadis A, Makrydimas G. Neurodevelopment after prenatal diagnosis of isolated agenesis of the corpus callosum: an integrative review. *Am J Obstet Gynecol*. 2012 Apr;206(4):337.e1–5.
20. Riley EP, Mattson SN, Sowell ER, Jernigan TL, Sobel DF, Jones KL. Abnormalities of the corpus callosum in children prenatally exposed to alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*. 1995 Oct;19(5):1198–202.
21. Mehta NM, Hartnoll G. Congenital CMV with callosal lipoma and agenesis. *Pediatr Neurol*. 2001 Mar;24(3):222–4.
22. Hawrylycz MJ, Lein ES, Guillozet-Bongaarts AL, Shen EH, Ng L, Miller JA, et al. An anatomically comprehensive atlas of the adult human brain transcriptome. *Nature*. 2012 Sep 20;489(7416):391–9.
23. Shen EH, Overly CC, Jones AR. The Allen Human Brain Atlas: Comprehensive gene expression mapping of the human brain. *Trends Neurosci*. 2012 Dec;35(12):711–4.
24. Schell-Apacik CC, Wagner K, Bihler M, Ertl-Wagner B, Heinrich U, Klopocki E, et al. Agenesis and dysgenesis of the corpus callosum: Clinical, genetic and neuroimaging findings in a series of 41 patients. *Am J Med Genet A*. 2008 Oct 1;146A(19):2501–11.
25. Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, Bigham AW, Tabor HK, Dent KM, et al. Exome sequencing identifies the cause of a Mendelian disorder. *Nat Genet*. 2010 Jan;42(1):30–5.
26. Ng SB, Turner EH, Robertson PD, Flygare SD, Bigham AW, Lee C, et al. Targeted Capture and Massively Parallel Sequencing of Twelve Human Exomes. *Nature*. 2009 Sep 10;461(7261):272–6.
27. Srivastava AK, Schwartz CE. Intellectual Disability and Autism Spectrum Disorders: Causal Genes and Molecular Mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014 Oct;46 Pt 2:161–74.

28. Lau YC, Hinkley LBN, Bukshpun P, Strominger ZA, Wakahiro MLJ, Baron-Cohen S, et al. Autism traits in individuals with agenesis of the corpus callosum. *J Autism Dev Disord.* 2013 May;43(5):1106–18.
29. Siffredi V, Anderson V, Leventer RJ, Spencer-Smith MM. Neuropsychological Profile of Agenesis of the Corpus Callosum: A Systematic Review. *Dev Neuropsychol.* 2013 Jan 1;38(1):36–57.
30. Lefebvre A, Beggiano A, Bourgeron T, Toro R. Neuroanatomical Diversity of Corpus Callosum and Brain Volume in Autism: Meta-analysis, Analysis of the Autism Brain Imaging Data Exchange Project, and Simulation. *Biol Psychiatry.* 2015 Jul 15;78(2):126–34.
31. Rouleau C, Gasner A, Bigi N, Couture A, Perez MJ, Blanchet P, et al. Prevalence and timing of pregnancy termination for brain malformations. *Arch Dis Child - Fetal Neonatal Ed.* 2011 Sep 1;96(5):F360–4.
32. Moutard M-L, Kieffer V, Feingold J, Kieffer F, Lewin F, Adamsbaum C, et al. Agenesis of corpus callosum: prenatal diagnosis and prognosis. *Childs Nerv Syst ChNS Off J Int Soc Pediatr Neurosurg.* 2003 Aug;19(7-8):471–6.
33. Santo S, D'Antonio F, Homfray T, Rich P, Pilu G, Bhide A, et al. Counseling in fetal medicine: agenesis of the corpus callosum. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2012 Nov 1;40(5):513–21.
34. Benadiba C, Magnani D, Niquille M, Morlé L, Valloton D, Nawabi H, et al. The ciliogenic transcription factor RFX3 regulates early midline distribution of guidepost neurons required for corpus callosum development. *PLoS Genet.* 2012;8(3):e1002606.
35. Laclef C, Anselme I, Besse L, Catala M, Palmyre A, Baas D, et al. The role of primary cilia in corpus callosum formation is mediated by production of the GLI3 repressor. *Hum Mol Genet.* 2015 Jun 12;ddv221.
36. Ishikawa H, Marshall WF. Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011 Apr;12(4):222–34.
37. Haycraft CJ, Schafer JC, Zhang Q, Taulman PD, Yoder BK. Identification of CHE-13, a novel intraflagellar transport protein required for cilia formation. *Exp Cell Res.* 2003 Apr 1;284(2):249–61.
38. Iomini C, Li L, Esparza JM, Dutcher SK. Retrograde Intraflagellar Transport Mutants Identify Complex A Proteins With Multiple Genetic Interactions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics.* 2009 Nov;183(3):885–96.
39. Piperno G, Siuda E, Henderson S, Segil M, Vaananen H, Sassaroli M. Distinct Mutants of Retrograde Intraflagellar Transport (IFT) Share Similar Morphological and Molecular Defects. *J Cell Biol.* 1998 Dec 14;143(6):1591–601.
40. Kim S, Dynlacht BD. Assembling a primary cilium. *Curr Opin Cell Biol.* 2013 Aug;25(4):506–11.
41. Schmidt KN, Kuhns S, Neuner A, Hub B, Zentgraf H, Pereira G. Cep164 mediates vesicular docking to the mother centriole during early steps of ciliogenesis. *J Cell Biol.* 2012 Dec 24;199(7):1083–101.

42. Nachury MV, Loktev AV, Zhang Q, Westlake CJ, Peränen J, Merdes A, et al. A Core Complex of BBS Proteins Cooperates with the GTPase Rab8 to Promote Ciliary Membrane Biogenesis. *Cell*. 2007 Jun 15;129(6):1201–13.
43. Kim J, Krishnaswami SR, Gleeson JG. CEP290 interacts with the centriolar satellite component PCM-1 and is required for Rab8 localization to the primary cilium. *Hum Mol Genet*. 2008 Dec 1;17(23):3796–805.
44. Tsang WY, Bossard C, Khanna H, Peränen J, Swaroop A, Malhotra V, et al. CP110 suppresses primary cilia formation through its interaction with CEP290, a protein deficient in human ciliary disease. *Dev Cell*. 2008 Aug;15(2):187–97.
45. Kobayashi T, Kim S, Lin Y-C, Inoue T, Dynlacht BD. The CP110-interacting proteins Talpid3 and Cep290 play overlapping and distinct roles in cilia assembly. *J Cell Biol*. 2014 Jan 20;204(2):215–29.
46. Goetz SC, Anderson KV. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat Rev Genet*. 2010 May;11(5):331–44.
47. Ingham PW, Placzek M. Orchestrating ontogenesis: variations on a theme by sonic hedgehog. *Nat Rev Genet*. 2006 Nov;7(11):841–50.
48. Wang C, Rütter U, Wang B. The Shh-independent activator function of the full-length Gli3 protein and its role in vertebrate limb digit patterning. *Dev Biol*. 2007 May 15;305(2):460–9.
49. Malik S. Polydactyly: phenotypes, genetics and classification. *Clin Genet*. 2014 Mar;85(3):203–12.
50. Huangfu D, Liu A, Rakeman AS, Murcia NS, Niswander L, Anderson KV. Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature*. 2003 Nov 6;426(6962):83–7.
51. Yin Y, Bangs F, Paton IR, Prescott A, James J, Davey MG, et al. The Talpid3 gene (KIAA0586) encodes a centrosomal protein that is essential for primary cilia formation. *Dev Camb Engl*. 2009 Feb;136(4):655–64.
52. Rohatgi R, Milenkovic L, Scott MP. Patched1 Regulates Hedgehog Signaling at the Primary Cilium. *Science*. 2007 Jul 20;317(5836):372–6.
53. Corbit KC, Aanstad P, Singla V, Norman AR, Stainier DYR, Reiter JF. Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature*. 2005 Oct 13;437(7061):1018–21.
54. Gerdes JM, Katsanis N. Chapter 7 Ciliary Function and Wnt Signal Modulation. In: Yoder BK, editor. *Current Topics in Developmental Biology* [Internet]. Academic Press; 2008 [cited 2015 Jul 16]. p. 175–95. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0070215308008077>
55. Early development of polycystic kidney disease in transgenic mice expressing an activated mutant of the  $\beta$ -catenin gene. *Publ Online* 21 Sept 2001 Doi101038sjonc1204825 [Internet]. 2001 Sep 21 [cited 2015 Jul 29];20(42). Available from: <http://www.nature.com.gate2.inist.fr/onc/journal/v20/n42/full/1204825a.html>

56. Cao Y, Park A, Sun Z. Intraflagellar Transport Proteins Are Essential for Cilia Formation and for Planar Cell Polarity. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2010 Aug;21(8):1326–33.
57. Kitajima K, Oki S, Ohkawa Y, Sumi T, Meno C. Wnt signaling regulates left–right axis formation in the node of mouse embryos. *Dev Biol*. 2013 Aug 15;380(2):222–32.
58. Huber C, Cormier-Daire V. Ciliary disorder of the skeleton. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2012 Aug 15;160C(3):165–74.
59. Gorlin RJ. Oro-facial-digital syndrome. *Arch Otolaryngol Chic Ill* 1960. 1969 Jul;90(1):115–6.
60. Ferrante MI, Giorgio G, Feather SA, Bulfone A, Wright V, Ghiani M, et al. Identification of the gene for oral-facial-digital type I syndrome. *Am J Hum Genet*. 2001 Mar;68(3):569–76.
61. Odent S, Le Marec B, Toutain A, David A, Vigneron J, Tréguier C, et al. Central nervous system malformations and early end-stage renal disease in oro-facio-digital syndrome type I: a review. *Am J Med Genet*. 1998 Feb 3;75(4):389–94.
62. Wettke-Schäfer R, Kantner G. X-linked dominant inherited diseases with lethality in hemizygous males. *Hum Genet*. 1983;64(1):1–23.
63. Doege T, Thuline H, Priest J, Norby D, Bryant J. STUDIES OF A FAMILY WITH THE ORAL-FACIAL-DIGITAL SYNDROME. *N Engl J Med*. 1964 Nov 19;271:1073–8.
64. Connacher AA, Forsyth CC, Stewart WK. Orofaciodigital syndrome type I associated with polycystic kidneys and agenesis of the corpus callosum. *J Med Genet*. 1987 Feb;24(2):116–8.
65. Donnai D, Kerzin-Storarr L, Harris R. Familial orofacioidigital syndrome type I presenting as adult polycystic kidney disease. *J Med Genet*. 1987 Feb;24(2):84–7.
66. Petit P, Papillon Leage E, Psaume J. [BUCCO-DIGITO-FACIAL DYSPLASIA]. *Ann Chir Infant*. 1964 Jun;5:143–50.
67. Fuhrmann W, Stahl A. [The differential diagnosis of Papillon-Léngé-Psaume-syndrome and Mohr's syndrome]. *Humangenetik*. 1970;9(1):54–63.
68. Feather SA, Woolf AS, Donnai D, Malcolm S, Winter RM. The oral-facial-digital syndrome type 1 (OFD1), a cause of polycystic kidney disease and associated malformations, maps to Xp22.2-Xp22.3. *Hum Mol Genet*. 1997 Jul;6(7):1163–7.
69. Thauvin-Robinet C, Cossée M, Cormier-Daire V, Van Maldergem L, Toutain A, Alembik Y, et al. Clinical, molecular, and genotype-phenotype correlation studies from 25 cases of oral-facial-digital syndrome type 1: a French and Belgian collaborative study. *J Med Genet*. 2006 Jan;43(1):54–61.
70. Thauvin-Robinet C, Lee JS, Lopez E, Herranz-Pérez V, Shida T, Franco B, et al. The oral-facial-digital syndrome gene C2CD3 encodes a positive regulator of centriole elongation. *Nat Genet*. 2014 Aug;46(8):905–11.

71. Tang Z, Lin MG, Stowe TR, Chen S, Zhu M, Stearns T, et al. Autophagy Promotes Primary Ciliogenesis by Removing OFD1 from Centriolar Satellites. *Nature*. 2013 Oct 10;502(7470):254–7.
72. Szymanska K, Hartill VL, Johnson CA. Unraveling the genetics of Joubert and Meckel-Gruber syndromes. *J Pediatr Genet*. 2014 Nov 5;3(2):65–78.
73. Maria BL, Boltshauser E, Palmer SC, Tran TX. Clinical Features and Revised Diagnostic Criteria in Joubert Syndrome. *J Child Neurol*. 1999 Sep 1;14(9):583–90.
74. Maria BL, Quisling RG, Rosainz LC, Yachnis AT, Gitten J, Dede D, et al. Molar Tooth Sign in Joubert Syndrome: Clinical, Radiologic, and Pathologic Significance. *J Child Neurol*. 1999 Jun 1;14(6):368–76.
75. Romani M, Micalizzi A, Valente EM. Joubert syndrome: congenital cerebellar ataxia with the “molar tooth.” *Lancet Neurol* [Internet]. 2013 Sep [cited 2015 Jul 30];12(9). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3809058/>
76. Yachnis AT, Rorke LB. Neuropathology of Joubert Syndrome. *J Child Neurol*. 1999 Oct 1;14(10):655–9.
77. Poretti A, Boltshauser E, Loenneker T, Valente EM, Brancati F, Il'Yasov K, et al. Diffusion Tensor Imaging in Joubert Syndrome. *Am J Neuroradiol*. 2007 Nov 1;28(10):1929–33.
78. Brancati F, Dallapiccola B, Valente EM. Joubert Syndrome and related disorders. *Orphanet J Rare Dis*. 2010 Jul 8;5:20.
79. Parisi M, Glass I. Joubert Syndrome and Related Disorders. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJ, et al., editors. *GeneReviews*(®) [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cited 2015 Jul 30]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1325/>
80. Salonen R, Paavola P. Meckel syndrome. *J Med Genet*. 1998 Jun;35(6):497–501.
81. Salonen R, Opitz JM, Reynolds JF. The Meckel syndrome: Clinicopathological findings in 67 patients. *Am J Med Genet*. 1984 Aug 1;18(4):671–89.
82. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, 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 May 14;86(5):749–64.
83. Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, Rosenfeld JA, Vu T, Baker C, et al. A Copy Number Variation Morbidity Map of Developmental Delay. *Nat Genet*. 2011 Aug 14;43(9):838–46.
84. Metzker ML. Emerging technologies in DNA sequencing. *Genome Res*. 2005 Dec 1;15(12):1767–76.
85. Fedurco M, Romieu A, Williams S, Lawrence I, Turcatti G. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(3):e22.



86. Mardis ER. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2008;9(1):387–402.
87. Gnirke A, Melnikov A, Maguire J, Rogov P, LeProust EM, Brockman W, et al. Solution Hybrid Selection with Ultra-long Oligonucleotides for Massively Parallel Targeted Sequencing. *Nat Biotechnol.* 2009 Feb;27(2):182–9.
88. Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, del Angel G, Levy-Moonshine A, et al. From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinforma Ed Board Andreas Baxevanis Al.* 2013 Oct 15;11(1110):11.10.1–11.10.33.
89. Genin E, Tullio-Pelet A, Begeot F, Lyonnet S, Abel L. Estimating the age of rare disease mutations: the example of Triple-A syndrome. *J Med Genet.* 2004 Jun;41(6):445–9.
90. Mangione R, Fries N, Godard P, Capron C, Mirlesse V, Lacombe D, et al. Neurodevelopmental outcome following prenatal diagnosis of an isolated anomaly of the corpus callosum. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol.* 2011 Mar;37(3):290–5.
91. Chen JK, Taipale J, Young KE, Maiti T, Beachy PA. Small molecule modulation of Smoothed activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Oct 29;99(22):14071–6.
92. Bachmann-Gagescu R, Phelps IG, Dempsey JC, Sharma VA, Ishak GE, Boyle EA, et al. KIAA0586 is Mutated in Joubert Syndrome. *Hum Mutat.* 2015 Jun 11;
93. Roosing S, Hofree M, Kim S, Scott E, Copeland B, Romani M, et al. Functional genome-wide siRNA screen identifies KIAA0586 as mutated in Joubert syndrome. *eLife [Internet].* [cited 2015 Jul 7];4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4477441/>
94. Cordeddu V, Redeker B, Stellacci E, Jongejan A, Fragale A, Bradley TEJ, et al. Mutations in ZBTB20 cause Primrose syndrome. *Nat Genet.* 2014 Aug;46(8):815–7.
95. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med.* 2015 Jun 25;372(26):2481–98.
96. Delvaux V, Moerman P, Fryns JP. Diaphragmatic hernia in the Coffin-Siris syndrome. *Genet Couns Geneva Switz.* 1998;9(1):45–50.
97. Kosho T, Miyake N, Carey JC. Coffin–Siris syndrome and related disorders involving components of the BAF (mSWI/SNF) complex: Historical review and recent advances using next generation sequencing. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2014 Sep 1;166(3):241–51.
98. Santen GWE, Aten E, Vulto-van Silfhout AT, Pottinger C, van Bon BWM, van Minderhout IJHM, et al. Coffin–Siris Syndrome and the BAF Complex: Genotype–Phenotype Study in 63 Patients. *Hum Mutat.* 2013 Nov 1;34(11):1519–28.
99. The Deciphering Developmental Disorders Study, The Deciphering Developmental Disorders Study. Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders. *Nature.* 2014 Dec 24;

100. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes [Internet]. [cited 2015 Jul 30]. Available from:  
<http://www.sciencemag.org.gate2.inist.fr/content/175/4023/720.abstract>
101. Marchesi VT, Steers E. Selective solubilization of a protein component of the red cell membrane. *Science*. 1968 Jan 12;159(3811):203–4.
102. Tohyama J, Nakashima M, Nabatame S, Gaik-Siew C 'ng, Miyata R, Rener-Primec Z, et al. SPTAN1 encephalopathy: distinct phenotypes and genotypes. *J Hum Genet*. 2015 Apr;60(4):167–73.
103. Perkins EM, Clarkson YL, Sabatier N, Longhurst DM, Millward CP, Jack J, et al. Loss of  $\beta$ -III spectrin leads to Purkinje cell dysfunction recapitulating the behaviour and neuropathology of SCA5 in humans. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2010 Apr 7;30(14):4857–67.
104. Stankewich MC, Cianci CD, Stabach PR, Ji L, Nath A, Morrow JS. Cell organization, growth, and neural and cardiac development require  $\alpha$ II-spectrin. *J Cell Sci*. 2011 Dec 1;124(23):3956–66.
105. Tsai V, Parker WE, Orlova KA, Baybis M, Chi AWS, Berg BD, et al. Fetal Brain mTOR Signaling Activation in Tuberous Sclerosis Complex. *Cereb Cortex N Y NY*. 2014 Feb;24(2):315–27.
106. Busquets-Garcia A, Gomis-González M, Guegan T, Agustín-Pavón C, Pastor A, Mato S, et al. Targeting the endocannabinoid system in the treatment of fragile X syndrome. *Nat Med*. 2013 May;19(5):603–7.
107. Sato A, Kasai S, Kobayashi T, Takamatsu Y, Hino O, Ikeda K, et al. Rapamycin reverses impaired social interaction in mouse models of tuberous sclerosis complex. *Nat Commun*. 2012 Dec 18;3:1292.
108. Tsai PT, Hull C, Chu Y, Greene-Colozzi E, Sadowski AR, Leech JM, et al. Autistic-like behavior and cerebellar dysfunction in Purkinje cell Tsc1 mutant mice. *Nature*. 2012 Aug 30;488(7413):647–51.
109. Wang S, Livingston MJ, Su Y, Dong Z. Reciprocal regulation of cilia and autophagy via the MTOR and proteasome pathways. *Autophagy*. 2015 Apr 3;11(4):607–16.
110. Cloëtta D, Thomanetz V, Baranek C, Lustenberger RM, Lin S, Oliveri F, et al. Inactivation of mTORC1 in the developing brain causes microcephaly and affects gliogenesis. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2013 May 1;33(18):7799–810.
111. Chi H, Sarkisian MR, Rakic P, Flavell RA. Loss of mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 (MEKK4) results in enhanced apoptosis and defective neural tube development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Mar 8;102(10):3846–51.
112. Poirier K, Lebrun N, Broix L, Tian G, Saillour Y, Boscheron C, et al. Mutations in TUBG1, DYNC1H1, KIF5C and KIF2A cause malformations of cortical development and microcephaly. *Nat Genet*. 2013 Apr 21;45(6):639–47.
113. das Neves L, Duchala CS, Godinho F, Haxhiu MA, Colmenares C, Macklin WB, et al. Disruption of the murine nuclear factor I-A gene (Nfia) results in perinatal lethality,

- hydrocephalus, and agenesis of the corpus callosum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Oct 12;96(21):11946–51.
114. Steele-Perkins G, Plachez C, Butz KG, Yang G, Bachurski CJ, Kinsman SL, et al. The Transcription Factor Gene *Nfib* Is Essential for both Lung Maturation and Brain Development. *Mol Cell Biol*. 2005 Jan;25(2):685–98.
115. Bunt J, Lim JWC, Zhao L, Mason S, Richards LJ. PAX6 does not regulate *Nfia* and *Nfib* expression during neocortical development. *Sci Rep* [Internet]. 2015 May 29 [cited 2015 Jul 26];5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4448127/>
116. Valence S, Poirier K, Lebrun N, Saillour Y, Sonigo P, Bessières B, et al. Homozygous truncating mutation of the *KBP* gene, encoding a KIF1B-binding protein, in a familial case of fetal polymicrogyria. *Neurogenetics*. 2013 Nov;14(3-4):215–24.
117. Anton ES, Marchionni MA, Lee KF, Rakic P. Role of GGF/neuregulin signaling in interactions between migrating neurons and radial glia in the developing cerebral cortex. *Development*. 1997 Sep 15;124(18):3501–10.
118. Goshima Y, Ito T, Sasaki Y, Nakamura F. Semaphorins as signals for cell repulsion and invasion. *J Clin Invest*. 2002 Apr 15;109(8):993–8.
119. Toyofuku T, Yoshida J, Sugimoto T, Zhang H, Kumanogoh A, Hori M, et al. FARP2 triggers signals for *Sema3A*-mediated axonal repulsion. *Nat Neurosci*. 2005 Dec;8(12):1712–9.
120. Zhao H, Maruyama T, Hattori Y, Sugo N, Takamatsu H, Kumanogoh A, et al. A molecular mechanism that regulates medially oriented axonal growth of upper layer neurons in the developing neocortex. *J Comp Neurol*. 2011 Apr 1;519(5):834–48.
121. Niquille M, Garel S, Mann F, Hornung J-P, Otsmane B, Chevalley S, et al. Transient Neuronal Populations Are Required to Guide Callosal Axons: A Role for Semaphorin 3C. *PLoS Biol* [Internet]. 2009 Oct [cited 2015 Jul 21];7(10). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2762166/>
122. Barker AR, Thomas R, Dawe HR. Meckel-Gruber syndrome and the role of primary cilia in kidney, skeleton, and central nervous system development. *Organogenesis*. 2014 Jan 1;10(1):96–107.
123. Louvi A, Grove EA. Cilia in the CNS: the Quiet Organelle Claims Center Stage. *Neuron*. 2011 Mar 24;69(6):1046–60.
124. Ruat M, Roudaut H, Ferent J, Traiffort E. Hedgehog trafficking, cilia and brain functions. *Differentiation*. 2012 Feb;83(2):S97–104.
125. Faigle R, Song H. Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Feb;1830(2):2435–48.
126. Keller R, Shook D, Skoglund P. The forces that shape embryos: physical aspects of convergent extension by cell intercalation. *Phys Biol*. 2008 Mar 1;5(1):015007.

127. Han Y-G, Spassky N, Romaguera-Ros M, Garcia-Verdugo J-M, Aguilar A, Schneider-Maunoury S, et al. Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nat Neurosci.* 2008 Mar;11(3):277–84.
128. Murdoch JN, Copp AJ. The relationship between Sonic hedgehog signalling, cilia and neural tube defects. *Birt Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2010 Aug;88(8):633–52.
129. Heydeck W, Zeng H, Liu A. Planar cell polarity effector gene Fuzzy regulates cilia formation and Hedgehog signal transduction in mouse. *Dev Dyn.* 2009 Dec 1;238(12):3035–42.
130. Corbit KC, Shyer AE, Dowdle WE, Gaulden J, Singla V, Reiter JF. Kif3a constrains  $\beta$ -catenin-dependent Wnt signalling through dual ciliary and non-ciliary mechanisms. *Nat Cell Biol.* 2008 Jan;10(1):70–6.
131. Wilsch-Bräuninger M, Peters J, Paridaen JTML, Huttner WB. Basolateral rather than apical primary cilia on neuroepithelial cells committed to delamination. *Development.* 2012 Jan 1;139(1):95–105.
132. Arellano JI, Guadiana SM, Breunig JJ, Rakic P, Sarkisian MR. Development and Distribution of Neuronal Cilia in Mouse Neocortex. *J Comp Neurol.* 2012 Mar 1;520(4):848–73.
133. Baudoin J-P, Viou L, Launay P-S, Luccardini C, Espeso Gil S, Kiyasova V, et al. Tangentially Migrating Neurons Assemble a Primary Cilium that Promotes Their Reorientation to the Cortical Plate. *Neuron.* 2012 Dec 20;76(6):1108–22.
134. Higginbotham H, Eom T-Y, Mariani LE, Bachleda A, Gukassyan V, Hirt J, et al. Arl13b in primary cilia regulates the migration and placement of interneurons in the developing cerebral cortex. *Dev Cell.* 2012 Nov 13;23(5):925–38.
135. Bigio MRD. Ependymal cells: biology and pathology. *Acta Neuropathol (Berl).* 2009 Dec 19;119(1):55–73.
136. Kishimoto N, Sawamoto K. Planar polarity of ependymal cilia. *Differentiation.* 2012 Feb;83(2):S86–90.
137. Banizs B, Pike MM, Millican CL, Ferguson WB, Komlosi P, Sheetz J, et al. Dysfunctional cilia lead to altered ependyma and choroid plexus function, and result in the formation of hydrocephalus. *Development.* 2005 Dec 1;132(23):5329–39.
138. Narita K, Kawate T, Kakinuma N, Takeda S. Multiple Primary Cilia Modulate the Fluid Transcytosis in Choroid Plexus Epithelium. *Traffic.* 2010 Feb 1;11(2):287–301.
139. Gilmore EC, Walsh CA. Genetic causes of microcephaly and lessons for neuronal development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2013 Jul;2(4):461–78.
140. Barkovich AJ, Guerrini R, Kuzniecky RI, Jackson GD, Dobyns WB. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012. *Brain.* 2012 May;135(5):1348–69.
141. Ostergaard P, Simpson MA, Mendola A, Vasudevan P, Connell FC, van Impel A, et al. Mutations in KIF11 Cause Autosomal-Dominant Microcephaly Variably Associated

- with Congenital Lymphedema and Chorioretinopathy. *Am J Hum Genet.* 2012 Feb 10;90(2):356–62.
142. Mirzaa GM, Enyedi L, Parsons G, Collins S, Medne L, Adams C, et al. Congenital microcephaly and chorioretinopathy due to de novo heterozygous KIF11 mutations: Five novel mutations and review of the literature. *Am J Med Genet A.* 2014 Nov 1;164(11):2879–86.
  143. Myers KA, Baas PW. Kinesin-5 regulates the growth of the axon by acting as a brake on its microtubule array. *J Cell Biol.* 2007 Sep 10;178(6):1081–91.
  144. Rujano MA, Sanchez-Pulido L, Penner C, Deza G le, Basto R. The microcephaly protein Asp regulates neuroepithelium morphogenesis by controlling the spatial distribution of myosin II. *Nat Cell Biol.* 2013;15(11):1294–306.
  145. Adachi Y, Walsh CA, Kawaguchi A, Yamashita F, Barkovich AJ. Congenital Microcephaly with Simplified Gyral Pattern: Associated Findings and their Significance. *AJNR Am J Neuroradiol* [Internet]. 2011 [cited 2015 Aug 31];32(6). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3838394/>
  146. Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Jackson GD, Guerrini R, Dobyns WB. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development. *Neurology.* 2005 Dec 27;65(12):1873–87.
  147. Imbard A, Boutron A, Vequaud C, Zater M, de Lonlay P, Ogier de Baulny H, et al. Molecular characterization of 82 patients with pyruvate dehydrogenase complex deficiency. Structural implications of novel amino acid substitutions in E1 protein. *Mol Genet Metab.* 2011 Dec;104(4):507–16.
  148. DeBrosse SD, Okajima K, Zhang S, Nakouzi G, Schmotzer CL, Lusk-Kopp M, et al. Spectrum of neurological and survival outcomes in pyruvate dehydrogenase complex (PDC) deficiency: Lack of correlation with genotype. *Mol Genet Metab.* 2012 Nov;107(3):394–402.
  149. Jouan L, Ouled Amar Bencheikh B, Daoud H, Dionne-Laporte A, Dobrzyńska S, Spiegelman D, et al. Exome sequencing identifies recessive CDK5RAP2 variants in patients with isolated agenesis of corpus callosum. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2015 Jul 22 [cited 2015 Jul 25]; Available from: <http://www.nature.com/gate2.inist.fr/ejhg/journal/vaop/ncurrent/full/ejhg2015156a.html>
  150. Metzker ML. Sequencing technologies — the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010 Jan;11(1):31–46.
  151. Sahoo GS, Butterworth AS, Sanderson S, Shaw-Smith C, Higgins JPT, Burton H. Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* 2009 Mar;11(3):139–46.
  152. Wright CF, Fitzgerald TW, Jones WD, Clayton S, McRae JF, van Kogelenberg M, et al. Genetic diagnosis of developmental disorders in the DDD study: a scalable analysis of genome-wide research data. *Lancet.* 2015 Apr 4;385(9975):1305–14.

153. Dorschner MO, Amendola LM, Turner EH, Robertson PD, Shirts BH, Gallego CJ, et al. Actionable, Pathogenic Incidental Findings in 1,000 Participants' Exomes. *Am J Hum Genet.* 2013 Oct 3;93(4):631–40.
154. Chaki M, Airik R, Ghosh AK, Giles RH, Chen R, Slaats GG, et al. Exome capture reveals ZNF423 and CEP164 mutations, linking renal ciliopathies to DNA damage response signaling. *Cell.* 2012 Aug 3;150(3):533–48.
155. des Portes V, Abaoub L, Joannard A, Souville I, Francis F, Pinard JM, et al. So-called “cryptogenic” partial seizures resulting from a subtle cortical dysgenesis due to a doublecortin gene mutation. *Seizure.* 2002 Jun;11(4):273–7.
156. Sisodiya SM. Surgery for malformations of cortical development causing epilepsy. *Brain.* 2000 Jun 1;123(6):1075–91.
157. Sarrazin S, Poupon C, Linke J, et al. A multicenter tractography study of deep white matter tracts in bipolar i disorder: Psychotic features and interhemispheric disconnectivity. *JAMA Psychiatry.* 2014 Apr 1;71(4):388–96.

