



**HAL**  
open science

## Identification de deux gènes, WDR73 et UBA5, impliqués dans la déficience intellectuelle sévère syndromique

Estelle Colin

### ► To cite this version:

Estelle Colin. Identification de deux gènes, WDR73 et UBA5, impliqués dans la déficience intellectuelle sévère syndromique. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2017. Français. NNT : 2017ANGE0043 . tel-01779944

**HAL Id: tel-01779944**

**<https://theses.hal.science/tel-01779944>**

Submitted on 27 Apr 2018

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

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

# Thèse de Doctorat

Estelle COLIN

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université d'Angers  
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : *Biologie-Santé*

Discipline : *Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie*

Spécialité : *Biologie cellulaire*

Unité de recherche : **UMR CNRS 6015, INSERM U1083**

Soutenue le 05 décembre 2017

Thèse N° :81433

## Identification de deux gènes, *WDR73* et *UBA5*, impliqués dans la déficience intellectuelle sévère syndromique

### JURY

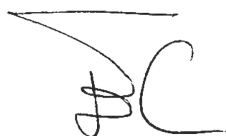
Rapporteurs :	<b>Christel THAUVIN-ROBINET</b> , Professeur d'université – Praticien Hospitalier, Université de Dijon <b>Stéphane BEZIEAU</b> , Professeur d'université – Praticien Hospitalier, Université de Nantes
Examineurs :	<b>Pascale SAUGIER-VEBER</b> , Maître de conférence d'université – Praticien Hospitalier, Université de Rouen <b>Sandra MERCIER</b> , Maître de conférence d'université – Praticien Hospitalier, Université de Nantes
Invités :	<b>Patrick VAN BOGAERT</b> , Professeur d'université – Praticien Hospitalier, Université d'Angers
Directeur de Thèse :	<b>Dominique BONNEAU</b> , Professeur d'université – Praticien Hospitalier, Université d'Angers
Co-directeur de Thèse :	<b>Vincent PROCACCIO</b> , Professeur d'université – Praticien Hospitalier, Université d'Angers



## ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussignée Estelle COLIN, déclare être pleinement consciente que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sur toutes formes de support, y compris internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire cette thèse.

Signé le 13/10/2017

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'E' followed by 'COLIN'.





# Remerciements

**Que les membres du jury trouvent ici l'expression de mes sincères remerciements :**

**Monsieur le Professeur Dominique Bonneau**, pour m'avoir proposé ces projets, et pour m'avoir dirigée tout au long de ce travail de thèse. Votre encadrement et votre disponibilité m'ont permis de mener à terme ce travail. Au delà de ce projet, vous m'avez donné la possibilité de découvrir la génétique médicale, de travailler dans votre service et vous m'avez guidée et conseillée dans mes choix professionnels. Soyez assuré de ma respectueuse reconnaissance et de mon profond respect.

**Monsieur le Professeur Vincent Procaccio**, pour votre encadrement dans ce travail. Je vous remercie pour votre disponibilité et votre soutien. Soyez assuré de ma sincère gratitude et de mon profond respect.

**Madame le Professeur Christel Thauvin-Robinet**, pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance.

**Monsieur le Professeur Stéphane Bezieau**, pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance.

**Madame le Docteur Pascale Saugier-Veber**, pour avoir accepté d'examiner ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance.

**Madame le Docteur Sandra Mercier**, pour avoir accepté d'examiner ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance.

**Monsieur le Professeur Patrick Van Bogaert**, pour avoir accepté d'examiner ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance.



**Que toutes les personnes qui ont participé à ce travail ou qui ont eu la gentillesse de me soutenir trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance, et spécialement :**

**Aux familles.**

**Madame le Professeur Anne Moncla**, pour nous avoir permis de collaborer lors de notre travail sur le gène *WDR73*.

**Madame le Professeur Corinne Antignac**, ainsi que son équipe du laboratoire **INSERM UMR\_S1163 IHU Imagine - Institut des maladies génétiques Université Paris Descartes**, pour nous avoir permis de collaborer lors de notre travail sur le gène *WDR73*.

**Madame le Professeur Eva Liebau**, ainsi que son équipe du **Département de Physiologie Moléculaire de Münster (Allemagne)**, pour nous avoir permis de collaborer lors de notre travail sur le gène *UBA5*.

**Monsieur le Docteur Antonio Miranda-Vizueté**, ainsi que son équipe de **l'Institut de Biomédecine de Séville (Espagne)**, pour nous avoir permis de collaborer lors de notre travail sur le gène *UBA5*.

**Madame le Docteur Pascale Bomont**, ainsi que son équipe de **l'Institut de Neurosciences de Montpellier**, pour nous avoir permis de collaborer lors de notre travail sur le gène *UBA5*.

**Monsieur le Docteur Daniel Henrion et Monsieur le Professeur Pascal Reynier**, de m'avoir accueillie initialement dans l'équipe de recherche INSERM UMR 1083 – CNRS UMR 6214.

**Monsieur le Docteur Guy Lenaers**, d'avoir poursuivi cet accueil dans l'équipe de recherche "Mitolab" pathophysiologie mitochondriale dans l'UMR CNRS 6015 - INSERM U1083 (MitoVasc). Merci Guy pour ta gentillesse et ta bienveillance.

**Madame le Docteur Agnès Guichet**, mille fois merci pour ton aide, ton écoute sans faille, ta disponibilité pour toutes mes questions, tes conseils dans les moments de découragement, pour tous les bons moments passés ensemble comme roommate de congrès, et surtout pour ton amitié. J'espère que nous continuerons à travailler longtemps ensemble, ainsi qu'à partager les bons (et mauvais) moments.

**Madame le Docteur Magalie Barth**, pour ta collaboration et ton soutien. J'espère que nous continuerons à travailler longtemps ensemble.

**Monsieur le Docteur Olivier Ingster**, pour ta gentillesse et ton soutien.



**Monsieur Salim Khiati et Mesdames Jamal Wakim et Magali Gorce**, pour votre aide lors de notre travail sur le gène *UBA5*.

**Aux secrétaires et aux techniciens du laboratoire de Cytogénétique et de Biochimie moléculaire**, pour votre gentillesse et votre bonne humeur dans le travail. Je tiens à remercier tout particulièrement Madame Sylvie Rethore pour m'avoir enseigné l'ACPA et la qPCR, Monsieur Philippe Bonnaud pour m'avoir enseigné le séquençage Sanger, pour sa disponibilité, sa pédagogie et sa gentillesse, Madame Géraldine Chevalier pour m'avoir enseigné la FISH, Mesdames Patricia Avillon, Martine Pesme, Marie-France Senechaud pour les cultures de fibroblastes.

**A l'équipe "Mitolab" pathophysiologie mitochondriale dans l'UMR CNRS 6015 - INSERM U1083 (MitoVasc)**, tout particulièrement, Valérie et Naïg pour leur disponibilité, leurs nombreux conseils et leur bonne humeur. Je souhaite également remercier Amélie, Géraldine, Emmanuel, Selma, Aurélien, Guillaume, Stéphanie, Céline et Jennifer. Je tiens également à remercier les Docteurs Patrizia Amati-Bonneau, Marc Ferré et Arnaud Chevrollier.



**A mes parents,** vous avez toujours été présents, votre soutien sans faille, depuis le départ, me permet d'avancer. C'est grâce à vous que je suis arrivée là où je suis aujourd'hui. Cette thèse, et mon travail en général, sont une petite pierre en plus à l'édifice que vous avez su construire avec amour depuis plus de 50 ans.

**A ma famille,**

A Anne-Muriel et Ophélie, pour votre présence, votre écoute, vos encouragements quand ça ne va pas et vos rires quand la vie est belle,

A mes frères Ronan et Gaël,

A Tanguy, Théa, Malo, Anouck, Zadig et Rachel pour leur énergie.

**A mes amis,**

A Joanne, Stéphanie, Antoine, Kévin pour votre présence indéfectible depuis notre rencontre pendant l'internat. A nos soirées à refaire le monde.

A Angeline, pour ton amitié, ton énergie et ton soutien.

A Marion et Pierre, prêts pour de nouveaux défis ?

A tous mes amis, merci pour votre amitié.





## **SOMMAIRE**

### **Liste des abréviations**

### **Liste des figures**

### **Liste des tables**

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Préambule.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Définition, prévalence et étiologies de la déficience intellectuelle.....</b>	<b>2</b>
2.1. Définition .....	2
2.2. Prévalence .....	4
2.3. Etiologies .....	4
<b>3. Fonctions des gènes impliqués dans la déficience intellectuelle.....</b>	<b>15</b>
3.1. Neurogénèse, migration neuronale et anomalie du cortex.....	15
3.2. Formation, maturation et plasticité synaptique .....	17
3.3. La régulation épigénétique de la transcription.....	26
<b>4. Evaluation clinique et génétique .....</b>	<b>28</b>
4.1. Evaluation clinique .....	28
4.2. Investigations.....	29
4.3. Génétique médicale.....	30
<b>Premier article: Loss-of-function mutations in <i>WDR73</i> are responsible for microcephaly and steroid-resistant nephrotic syndrome: Galloway-Mowat syndrome.....</b>	<b>31</b>
1. Introduction de l'article.....	32
2. Article .....	33
3. Discussion.....	34
<b>Deuxième article: Biallelic Variants in <i>UBA5</i> Reveal that Disruption of the UFM1 Cascade Can Result in Early- Onset Encephalopathy. ....</b>	<b>39</b>
1. Introduction de l'article.....	40
2. Article .....	41
3. Discussion.....	42
<b>DICUSSION GENERALE.....</b>	<b>46</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>48</b>



<b>ANNEXES .....</b>	<b>50</b>
<b>1. Figures et tables.....</b>	<b>50</b>
<b>2. Données supplémentaires aux articles .....</b>	<b>64</b>
<b>3. Autres publications en collaboration concernant la DI .....</b>	<b>65</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>73</b>



# Liste des abréviations

AAIDD: American Association on Intellectual and Developmental Disabilities  
ABAS: l'Adaptive Behavior Assessment System  
ACLF: Association des cytogénéticiens de langue française  
ACPA: Analyse Chromosomique sur Puce ADN  
ADNmt: ADN mitochondriale  
ADNn: ADN nucléaire  
APA: American Psychiatric Association  
ARNm: ARN messenger  
AS: Syndrome d'Angelman  
ASD : Troubles du spectre autistique  
BAC: Bacterial artificial chromosome  
BSID: Echelle de Bayley  
CAMOS: CA, mental retardation, optic atrophy and skin abnormalities  
ChIP: Immunoprécipitation de chromatine (Chromatin Immunoprecipitation)  
CIM: Classification Internationale des Maladies  
CNV: variation de nombre de copies (Copy Number Variation)  
CRISPR-Cas9: Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats- associated protein 9  
DI: Déficience Intellectuelle  
DINS: Déficience Intellectuelle non syndromique  
DI : Déficience Intellectuelle syndromique  
DS: Déviation Standard  
DPS: Densité post-synaptique  
DSM: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders  
EE: encéphalopathie épileptique  
FISH: hybridation fluorescente in situ (Fluorescent In Situ Hybridization)  
GAMOS: Syndrome de Galloway Mowat  
GDP: Guanosine-50-DiPhosphate  
GTP: Guanosine-50-TriPhosphate  
kb: kilobases (1 000 paires de bases)  
KD: Knock-down  
KO: Knock out  
IncARN: ARN non codants plus longs  
LoF: mutations perte de fonction (loss of fonction)  
LTD: Long Term Depression  
LTP: Long Term Potentiation  
Mb: Megabases (1 000 000 de paires de bases)  
MC: Malformation Congénitale



miARN: microARN  
MLPA: multiplex ligation dependent probe amplification  
ncARN: ARN non codants  
NGS: Séquençage massivement parallèle (New Generation Sequencing)  
NRSF: Neuron-restrictive silencer factor  
OMS: Organisation Mondiale de la Santé  
PSD: Densité post-synaptique (Post synaptic density)  
PWS: Syndrome de Prader Willi  
QD: Quotient de Développement  
QI: Quotient Intellectuel  
RE: Réticulum endoplasmique  
REST: Repressor element 1 silencing transcription factor  
ROS: Reactive Oxygen Species  
RTS: Syndrome de Rubinstein-Taybi  
SCZ: Schizophrénie  
SNCR: Syndrome néphrotique cortico-résistant  
SNP: Single Nucleotide Polymorphism  
SNV: Single Nucleotide Variant  
SP: Sous-plaque  
SV: Variations de structure (Structural Variation)  
SVZ: zone subventriculaire  
TAD: Domaine d'association topologique  
UPD: disomie uniparentale (UniParental Disomy)  
UPR: Réponse aux protéines mal repliées (Unfolded protein response)  
UPS: Système ubiquitine-protéasome  
VOUS: variant de signification inconnue (Variant of Unknown Significance)  
VZ: Zone ventriculaire  
WAIS: Wechsler Adult Intelligence Scale  
WISC: Wechsler Intelligence Scale for Children  
WPPSI: Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence





## Liste des figures

Figure 1 – Cercle illustrant la diversité allélique et phénotypique d'un sous-ensemble de gènes impliqués dans des maladies du développement neurologique. Les mutations dans un même gène provoquent des phénotypes différents.....	4
Figure 2 - Représentation schématique des étapes du développement neurologique, leurs altérations liées aux facteurs génétiques et/ou environnementaux et leur fenêtre temporelle. ....	5
Figure 3 - Rendement diagnostique de la DI modérée à sévère (hors trisomie 21) de 1970 à 2015. ....	6
Figure 4 – Avancées technologiques dans le diagnostic de la déficience intellectuelle.....	6
Figure 5 - Étude de la conception et du rendement diagnostique chez les patients atteints d'une déficience intellectuelle sévère selon la technologie utilisée. ....	6
Figure 6 – Graphique montrant l'augmentation de la découverte de gènes pour les DINS et DIS au cours du temps, par type de transmission mendélienne. ....	7
Figure 7 - Nombre de publications dans PubMed et Google Scholar .....	7
Figure 8 – Gènes impliqués dans les formes syndromiques et / ou non syndromiques de déficience intellectuelle de transmission liées au chromosome X, et leurs localisations sur le chromosome X. ....	8
Figure 9 – Rôle des mutations <i>de novo</i> dans la déficience intellectuelle sévère. ....	9
Figure 10 – Chevauchement géniques des pathologies neuro-développementales. ....	9
Figure 11 – Empreinte génomique et pathologies de l'empreinte.....	10
Figure 12 – Région chromosomique 15q11.2–q13.....	10
Figure 13 - Le «fonctionome». ....	11
Figure 14 – Séquence en 1D au génome en 3D : Interaction des promoteurs dans le noyau via la boucle d'ADN. ....	12
Figure 15 – Anomalies des TAD et pathologie neuro-développementale. ....	12
Figure 16 - Fonction des miARN dans la détermination des cellules neuronales et gliales. ....	12
Figure 17 - La carte de l'ADNmt humain.....	13
Figure 18 - Anomalies génétiques de l'ADNmt et l'ADNn conduisant à un dysfonctionnement mitochondrial (MELAS: encéphalomyopie mitochondriale avec acidose lactique et épisodes de type AVC, MERRF: épilepsie myoclonique à fibres rouges déchiquetées).....	13
Figure 19 - Mutations somatiques, <i>de novo</i> , responsables d'une malformation cérébrale et d'une déficience intellectuelle.....	14
Figure 20 - Chronologie des processus majeurs du développement cérébral.....	15



Figure 21 – Figure schématisant les conséquences d’une anomalie altérant un stade du développement cérébral.....	15
Figure 22 - Schéma du développement du cortex. ....	15
Figure 23 - La répartition des défauts génétiques sous-jacents à la microcéphalie congénitale attribuable au centrosome, pole du fuseau et au kinetochore. ....	16
Figure 24 - Voies neuronales communes au niveau synaptique impliquées dans la déficience intellectuelle. ....	18
Figure 25 –Formation, transport et fusion des vésicules dans l'espace présynaptique. ..	18
Figure 26 – Gènes et pathologies associées aux anomalies des vésicules présynaptiques. ....	19
Figure 27 - Réseaux des protéines postsynaptiques et voies de signalisation impliquées dans la déficience intellectuelle. ....	19
Figure 28 - La dérégulation de la synthèse ou de la dégradation des protéines entraînent un déséquilibre de la densité post synaptique. ....	21
Figure 29 - Les RhoGTPases .....	23
Figure 30 – Schématisation de la voie Ras-MAPK-ERK et PI3K-AKT-mTOR au niveau neuronal.....	24
Figure 31 - Schéma représentant les bases épigénétiques de la plasticité neuronale et synaptique.....	25
Figure 32 - Principaux mécanismes épigénétiques qui régulent la transcription des gènes. ....	26
Figure 33 –Représentation schématique de certains rôles de MeCP2.....	26
Figure 34 - Recommandations pour la réalisation des investigations paracliniques chez les enfants ayant un retard de développement global d'étiologie inconnue.....	29
Figure 35 – Modélisation de la protéine humaine WDR73 du résidu 73 à 370. (GenBank AAF28942.1). WDR73 est présenté avec ses 6 domaines WD40 numérotés de 1 à 6 et la direction de la chaîne de polypeptide est indiquée par une rampe de couleur (N-terminal en bleu et C-terminal en rouge). ....	34
Figure 36 – Schématisation de l’ARN et de la protéine WDR73 avec les six domaines WD40 et les mutations des six publications concernant le gène <i>WDR73</i> . ....	34
Figure 37 - Rôle de WDR73 dans la neurogénèse cérébelleuse. ....	36
Figure 38 – Neuropathologie.....	36
Figure 39 – Schématisation d’un podocyte, cellule en forme de pieuvre avec des processus primaires, enrichis en microtubules, et des processus secondaires ou pédicelles, enrichis en actine. ....	37
Figure 40 – Cascade UFM1 ou ufmylation. ....	40
Figure 41 - Schématisation de l’ARN et de la protéine UBA5 avec le domaine d’adénylation, le domaine d’interaction à UFM1 (UIS) et le site de liaison à UFC1.....	40
Figure 42 - La dimérisation de UBA5 est nécessaire pour l'activation UFM1. ....	40



Figure 43 - Schématisation de la protéine UBA5 avec ses 3 domaines et les 12 mutations des trois publications concernant le gène <i>UBA5</i> . .....	42
Figure 44 - Activation de l'UPR mitochondrial chez <i>C. elegans</i> KO pour <i>uba-5</i> . .....	44
Figure 45 - Arbre décisionnel devant une déficience intellectuelle utilisé par le service de génétique du CHU d'Angers. ....	47

## **Annexes**

Figure 1 - Exemples de fonctions des gènes soumis à empreinte.....	50
Figure 2 - Images IRM issues des 6 publications concernant les mutations bi-alléliques du gène <i>WDR73</i> .....	59
Figure 3 - Histologies rénales rapportées dans 6 publications concernant les mutations bi-alléliques du gène <i>WDR73</i> .....	60
Figure 4 - Images IRM issues des 2 publications concernant les mutations bi-alléliques du gène <i>UBA5</i> .....	63



## Liste des tables

Table 1 – Critères de gravité de la déficience intellectuelle d’après le DMS-5. ....	3
Table 2 – Principales étiologies de la déficience intellectuelle.....	4
Table 3 - Exemples de pathologies dues à une anomalie de la régulation transcriptionnelle. ....	27
Table 4 – Tableau récapitulatif du phénotype des individus porteurs de mutations bi-alléliques de <i>WDR73</i> dans la littérature. ....	35
Table 5 - Tableau récapitulatif du phénotype des individus porteurs de mutations bi-alléliques dans la littérature.....	42

## Annexes

Table 1 – Pathologies dues à une anomalie de l’empreinte génomique parentale.....	50
Table 2 - Exemples de mutations introniques profondes identifiées comme étant responsables de pathologies.....	51
Table 3 – Exemples de mutations des régions régulatrices identifiées comme étant responsables de pathologies.....	51
Table 4 – Exemples de délétions ou autres réarrangements localisés à distance des gènes dont ils altèrent la fonction et identifiées comme étant la cause de pathologies.....	52
Table 5 – Anomalies dans les micro-ARNs et sn-ARNs identifiées comme étant responsables pathologies.....	52
Table 6 - Les défauts des microtubules du centrosome et du fuseau responsables de microcéphalies congénitales sévères.....	53
Table 7 - Défauts de la réponse aux dommages de l'ADN et altération des protéines de réparation de l'ADN associées à la microcéphalie congénitale.....	54
Table 8 - Gènes ayant des fonctions épigénétiques impliquées dans les troubles cognitifs.....	55-56
Tableau 9 - Caractéristiques cliniques et en neuro-imagerie des 55 individus rapportés dans la littérature comme porteurs de mutations bi-alléliques dans le gène <i>WDR73</i> .....	57-58
Tableau 10 - Caractéristiques cliniques et en neuro-imagerie des 15 individus rapportés dans la littérature comme porteurs de mutations bi-alléliques dans le gène <i>UBA5</i> .....	61-62





# INTRODUCTION

## 1. Préambule

Ce travail de doctorat a été réalisé sur la thématique de la déficience intellectuelle syndromique sous la direction du Pr Dominique Bonneau et la co-direction du Pr Vincent Procaccio. Il s'intègre dans l'une des thématiques de l'équipe "Mitolab" pathophysiologie mitochondriale dirigée par le Dr Guy Lenaers dans l'UMR CNRS 6015 - INSERM U1083 (MitoVasc).

Ma thèse a été effectuée en parallèle de mon travail clinique dans le service de Génétique Médicale. Mes efforts ont porté d'une part sur l'identification de deux gènes, *WDR73* et *UBA5*, impliqués dans une déficience intellectuelle sévère syndromique, à travers l'utilisation de technologies tels que la SNP-array, et le séquençage à haut débit, et d'autre part, sur la caractérisation des protéines pour lesquels ils codent.

Le travail sur le gène *WDR73* a été réalisé grâce à une collaboration clinique avec le Pr Anne Moncla du Service de Génétique du CHU de Marseille et le Centre de référence national sur les maladies néphrogénétiques coordonné par le Pr Corinne Antignac. Le travail sur le gène *UBA5* a été réalisé grâce à une collaboration avec le Pr Eva Liebau du Département de Physiologie Moléculaire de Münster (Allemagne), et du Dr Antonio Miranda-Vizueté de l'Institut de Biomédecine de Séville (Espagne) pour les études sur *C. elegans* et avec le Dr Pascale Bomont de l'Institut de Neurosciences de Montpellier, pour les études sur le poisson zèbre.

L'introduction de cette thèse permettra de rappeler la définition de la déficience intellectuelle, sa prévalence, ses étiologies, la fonction des gènes impliqués et sur l'importance croissante de l'utilisation de technologies de séquençage à haut débit permettant de poser un diagnostic. Nous discuterons également des comorbidités de la DI, en particulier, de l'épilepsie et des encéphalopathies épileptiques. Nous reprendrons ensuite les investigations qui peuvent être proposées, et l'importance de pouvoir poser un diagnostic afin de donner un conseil génétique aux familles.

Puis dans une seconde partie nous présenterons les deux articles sur les gènes *WDR73* et *UBA5*.

Enfin nous discuterons, de manière plus générale, de la place des technologies de séquençage à haut débit dans la recherche et le diagnostic chez les individus porteurs d'une DI. Nous verrons les difficultés d'interprétation fonctionnelle des variants ou de validation de nouveaux gènes.



## 2. Définition, prévalence et étiologies de la déficience intellectuelle

### 2.1. Définition

Les anomalies du développement sont des atteintes graves qui entraînent un handicap cognitif et/ou physique. Ces anomalies apparaissent avant l'âge de 22 ans et donnent lieu à des atteintes chroniques. Elles incluent des syndromes d'origine génétique qui peuvent être polymalformatifs avec ou sans déficience intellectuelle. En 1992 l'Organisation Mondiale de la Santé a défini, dans la Classification Internationale des Maladies (CIM-10), la déficience intellectuelle (DI), appelée auparavant retard mental, comme « une condition de développement arrêté ou incomplet de l'esprit, qui se caractérise surtout par une déficience des compétences manifestées pendant la période de développement, ce qui contribue au niveau global de l'intelligence, à savoir les capacités cognitives, linguistiques, motrices et sociales » (1). En 2001, cette définition est complétée par la notion de handicap (2).

En 2010, The American Association on Intellectual and Developmental Disabilities (AAIDD) définit la DI comme « un handicap caractérisé par des limitations importantes tant dans le fonctionnement intellectuel (raisonnement, apprentissage, résolution de problèmes) que dans le comportement adaptatif, qui couvre une gamme de compétences sociales et pratiques quotidiennes. Cette incapacité apparaît avant l'âge de 18 ans » (3).

Ces éléments sont repris en 2013 par l'American Psychiatric Association (APA) dans la DMS-5 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – 5) qui précise que la DI est définie comme une faiblesse généralisée des capacités mentales avec un impact sur le fonctionnement adaptatif dans 3 domaines différents :

- le domaine conceptuel (le langage, la lecture, l'écriture, les mathématiques, le raisonnement, les connaissances, la mémoire, le temps, l'espace, l'argent).
- le domaine social (l'empathie, la responsabilité sociale, le jugement social, les compétences de communication interpersonnelle, la méfiance/naïveté appropriée, la capacité à créer et maintenir des relations amicales, la capacité à résoudre les problèmes sociaux).
- le domaine pratique qui se focalise sur l'autonomie (hygiène, utilisation de moyens de transport, responsabilités professionnelles, gestion du budget, gestion de l'emploi du temps, organisation du travail).

Ce trouble survient pendant la période du développement (4).

Afin d'évaluer le fonctionnement intellectuel, des tests psychométriques standardisés (comparaison des individus, en fonction de l'âge et de la culture, à d'autres

Gravité	Domaine conceptuel	Domaine social	Domaine pratique
<b>Léger</b>	La personne a une manière plus pragmatique de résoudre des problèmes et de trouver des solutions que ses pairs du même âge...	La personne a une compréhension limitée du risque dans les situations sociales ; a un jugement social immature pour son âge...	La personne occupe souvent un emploi exigeant moins d'habiletés conceptuelles...
<b>Modéré</b>	D'ordinaire, la personne a des compétences académiques de niveau primaire et une intervention est requise pour toute utilisation de ces compétences dans la vie professionnelle et personnelle...	Les amitiés avec les pairs tout-venant souffrent souvent des limitations vécues par la personne au chapitre des communications et des habiletés sociales...	Présence, chez une minorité importante, de comportements mésadaptés à l'origine de problèmes de fonctionnement social...
<b>Grave</b>	La personne a généralement une compréhension limitée du langage écrit ou de concepts faisant appel aux nombres, quantités, au temps et à l'argent...	Le langage parlé est relativement limité sur le plan du vocabulaire et de la grammaire...	La personne a besoin d'aide pour toutes les activités de la vie quotidienne, y compris pour prendre ses repas, s'habiller, se laver et utiliser les toilettes...
<b>Profond</b>	La personne peut utiliser quelques objets dans un but précis (prendre soin de soi, se divertir)... Des problèmes de motricité empêchent souvent un usage fonctionnel...	La personne peut comprendre des instructions et des gestes simples...	La personne dépend des autres pour tous les aspects de ses soins physiques quotidiens, pour sa santé et pour sa sécurité, quoiqu'elle puisse participer à certaines de ces activités...

**Tableau 1 – Critères de gravité de la déficience intellectuelle d'après le DMS-5.**

*D'après Déficiences intellectuelles : Expertise collective – Synthèse et recommandations Etiologies de la déficience intellectuelle, 2016*

individus d'une même population), tels que les tests de Weschler (WPPSI chez les jeunes enfants (5), WISC chez les enfants et adolescents (6) et WAIS chez l'adulte (7)), sont utilisés afin de définir un quotient intellectuel (QI) composé d'un quotient verbal et d'un quotient non verbal ou de performance. Ces tests portent sur le raisonnement, la résolution de problèmes, la pensée abstraite, la faculté de jugement, l'apprentissage académique, l'apprentissage par l'expérience. Le fonctionnement intellectuel est dit déficitaire si le QI est inférieur à la moyenne de la population générale, d'environ deux écarts-types, soit inférieur à 70. En effet, le QI moyen et l'écart-type ont été fixés par convention à 100 et 15 respectivement. Avant l'âge de 3 à 5 ans, on parle plutôt de quotient de développement (QD) que de QI. Le QD peut se mesurer par l'échelle de Brunet-Lézine révisée ou par l'échelle de Bayley (BSID). Ces tests s'utilisent également chez des individus plus âgés en cas de DI profonde.

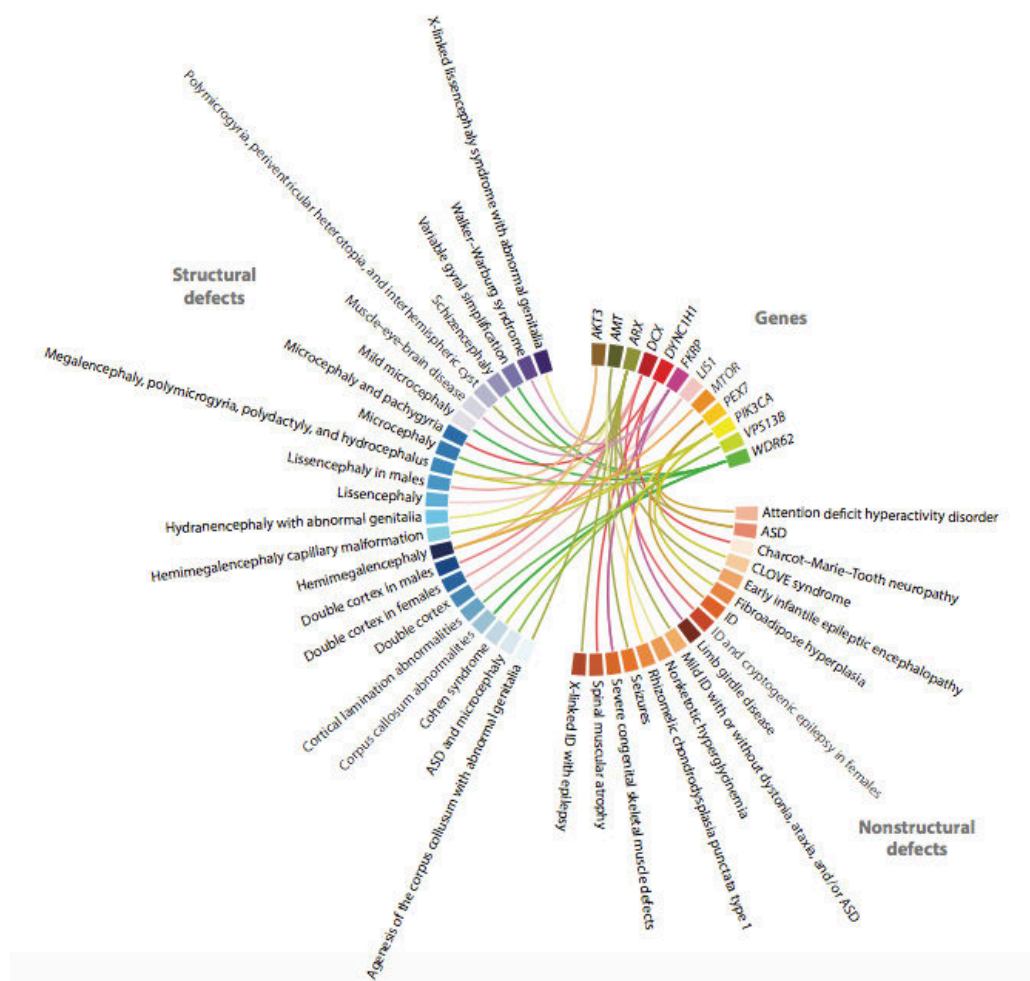
Le degré de sévérité de la déficience a longtemps été corrélé uniquement au QI : la déficience était légère, modérée, sévère et profonde si le QI était compris entre 70 et 55/50, 55/50 et 40/35, 40/35 et 25/20 et inférieur à 20 respectivement (4). Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, la DI implique une limitation dans le comportement adaptatif. Il existe alors d'autres tests permettant de l'évaluer comme le Vineland Adaptive Behavior Scale-Second Edition (Vineland-II) (8) ou l'*Adaptive Behavior Assessment System, Second Edition* (ABAS- II) (9). En prenant ainsi compte de cette définition dans sa globalité, des critères de gravité de la DI ont été posés d'après la DMS-5 (table 1).

La DI peut être classée selon les résultats des tests psychométriques, mais elle peut également être classée en fonction de :

- sa forme syndromique (DIS), où elle est associée à une ou plusieurs autres anomalies comme des traits dysmorphiques, des malformations congénitales, des anomalies métaboliques, ou des comorbidités.
- sa forme non syndromique (DINS) où la déficience est dite isolée.

La frontière entre ces deux formes est parfois floue car des troubles psychiatriques sont parfois difficiles à mettre en évidence dans la DINS (10).

Les comorbidités rencontrées très fréquemment dans les DIS sont d'ordre neurodéveloppemental tels que l'autisme, la schizophrénie ou encore l'épilepsie. Selon la classification internationale des pathologies, 14 à 39% des individus avec DI présenteraient des troubles psychiatriques (1,11,12). Quant à l'épilepsie, Roberston J *et al.*, dans une revue de la littérature de 2015, retrouvent une prévalence moyenne de 22.2% (95% CI 19.6–25.1) et confirment que la prévalence est croissante selon la sévérité de la DI. En effet, elle est de 9.8% (95% CI 7.6–12.5), 30.4% (95% CI 25.5–35.7) et 41.6% (95% CI 32.1–51.8) dans la DI légère, modérée et sévère



**Figure 1 – Cercle illustrant la diversité allélique et phénotypique d'un sous-ensemble de gènes impliqués dans des maladies du développement neurologique. Les mutations dans un même gène provoquent des phénotypes différents.**

Par exemple, des mutations dans le gène *DCX* peuvent entraîner une DI et une épilepsie chez les filles, une lissencéphalie chez les garçons et un double cortex chez les filles et les garçons. Des mutations dans le gène *PEX7* peuvent entraîner des troubles attentionnels, des troubles du spectre autistique et une DI.

*D'après W F. Hu, M H. Chahrour, et C A. Walsh. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2014.*

Complications de la prématurité	5 %
Causes environnementales	13 %
Anomalies chromosomiques	15 %
Maladies métaboliques	8 %
Syndromes reconnaissables	2 %
DI liées au chromosome X	10 %
Autres maladies monogéniques connues	10 %
DI idiopathiques	35-40 %

**Tableau 2 – Principales étiologies de la déficience intellectuelle.**

*D'après Déficiences intellectuelles : Expertise collective – Synthèse et recommandations Etiologies de la déficience intellectuelle, 2016 (29)*



respectivement (13). Cette fréquence d'association de comorbidités est expliquée par le partage des mêmes voies de signalisation ou de gènes impliqués dans les pathologies neurodéveloppementales (figure 1) (14-17).

## 2.2. Prévalence

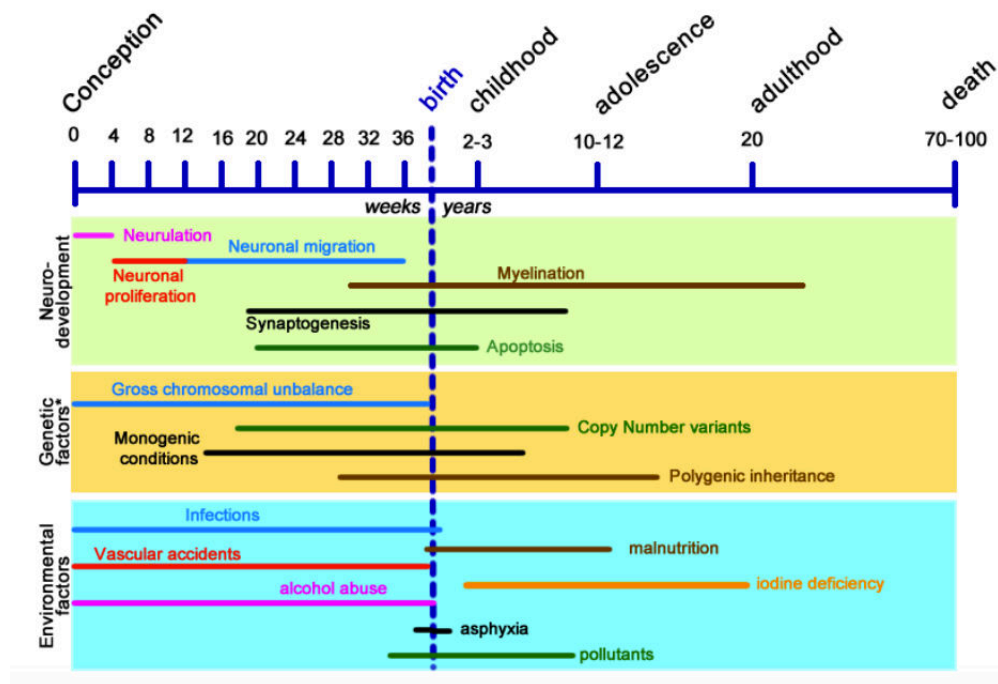
La prévalence de la DI est estimée entre 1 à 3% de la population (18-20). Parmi les individus atteints de DI, la majorité (85%) présente une DI légère, tandis que 10%, 4%, et 2% présentent une DI modérée, sévère et profonde respectivement (19). Cette prévalence varie selon les pays. En effet, il semble que la prévalence est inversement corrélée au contexte socio-économique (21,22). Elle est plus élevée (le double) dans les pays à bas revenu (20), ce qui peut être expliqué par le niveau de soins de santé incluant le suivi de la grossesse, les conditions d'accouchement, le dépistage néonatal, la prévention et la prise en charge des pathologies infectieuses... (23), ainsi que d'autres paramètres tels que la malnutrition, le contexte psycho-social défavorable ou le taux de consanguinité parentale (24). De même, alors que la prévalence de la DI sévère semble stable, celle de la DI légère à modérée dépend fortement de facteurs environnementaux tels que l'accès à l'éducation ou aux soins de santé (21,25). Enfin, certaines études suggèrent que la DI sévère est plus fréquente chez les filles que chez les garçons (26-28). En France, la déficience intellectuelle légère pourrait concerner entre 10 et 20 pour 1 000 personnes, et la déficience intellectuelle sévère est retrouvée chez 3 à 4 pour 1 000 personnes (29). La prévalence de la DI est plus élevée chez les garçons avec un *sex-ratio* de 1,3 à 1,4 (30-32).

Les dépenses de santé engendrées par la DI ont été estimées en 1994 aux Pays-Bas à 26,98 millions d'euros. En 2004, aux Etats-Unis, les coûts (directs et indirects) inhérents aux soins médicaux des enfants américains nés avec une DI en 2000 ont été estimés à 51,2 milliards de dollars (33,34). Le dépistage, le bilan étiologique et la prise en charge à long terme des individus avec une DI représentent donc un véritable défi pour les politiques de santé publique.

## 2.3. Etiologies

La DI fait partie d'un groupe hétérogène de pathologies syndromiques et non syndromiques qui ont comme entité commune la limitation importante tant dans le fonctionnement intellectuel que dans le comportement adaptatif, apparaissant avant 18 ans et entraînant un handicap. L'expressivité clinique de la DI et ses étiologies sont très hétérogènes. Ces dernières peuvent être séparées en deux groupes (table 2) : 1) les causes environnementales (pouvant répondre à une possible prévention) ; 2) les causes





**Figure 2 - Représentation schématique des étapes du développement neurologique, leurs altérations liées aux facteurs génétiques et/ou environnementaux et leur fenêtre temporelle.**

*D'après P Chiurazzi et F Pirozzi. F1000Research 2016 (35)*

génétiques. Ces deux types de causes affectant la neurogénèse et/ou le fonctionnement neuronal, peuvent intervenir lors des périodes prénatale, périnatale ou postnatale (figure 2). Néanmoins, environ 50% des DI sont encore à l'heure actuelle d'étiologie indéterminée (35-37).

### **2.3.1. Causes environnementales**

Les causes environnementales peuvent donner lieu à des formes acquises mais également congénitales de DI en fonction de la période au cours de laquelle ces facteurs interviennent. Elles sont en cause dans 13 à 18% des DI (table 2) (29).

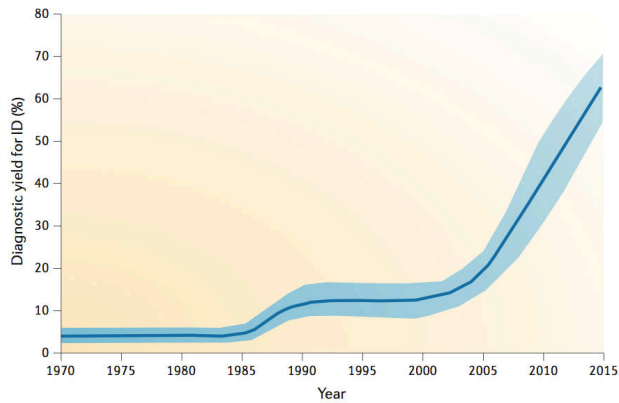
Parmi les causes prénatales, on retiendra principalement le syndrome d'alcoolisation fœtale (38), et également les autres expositions aux neurotoxiques, qu'elle soient médicamenteuses comme celle au valproate de sodium ou aux drogues illicites, métaboliques comme dans la phénylcétonurie maternelle ou le diabète (39-43). Par ailleurs, la malnutrition, le retard de croissance intra-utérin (44) mais également les infections (notamment à cytomégalovirus) sont pourvoyeuses de DI. Dans les causes prénatales on retiendra aussi les infections (méningites bactériennes, encéphalites), la prématurité (45), les anoxies périnatales, les traumatismes cérébraux, les états de mal convulsifs, les déshydratations aiguës graves du nourrisson et les causes psychosociales.

Ces causes environnementales sont majoritairement responsables des DI légères (46).

### **2.3.2. Causes génétiques**

Les étiologies génétiques sont une cause majeure de DI et plus particulièrement des DI sévères (17,47). Elles sont retrouvées chez environ 50% à 65% des patients ayant une DI modérée à sévère, et chez 20% des patients ayant une DI légère (48). Le taux de diagnostic positif est en constante augmentation en raison de l'utilisation de nouvelles technologies (figures 3, 4 et 5) (17,37,49). Cependant, il faut noter que le rendement diagnostique est plus élevé dans les DI modérées à sévères que pour les DI légères et plus chez les hommes que chez les femmes.

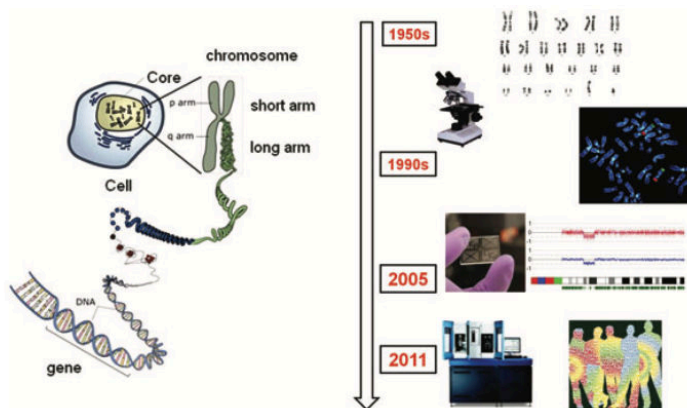
Les causes génétiques peuvent être subdivisées en anomalies chromosomiques, monogéniques et non mendéliennes.



**Figure 3 - Rendement diagnostique de la DI modérée à sévère (hors trisomie 21) de 1970 à 2015.**

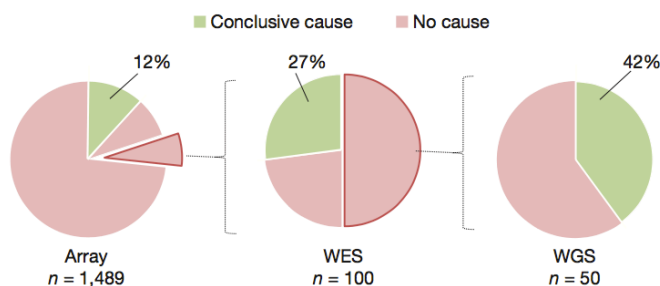
La ligne continue indique la moyenne des études publiées, et le fond bleu indique les limites inférieures et supérieures des taux de diagnostics rapportés.

*D'après Visser et al., Nat Rev Genet. 2016*



**Figure 4 – Avancées technologiques dans le diagnostic de la déficience intellectuelle**

*D'après M.H. Willemsen and T. Kleefstra, Clin Genet 2014*



**Figure 5 - Étude de la conception et du rendement diagnostique chez les patients atteints d'une déficience intellectuelle sévère selon la technologie utilisée.**

Rendement diagnostique pour les patients atteints d'une DI sévère (QI < 50), spécifié par la technologie: ACPA, WES et WGS. Les pourcentages indiquent le nombre de patients chez qui une cause a été identifiée. Les parts de camembert surlignées en rouge indiquent le groupe de patients sans diagnostic et dont l'ADN a ensuite été analysé à l'aide de la technologie mentionnée.

*D'après Gilissen et al. Nature 2014*

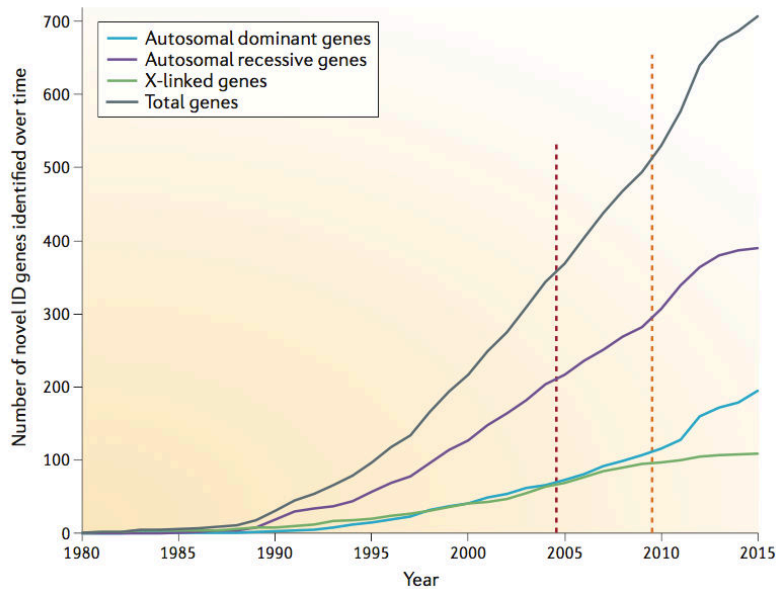
## a) Anomalies chromosomiques

Les remaniements chromosomiques (anomalies de nombre et de structure) peuvent expliquer 15% à 20% des DI (17,37,50). La trisomie 21, avec une prévalence de 1/2000 naissances vivantes en France est l'étiologie génétique la plus fréquente de DI (51). Il s'agit de la première anomalie chromosomique découverte chez l'homme (52). D'autres anomalies, telles que des remaniements du chromosome X, des dérivés de remaniements équilibrés (translocations), ou des syndromes microdélétionnels récurrents (Syndrome d'Angelman et de Prader Willi (15q11.2-q13), Syndrome de Williams (7q11.2), Syndrome de Di George (22q11.2), Syndrome de Smith Magenis (17q11.2)..) peuvent expliquer des tableaux de DI et être détectés par la réalisation d'un caryotype conventionnel ou d'une FISH. En 2005, une méta-analyse a montré qu'un remaniement chromosomique était diagnostiqué, en utilisant ces deux techniques, avec un taux moyen de 9,5% (50). En 2009, une étude rétrospective déportant sur la période 1996-2005 chez 36 325 patients néerlandais présentant une DI a montré une fréquence cumulée d'aberrations chromosomiques (hors trisomie 21) de 8,6% (5% détectés par caryotype conventionnel et 3,6% par FISH) dont 8,1% d'anomalies déséquilibrées (53).

L'utilisation de sondes subtélomériques par technique de MLPA (multiplex ligation dependent probe amplification) a permis de mettre en évidence que de tels remaniements étaient responsables de 5% des DI et/ou anomalies congénitales (54). Ces taux inférieurs aux précédents, étaient expliqués par la plus faible résolution de cette technique.

L'introduction des analyses chromosomiques sur puce à ADN (ACPA), ou caryotype moléculaire, a permis de poser un diagnostic chez 10 à 15% d'individus avec DI à caryotype normal (47,55). La résolution croissante de l'ACPA, de 1 Mb, par l'utilisation de sondes de type BAC (bacterial artificial chromosome) de taille entre 100 et 200 kb (56-59), jusqu'à 10kb, par l'utilisation de sondes d'oligonucléotides (60-64), a permis de détecter des pertes ou gains de nombre de copie d'ADN (CNVs ou Copy Number Variant). Certains de ces CNVs, qui peuvent être pathogènes ou polymorphiques (65), sont récurrents et colligés dans des banques de données (66,67). Toutefois, l'interprétation de la pathogénicité des CNVs reste encore un défi (68). En revanche, cette technique ne peut pas détecter les réarrangements équilibrés, les anomalies de la ploïdie ou un taux bas de mosaïcisme (moins de 20 %) pour une anomalie déséquilibrée ou une aneuploïdie.

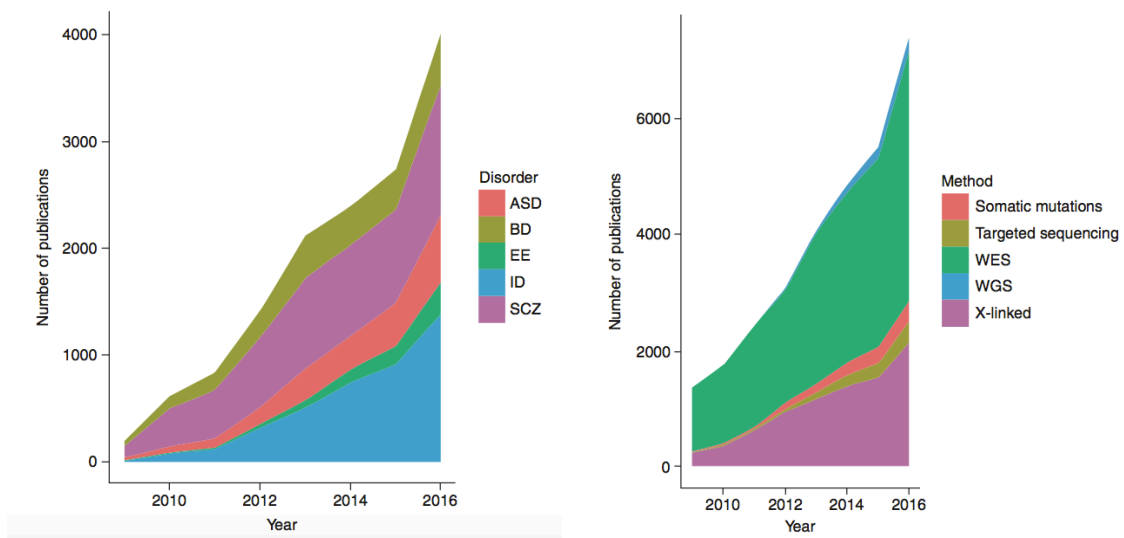
En 2010, Miller *et al.* ont recommandé que l'ACPA soit l'examen cytogénétique de première intention dans l'exploration des DI. Le caryotype conventionnel ne doit alors être utilisé que devant des syndromes chromosomiques évidents, comme par exemple une trisomie 21, des antécédents familiaux de réarrangement chromosomique ou des fausses couches à répétition (69). L'association des cytogénéticiens de langue française (ACLF) à émis en 2010 les mêmes recommandations dans son guide des bonnes



**Figure 6 – Graphique montrant l'augmentation de la découverte de gènes pour les DINS et DIS au cours du temps, par type de transmission mendélienne.**

Les lignes pointillées verticales représentent l'introduction de l'ACPA (rouges) et des techniques de NGS (orange). Il semble que la totalité des gènes impliqués dans la DI n'est pas encore identifiée, sauf peut-être pour les formes liées à l'X.

*D'après Visser et al., Nat Rev Genet. 2016*



**Figure 7 - Nombre de publications dans PubMed et Google Scholar**

**7 a - Nombre de publications dans PubMed** en utilisant les termes de recherche "séquençage à haut débit", "trouble du spectre de l'autisme" (ASD), "déficience intellectuelle" (ID), "encéphalopathie épileptique" (EE), "schizophrénie" (SCZ) et "trouble bipolaire (BD) par an depuis 2009. Pour l'année 2016, PubMed a été consulté le 6 août 2016 ce qui représente donc une année incomplète, un facteur 2 a donc été utilisé comme facteur d'ajustement.

**7 b - Nombre de publications par an dans Google Scholar** selon la stratégie de séquençage, en utilisant les termes de recherche «déficience intellectuelle» et «séquençage d'exome complet» (WES), «séquençage génome entier» (WGS), "séquençage ciblé" (étiqueté "targeted sequencing"), "mutations somatiques" (étiquetées "somatic mutations") et "déficience intellectuelle liée à l'X" et "séquençage" (étiqueté "X-linked").

*D'après Harripaul et al., Cold Spring Harb Perspect Med 2017*

pratiques de l'ACPA (70).

La localisation et le clonage des points de cassure chez les individus présentant des réarrangements chromosomiques équilibrés avec un phénotype anormal sont d'excellents moyens de découvrir des nouveaux gènes comme cela a été le cas pour la dystrophie musculaire de Duchenne le syndrome CHARGE ou encore le syndrome de Pitt-Hopkins (71-79).

## **b) Anomalies monogéniques**

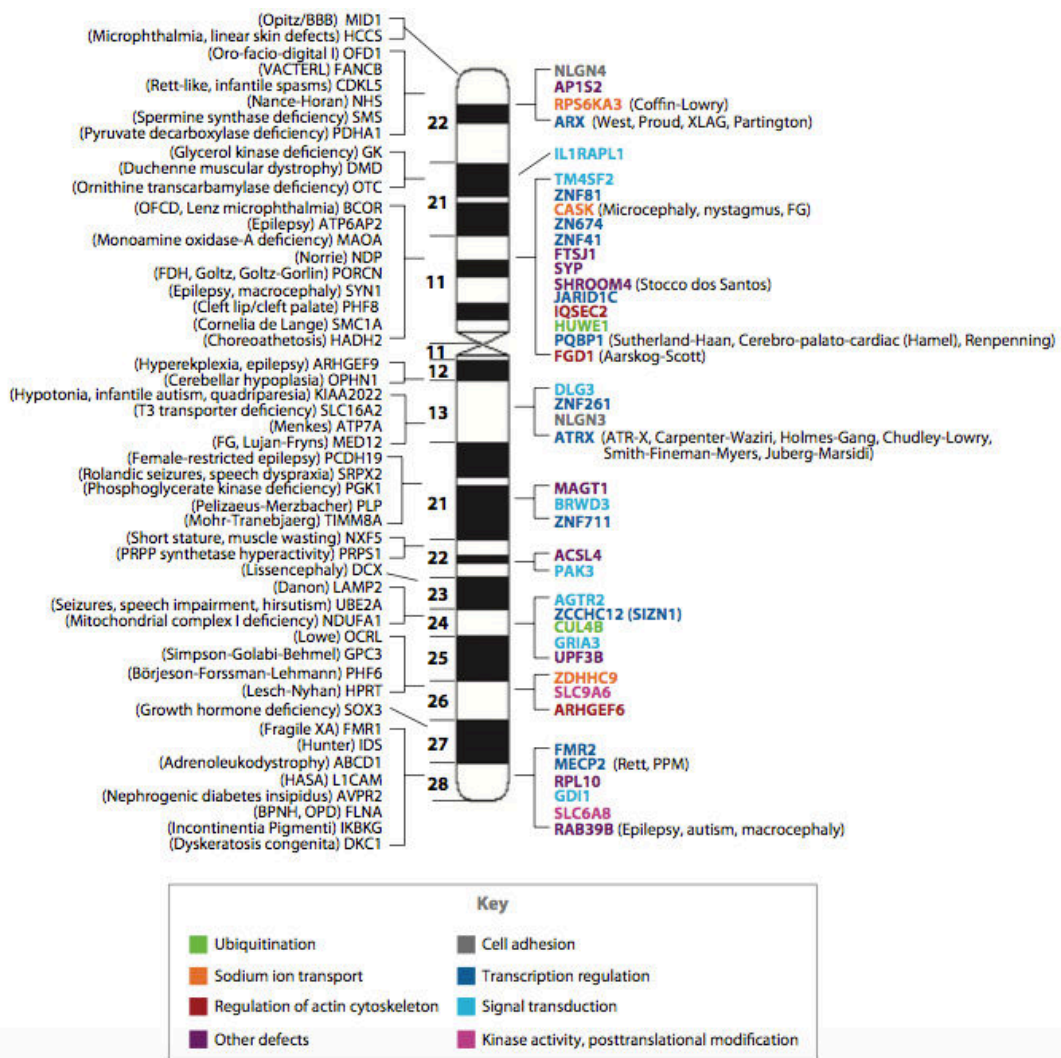
En 2016, plus de 700 gènes responsables de DI syndromiques ou isolées avaient été identifiées avec des modes de transmission lié à l'X, autosomique récessif ou dominant (figure 6 et tableau en annexe). Cette augmentation croissante de l'identification de gènes de DI est concomitante à l'utilisation de séquençage à haut débit (figures 7 a et b) (17,80). En 2014, Musante et Ropers, ont estimé qu'il devrait exister au moins 2500 gènes impliqués dans la DI d'origine autosomique et que cette pathologie était majoritairement autosomique récessive (81).

## **Maladies liées au chromosome X**

L'étude des DI transmises sur le mode lié au chromosome X a été prépondérante à partir des années 1990 du fait de la prédominance de la DI chez l'homme, avec un *sex-ratio* de 1,3 à 1,4, et de la possibilité de réaliser un clonage positionnel à partir des réarrangements chromosomiques et des études de liaison (25,31). Le syndrome de l'X fragile est la cause la plus fréquente des DI liées à l'X. Avec une fréquence estimée à 1 pour 5000 garçons, elle représente 0,5 % des DI (82). Son nom vient de la mise en évidence, en 1966, d'un site fragile sur le chromosome X, lors de la réalisation d'un caryotype sanguin chez 2 frères avec un milieu de culture pauvre (83). C'est en 1991 que les répétitions de CGG au niveau du gène *FMR1* ont été identifiées comme la cause moléculaire de l'X Fragile (84). Depuis, grâce, entre autre, aux consortiums comme EURO-MRX (<http://www.euromrx.com>) et l'IGOLD Consortium, plus d'une centaine de gènes impliqués dans la DI liée à l'X, syndromique et non syndromique, ont été identifiés (figure 8) (47,85,86). Actuellement, on considère que l'ensemble de ces gènes explique 10 à 12% de la DI chez les garçons, mais que chacun de ces gènes (*FMR1* exclus) n'est responsable que d'environ 0,1% des cas (17,37,47,85).

## **Maladies autosomiques récessives**

Jusqu'en 2006, seuls 3 gènes étaient identifiés pour les DI de transmission



**Figure 8 – Gènes impliqués dans les formes syndromiques et / ou non syndromiques de déficience intellectuelle de transmission liées au chromosome X, et leurs localisations sur le chromosome X.**

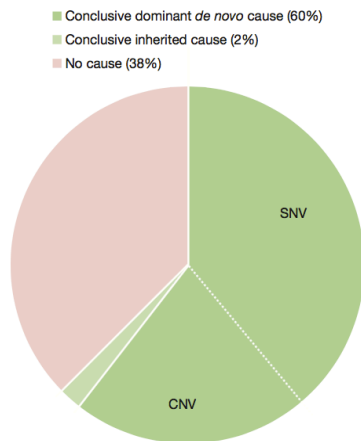
Les couleurs se rapportent au rôle de ces gènes : gris : adhésion cellulaire, bleu foncé : régulation de la transcription, rose : activité kinase et modification post-traductionnelle, bleu clair : transduction du signal, vert : ubiquitination, rouge : régulation du cytosquelette d'actine, orange : transport d'ion sodium et pourpre : autres anomalies.

*D'après Ropers HH. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2010*

autosomique récessive dans des familles consanguines: *PRSS12*, *CRBN* et *CC2D1A* (87-89). La prévalence des DI d'origine autosomique récessive est élevée dans les populations où les mariages consanguins sont fréquents comme en Afrique du Nord, au Moyen Orient ou en Asie, mais, elle est estimée entre 13 à 24% dans les populations occidentales (81,90,91). Au Pakistan, les unions consanguines représentent 62,7% des mariages, en Iran 40% et en Inde entre 16% à 33% selon la région (92,93). Une étude a montré que dans les populations consanguines, il y avait 10 fois plus d'anomalies congénitales, dues à une hérédité autosomique récessive, et donnant lieu à des décès précoces (94). En effet, les enfants issus d'une union consanguine ont plus de régions génomiques homozygotes avec des allèles identiques que les enfants issus d'une union non consanguine. De ce fait, il y a une augmentation de transmission de variants rares d'un ancêtre commun hérités de la mère et du père et responsables de pathologies récessives. C'est par l'utilisation de l'homozygotie mapping, par des techniques d'ACPA (de puce à ADN utilisant des SNPs), puis par son association au séquençage Sanger ou au séquençage à haut débit dans de grandes familles consanguines que de nouveaux loci puis des gènes de DI non syndromique ont été identifiés (102,106-115). En 2011, Najmabadi. *et al.* ont étudié 136 familles consanguines avec une DI de transmission autosomique récessive. Ils ont trouvé 23 mutations dans des gènes de DI connus et identifié 50 nouveaux gènes candidats. Au total, une cause a été retrouvée ou suspectée chez 78 des 136 familles, expliquant 57% des cas de DI (98).

En 2016, plus de 300 gènes de DI autosomiques récessives ont été répertoriés (17). Ce type de stratégie a permis de mettre en évidence la cause moléculaire de syndromes génétiques tel que le syndrome de Joubert (103) et d'augmenter le rendement diagnostique de la DI de 10 à 20% (81). L'identification de gènes dans des populations non consanguines est beaucoup moins fréquente et suggère que les formes récessives de DI le sont également dans ces populations (104-106,37). Des études d'*homozygosity mapping* ont quand même permis d'identifier des mutations homozygotes dans des familles non consanguines dans d'autres types de pathologies telles que le syndrome néphrotique cortico-résistant, la néphronophtise ou les rétinites pigmentaires mais ont donné peu de résultats dans le cas de familles avec DI modérées à sévères (97,107-110). En effet, dans les populations consanguines, ce sont des mutations homozygotes qui sont retrouvées alors que dans les populations occidentales, il s'agit préférentiellement de mutations hétérozygotes composites et les cas de DI de transmission autosomique récessive sont généralement sporadiques (81,111). Les maladies métaboliques sont une cause fréquente de DI dans les populations consanguines. Dans les populations caucasiennes, elles sont responsables approximativement de 1% des DI non syndromiques (50).

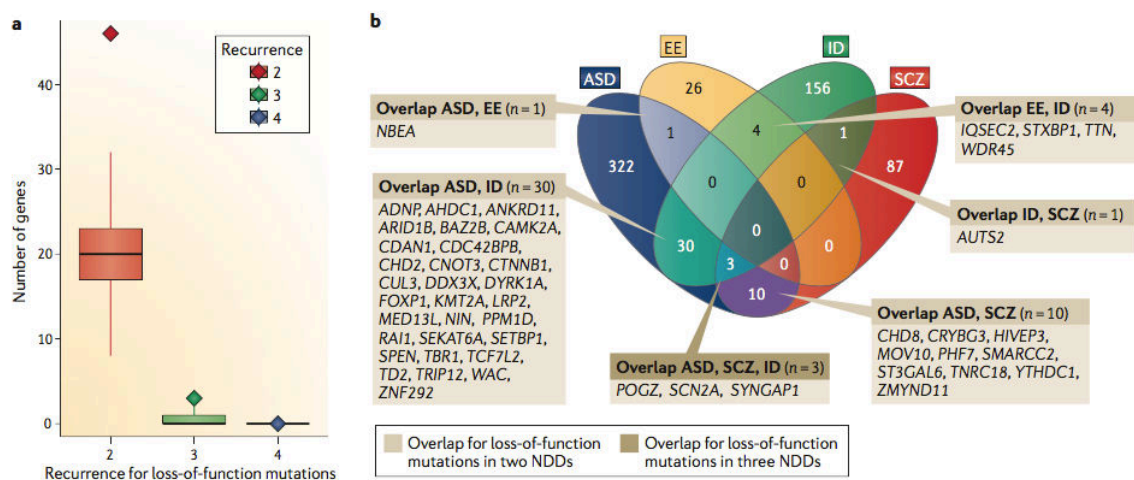




**Figure 9 – Rôle des mutations *de novo* dans la déficience intellectuelle sévère.**

Les mutations de novo sont une cause majeure de DI sévère. Notez que les petits variants incluent les SNVs et les insertion / délétion, alors que les grands variants comprennent les variants structuraux et les CNVs (500 pb).

*D'après Gilissen et al. Nature 2014*



**Figure 10 – Chevauchement géniques des pathologies neuro-développementales.**

Visser *et al.* ont recueilli les mutations *de novo* identifiées par les études de séquençage exomique en trio publiées dans des troubles du développement neurologique : schizophrénie (SCZ), déficience intellectuelle (ID), encéphalopathie épileptique (EE), troubles du spectre autistique (ASD). Pour évaluer l'importance du chevauchement des mutations perte de fonction (LoF) entre ces quatre pathologies, Visser *et al.* ont effectué 10 000 simulations avec le nombre total de mutations *de novo* identifiées.

a – Nombre de gènes retrouvés avec des mutations LoF *de novo* communes entre deux, trois et quatre troubles neurodéveloppementaux indiqués par des rectangles. Les symboles diamant indiquent le nombre réel de gènes avec des mutations *de novo* impliqués dans les troubles neuro-développementaux.

b- Diagramme de Venn montrant le chevauchement génique des mutations LoF.

*D'après Visser et al., Nat Rev Genet. 2016*

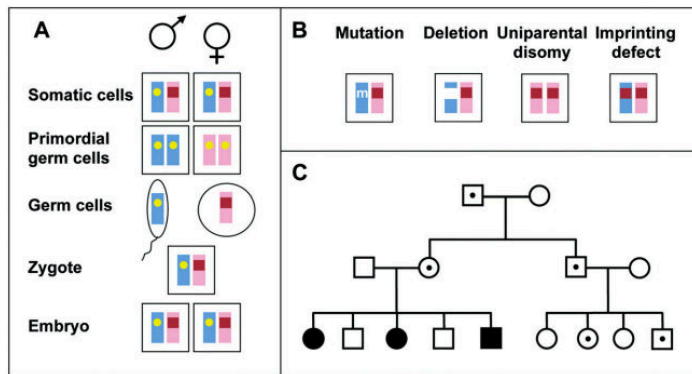
## Maladies autosomiques dominantes

Grâce aux nouvelles technologies de séquençage de l'ADN, les équipes de de Ligt et Rauch, en 2012, ont atteint un taux diagnostic compris entre 24 à 33% pour les DI dues à des mutations *de novo* (17,105,106). C'est par l'utilisation d'une stratégie de séquençage exomique en trio qu'il a été montré un « paradigme de mutation *de novo* » comme cause majeure de DI sévère et modérée (49,105,106,112-114).

En effet, Lynch et Roach *et al.* ont montré en 2010 que le taux mutationnel chez l'homme par génération était élevé et compris entre  $7,6 \times 10^{-9}$  et  $2,2 \times 10^{-8}$  (115,116). Chaque nouveau-né est censé avoir acquis 50 à 100 nouvelles mutations dans son génome, avec 1 à 2 affectant la séquence codante (112,117). Il est également montré que ces mutations *de novo* de la lignée germinale ont une origine préférentielle paternelle et qu'un âge paternel plus élevé à la conception entraîne une augmentation du nombre de mutations *de novo* dans la progéniture (118-120). Ces études et ce paradigme expliquent que le nombre de cas de DI sévère reste constant alors que la procréation des personnes concernées est fortement diminuée (17,121).

En 2014, Gilissen *et al.* montre par le séquençage génome entier d'une cohorte d'individus atteints de DI sévère que dans 60% des cas un variant *de novo* est en cause ; il s'agit dans 39% des cas d'un SNV et dans 21% d'un CNV (figure 9) (49). Par l'utilisation des techniques de séquençage à haut débit, il a pu être mis en évidence, parallèlement à l'identification de nouveaux gènes et de nouveaux syndromes, des causes génétiques communes à des pathologies ayant un chevauchement phénotypique comme la DI, l'autisme, les pathologies psychiatriques, l'épilepsie (37,117,122,123) (Figure 10). Il ne faut pas omettre, par ailleurs, les nombreuses pathologies génétiques syndromiques bien connues dans leurs formes familiales et où la DI est de sévérité très variable, tels que la sclérose tubéreuse de Bourneville (incidence 1/6000), la neurofibromatose de type 1 (incidence 1/4000), la dystrophie myotonique de Steinert (incidence 1/8000) (47,124).

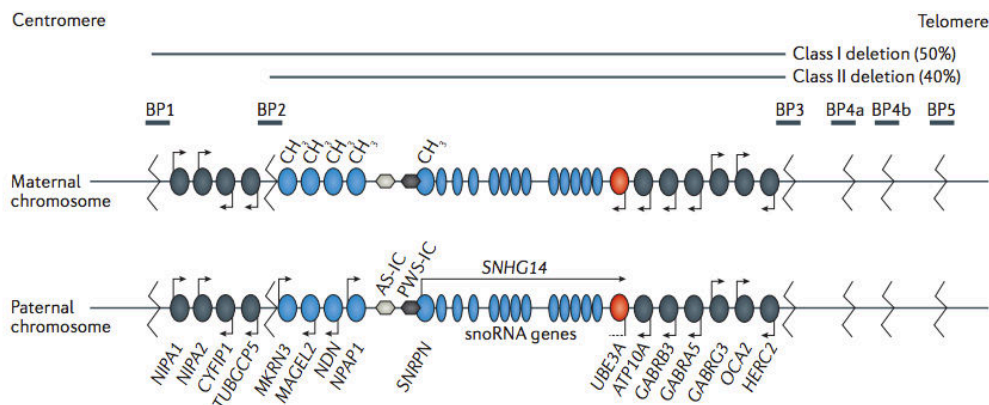
Enfin, bien que le mode de transmission autosomique dominant soit peu fréquemment retrouvé dans les formes non syndromiques de DI, c'est initialement le séquençage de gènes candidats qui a permis d'identifier des gènes comme *SYNGAP1*, *STXBP1*, et *SHANK3* (10,125,126). L'avènement des techniques de séquençage à haut débit a permis de poursuivre l'identification de nouveaux gènes comme par exemple *KIF1A*, *GRIN1*, *CACNG2*, et *EPB41L1* impliqués dans les systèmes glutamatergiques (127).



**Figure 11 – Empreinte génomique et pathologies de l’empreinte.**

(A) Les empreintes génomiques sont effacées dans les cellules germinales primordiales, puis établies pendant la gamétogenèse et maintenues chez l’embryon. Pour plus de clarté, une seule paire de chromosomes homologues a été représentée (un chromosome paternel en bleu, et un maternel en rose). Le gène paternel exprimé est représenté par un point jaune, et la région maternelle méthylée, réprimant l’expression du même gène, par un carré rouge. Un seul des quatre gamètes possibles est schématisé. Bien que la majorité des loci soumis à empreinte portent une marque de méthylation maternelle, certains portent une marque de méthylation paternelle et ne sont exprimés qu’à partir du chromosome maternel (non représenté). (B) Les altérations génétiques et épigénétiques affectant un locus soumis à empreinte peuvent être 1) une mutation (m), 2) une délétion, 3) une disomie uniparentale et 4) un défaut d’empreinte affectant un gène (C) Pedigree montrant un héritage autosomique dominant mais avec une pénétrance spécifique au parent d’origine. Une mutation dans un gène soumis à l’empreinte maternel ne s’exprimera avec un phénotype uniquement après une transmission maternelle. Symbole rempli : individu atteint; symbole ponctué : individu porteur sain.

*D’après B Horsthemke. J Pathol. 2014 (123)*



**Figure 12 – Région chromosomique 15q11.2-q13.**

Représentation schématique de la région 15q11.2-q13, les gènes paternels soumis à empreinte sont représentés par des ellipses bleues, les gènes maternels soumis à empreinte par des ellipses rouges, et les gènes exprimés par les deux allèles parentaux par des ellipses noires. L’orientation de la transcription est indiquée par des flèches horizontales. AS-IC : centre d’empreinte du syndrome d’Angelman; BP : point de cassure; CH3 : méthylation; PWS-IC, centre d’empreinte du syndrome de Prader-Willi; snoRNA : petit ARN nucléaire; SNRPN : petite protéine N associée à la ribonucléoprotéine nucléaire; UBE3A : ubiquitine-protéine ligase E3A.

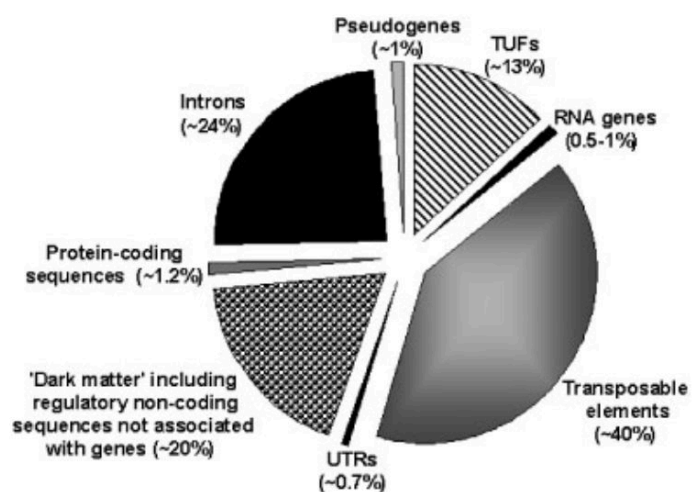
*D’après K Buiting Nature Reviews Neurology. 2014*

## c) Anomalies non mendéliennes

### Anomalies de l’empreinte

Les pathologies dues aux anomalies de l’empreinte constituent un groupe de 12 maladies congénitales avec une étiologie épigénétique (table 1 en annexe) (128). Contrairement à la majorité des gènes qui ont une expression bi-allélique, les gènes soumis à empreinte ont une expression mono-allélique qui dépend de son origine parentale, c'est-à-dire de l'allèle maternel ou paternel. Par conséquent, la perte de fonction de l'allèle actif ne peut être compensée par l'autre allèle. Dans le génome, il existe plusieurs régions chromosomiques ou gènes soumis à empreinte. A l’heure actuelle, 99 gènes sont reportés comme soumis à empreinte (<http://www.geneimprint.com/site/home>). Beaucoup d’entre eux sont regroupés en clusters. L’expression de ces gènes peut être tissu et/ou temps spécifiques. Sur le plan moléculaire, l’expression de ces gènes est influencée par la méthylation des résidus de CpG dans l’ADN génomique, l’interférence avec les ARN non codants (ncARN), les changements dans la structure de la chromatine, et les modifications post-traductionnelles des histones. Quatre types de changements moléculaires différents ont été associés aux pathologies de l’empreinte, 1) la présence d’un CNV de la région soumise à empreinte, 2) une disomie uniparentale (UPD), 3) un défaut d’empreinte (« épimutations »), et 4) des mutations ponctuelles dans un gène soumis à empreinte (figure 11). Les pathologies soumises à empreinte montrent plusieurs différences par rapport aux maladies héréditaires mendéliennes classiques. En effet, lorsqu’il est hérité, un CNV ou une mutation ponctuelle qui est habituellement de transmission autosomique dominante, va avoir une pénétrance qui dépend du sexe du parent qui le transmet (128).

La majorité des 12 pathologies soumises à empreinte présente des caractéristiques phénotypiques communes : anomalie de croissance pré et/ou post-natale, hypo ou hyperglycémies, troubles alimentaires, DI et/ou troubles du comportement, puberté précoce (figure 1 en annexe). Concernant les causes de DI liées à des pathologies soumises à empreinte, le syndrome de Prader-Willi (PWS) et le syndrome d’Angelman (AS) sont bien connus (figure 12). Les principales caractéristiques du PWS comprennent une hypotonie néonatale avec difficultés alimentaires, suivie d’une obésité progressive dans l’enfance associée à une hyperphagie, une DI et un possible hypopituitarisme. Le PWS peut être causée par une délétion 15q11-q13 d’origine paternelle (70%), une unidisomie maternelle du chromosome 15 (25%) ou un défaut d’empreinte paternelle (5 %), ce qui a entraîné l’absence d’expression des gènes de la région 15q11-q13 (129). Les principales caractéristiques cliniques du AS comprennent une microcéphalie, une épilepsie, une ataxie, une hypotonie avec hyperreflexie et un retard psycho-moteur puis cognitif. L’AS peut être causée par une délétion 15q11-q13 d’origine maternelle (75%), une unidisomie paternelle du chromosome 15 (1-2%) ou un



**Figure 13 - Le «fonctionome»:** types de séquences d'ADN fonctionnelles ou potentiellement fonctionnelles dans le génome humain pouvant être porteurs de mutations pathogènes. Les proportions relatives de la séquence du génome humain sont conformes au Consortium international de séquençage du génome humain (International Human Genome Sequencing Consortium - 2004).

*D'après DN Cooper et al. Hum Mutat. 2010*

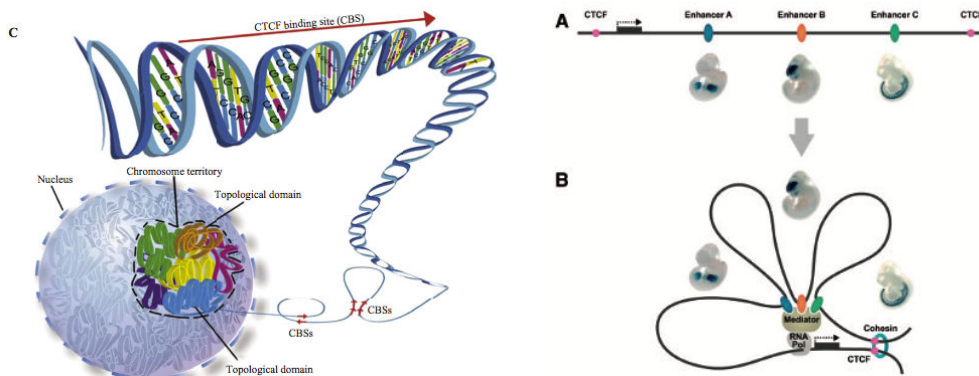
défaut d'empreinte maternelle (1-3 %), ce qui a entraîné l'absence d'expression du gène *UBE3A* de la région 15q11-q13 15, et des mutations dans le gène *UBE3A* (5-10%) (130,131).

### **Anomalies non codantes**

Le génome humain est constitué de seulement 2,5% de séquences codantes mais plus de 3% des mutations sont situées en dehors de ces séquences (17,132). Ces anomalies non codantes (figure 13) vont être de plus en plus mises en évidence du fait de l'utilisation de techniques telles que 1) l'immunoprécipitation de chromatine (ChIP), une technique qui détecte les interactions directes ou indirectes d'une protéine avec l'ADN, 2) couplée au séquençage à haut débit, qui permet d'établir, à l'échelle du génome, la distribution d'un grand nombre de protéines et de séquences régulatrices importantes pour l'expression des gènes, 3) de l'utilisation de la technologie CRISPR-Cas9 pour étudier rapidement les conséquences phénotypiques des mutations dans ces éléments non codants (133-135). Il faut toutefois noter que l'interprétation des variations du génome non codant reste encore difficile, c'est la raison pour laquelle le consortium ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) a été créé afin d'étudier et d'annoter le génome non codant (136-140). Les analyses du consortium ENCODE suggèrent qu'environ 80% du génome contient des éléments liés à une fonction biochimique (138). Ces anomalies des séquences non codantes pourraient donc être à l'origine de pathologies humaines, dont la DI, encore non expliquées (132,141)

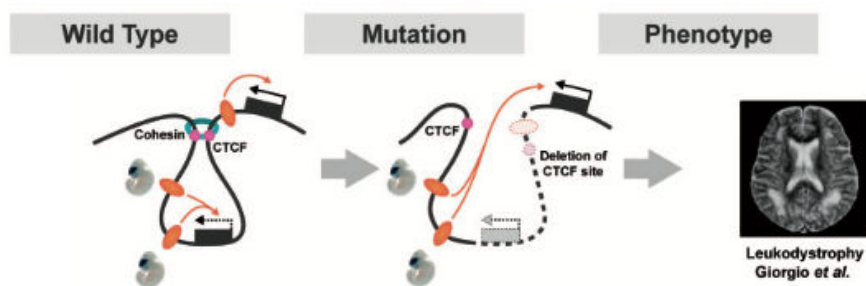
### **Anomalies introniques**

Les mutations dans les séquences des jonctions d'épissage exon-intron représentent 10% de toutes les mutations mises en évidence avec les méthodes classiques de séquençage des gènes (132,142). D'autres mutations introniques se localisant hors de ces jonctions peuvent ne pas être détectées à moins d'entraîner un épissage aberrant (saut d'exon ou utilisation d'un site cryptique d'épissage) (143). Jusqu'à maintenant les mutations introniques profondes comptaient pour moins de 1% des mutations d'épissage connues (table 2 en annexe). Ainsi, par exemple, des mutations introniques profondes ont été mises en évidence dans les gènes *OTC* ou *NF1* (table 2 en annexe) (144,145).



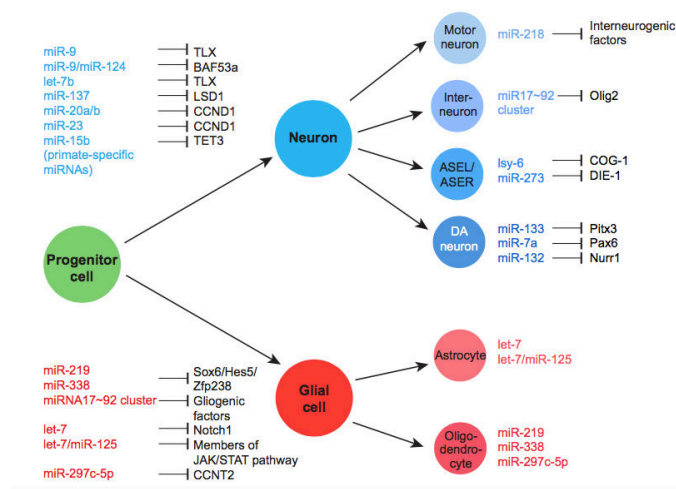
**Figure 14 – Séquence en 1D au génome en 3D : Interaction des promoteurs dans le noyau via la boucle d'ADN.**

*D'après H Huang et Q Wu. Journal of Genetics and Genomics. 2016*  
*D'après M Spielmann et S Mundlos. Human Molecular Genetics. 2016*



**Figure 15 – Anomalies des TAD et pathologie neuro-développementale.**

*D'après M Spielmann et S Mundlos. Human Molecular Genetics. 2016*



**Figure 16 - Fonction des miARN dans la détermination des cellules neuronales et gliales.**

Les interactions spécifiques de miARNs impliqués dans la différenciation des cellules progénitrices en cellules neuronales ou gliales et la spécialisation des cellules neuronales. Les miARNs neurogéniques sont indiqués en bleu, les miARNs gliogéniques en rouge et les gènes cibles en noir.

*D'après M Rajman et G Schratt. Development. 2017*

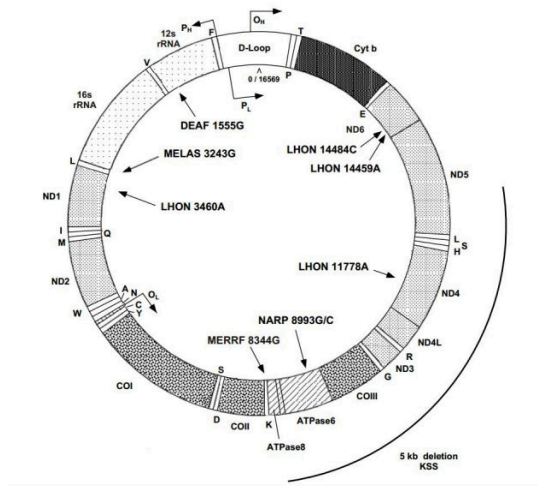
### **Anomalies dans les régions régulatrices**

La régulation des gènes implique habituellement deux types distincts d'éléments en cis : 1) le promoteur et des éléments de régulation proche, appelés *enhancers* et *silencers*, situés à moins de 1 kb du site d'initiation de la transcription, et 2) des éléments de régulation distaux, également *enhancers* et *silencers*, qui peuvent se localiser à plus de 1 Mb. Le contact, entre ces éléments distaux et le promoteur est réalisé par la mise en boucle de la séquence d'ADN, médié par des protéines telles que le médiateur, le CTCF et les cohésines. Une fois le contact effectué, l'expression ou la répression génique est effectuée (figures 14 a et b). L'organisation 3D du génome dans le noyau est directement liée à la régulation des gènes. L'utilisation de technologies tel que le ChIP-Seq a permis de révéler une organisation de la chromatine à l'échelle de la Mb, désignée comme domaines d'association topologique ou TADs (146,147). La majorité des anomalies des TADs est associée à des malformations osseuses (tables 3 et 4 en annexe) (132). Toutefois, une délétion d'un TAD a été identifiée comme une cause de leucodystrophie démyélinisante d'apparition à l'âge adulte de transmission autosomique dominante. Ce phénotype est généralement associé à des duplications du gène *LMNB1*. Dans une famille, une délétion d'un TAD a entraîné une modification de l'expression de *LMNB1* due à une interaction anormale entre l'*enhancer* et le promoteur (figure 15) (141,148,149).

### **Anomalies dans des gènes ne codant pas pour des protéines**

Un certain nombre de mutations dans divers gènes d'ARN nucléolique, de microARN (miARN) et d'ARN non codants plus longs (lncARN) ont été rapporté dans des pathologies humaines (table 5 en annexe) (132,150). Si nous prenons l'exemple des miARNs, il s'agit petits ARNs non codants qui sont impliqués dans la répression des gènes (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993) et, donc, peuvent réguler une vaste gamme de processus cellulaires dont les processus neuronaux et gliaux (figure 16) (151-153). Il a été proposé que les miARNs puissent réguler les gènes avec une spécificité temps et tissus dépendante. Ceci est le cas dans le système nerveux, où des miARNs ont été décrits comme régulant l'expression de gènes à des stades particuliers du développement, et dans des types de cellules neuronales (153). En ce qui concerne la DI, Sahoo *et al.*, a démontré l'implication du HBII-85 C/D box small nucleolar RNA cluster dans un phénotype PWS (154).

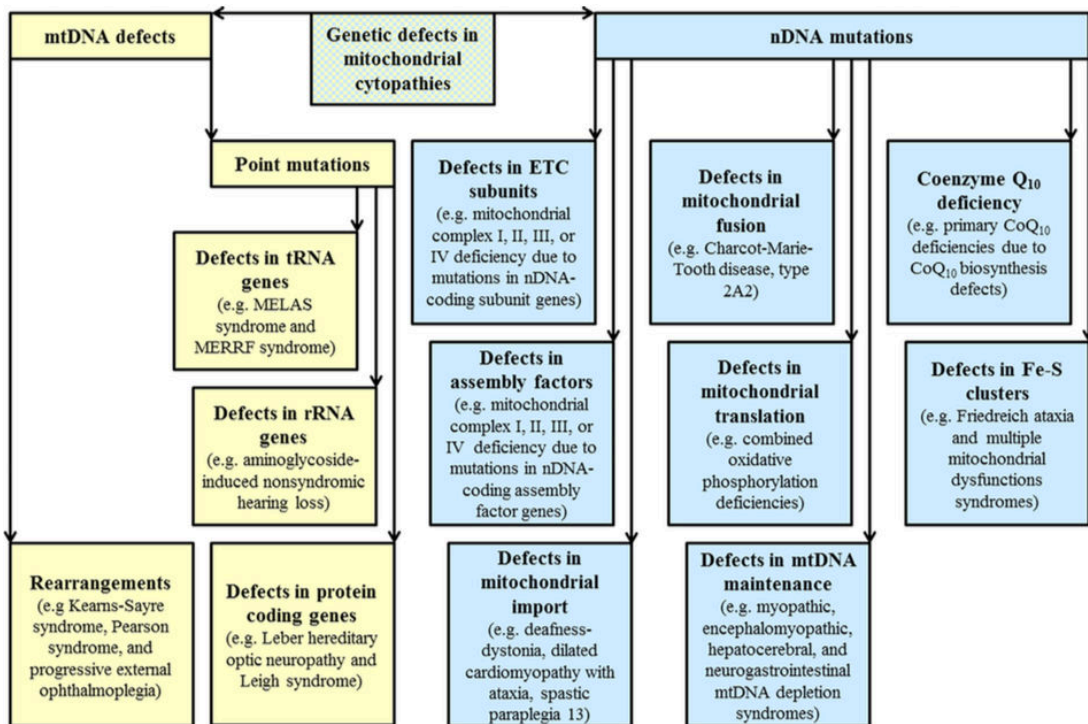




**Figure 17 - La carte de l'ADNmt humain.**

L'ADNmt est composé d'un brin lourd et d'un brin léger. L'emplacement de certaines mutations pathogènes dans le génome de 16 549 paires de bases est précisé par des flèches.

D'après <http://www.mitomap.org>



**Figure 18 - Anomalies génétiques de l'ADNmt et l'ADNn conduisant à un dysfonctionnement mitochondrial (MELAS: encéphalomyopie mitochondriale avec acidose lactique et épisodes de type AVC, MERRF: épilepsie myoclonique à fibres rouges déchiquetées).**

D'après AW. El-Hattab, et F Scaglia. Cell Calcium. 2016

## Pathologies mitochondriales

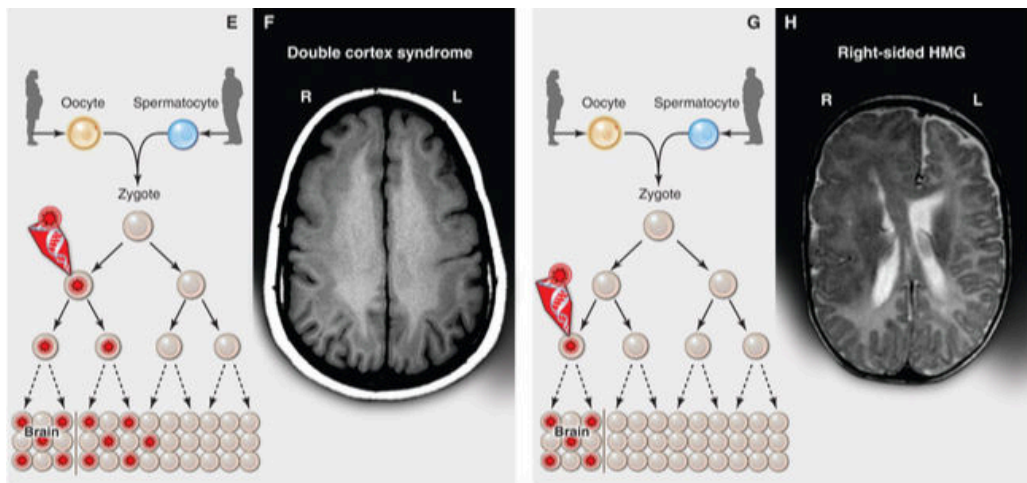
Les pathologies impliquant des défauts de la conversion énergétique mitochondriale sont nombreuses et hétérogènes concernant plus de 300 entités clinico-biologiques. La plupart des protéines mitochondriales sont codées par l'ADN nucléaire (ADNn), alors qu'une très petite fraction est codée par l'ADN mitochondrial (ADNmt). L'ADNmt est polyploïde, et le nombre de copies dans une cellule varie de 1000 à 5000. L'ADNmt est une molécule circulaire de 16 549 paires de bases. Une partie double-brin porte les gènes qui codent pour 13 sous-unités de la chaîne respiratoire mitochondriale, pour les 2 ARN ribosomiaux et les 22 ARN de transfert nécessaires à la synthèse protéique. Une partie triple-brin appelée D-loop porte des éléments de régulation (figure 17).

Les défauts de l'ADNmt peuvent être soit des mutations ponctuelles, soit des réarrangements. Les mutations ponctuelles dans l'ADNmt peuvent affecter les gènes codant pour des protéines ou les gènes codant pour des ARN de transfert ou des ARN ribosomiaux. Ces mutations sont uniquement héritées de la mère et sont généralement associées à des phénotypes très variables. Les réarrangements de l'ADNmt incluent des délétions et des duplications. Ces réarrangements sont habituellement *de novo*. Les mutations dans l'ADNmt ou les gènes de l'ADNn liés aux mitochondries peuvent entraîner un dysfonctionnement mitochondrial qui conduit à une large gamme de perturbations cellulaires incluant l'anomalie de l'homéostasie du calcium, la production excessive de ROS (reactive oxygen species), une dysrégulation de l'apoptose et une production d'énergie insuffisante pour répondre aux besoins de divers organes, en particulier ceux qui ont une forte demande énergétique.

Les manifestations cliniques des maladies mitochondriales varient selon le niveau d'atteinte de la fonction mitochondriale dans les tissus et organes concernés. Ces manifestations comprennent l'épilepsie, la DI, les myopathies, les atteintes hépatiques, endocriniennes et/ou néphrologiques (figure 18)(155,156).

## Mutations somatiques

La DI peut être associée à des mutations somatiques, *de novo*, apparaissant pendant la période post-zygotique et s'accumulant dans les cellules pendant le développement et tout au long de la vie. Ces mutations peuvent entraîner une maladie si elles affectent un nombre suffisant de cellules. Dans le cas de la DI, l'hypothèse est que les mutations somatiques dans les précurseurs neuronaux ou les neurones contribuent au phénotype. La question reste cependant de savoir comment identifier ces mutations et comment évaluer leur impact sur la DI (17,157). Le séquençage d'une seule cellule



**Figure 19 - Mutations somatiques, *de novo*, responsables d'une malformation cérébrale et d'une déficience intellectuelle.**

(E) Une mutation post-zygotique précoce entraîne une mutation en mosaïque dans la plupart des tissus de l'organisme. Cet exemple, illustré par l'IRM axiale pondérée en séquence T1 (F), a été observé dans des cas de mosaïque du syndrome du double cortex impliquant le gène *DCX*. Une bande de substance grise est visualisée en interne du cortex cérébral. (G) Une mutation post-zygotique tardive ne sera présente que dans certains tissus en mosaïque, dans ce cas, dans la moitié du cerveau. C'est le modèle observé dans certains cas d'hémimégalencéphalie avec des mutations dans la voie PI3K-AKT-mTOR. (H) IRM axiale pondérée en séquence T2 qui montre l'hémimégalencéphalie droite, caractérisée ici par un l'hémisphère droit plus grand, une matière grise anormalement épaisse et sombre au niveau antérieur, des hétéropies périventriculaires et un signal anormal de la substance blanche. (R, à droite, L, à gauche).

*D'après Poduri et al. Science. 2013*

(Single-cell sequencing), bien que sujet à des biais d'amplification, a montré que des CNVs somatiques étaient présents dans la plupart des neurones humains (17,158,159). De plus, des mutations somatiques dans les gènes *LIS1* et *DCX* ont été impliquées dans des malformations corticales localisées à type d'anomalies de la gyration (figure 19) (160-162). Plus récemment, des mutations somatiques dans la voie PI3K-AKT-mTOR ont été identifiées comme la cause de dysplasie corticale, d'épilepsie avec ou sans DI et d'hémimégalencéphalie (figure 19) (163-170). Cette malformation cérébrale est caractérisée par un hémisphère cérébral élargi et mal formé. La présentation clinique comprend généralement une DI et une épilepsie sévère et pharmacorésistante nécessitant souvent une intervention chirurgicale (171,172).

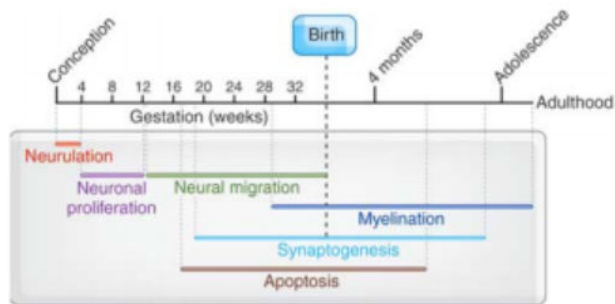
#### **d) Hérité complexe de la DI**

Les études de corrélation génotype-phénotype dans la DI montrent que les phénotypes ne sont pas toujours complètement expliqués par une mutation dans un seul gène. Des personnes portant la même mutation peuvent avoir un phénotype variable. Cette variation phénotypique pourrait être expliquée par la présence d'une ou plusieurs variations nucléotidiques ou de CNVs pouvant modifier l'expressivité et la pénétrance de la maladie (17,68,173-175). L'analyse systématique des données des CNVs, chez ces personnes et leurs parents, est importante et pourrait expliquer en partie l'hétérogénéité phénotypique.

Jusqu'à présent, ce type d'hérité complexe n'a été étudié que pour les variations génomiques les plus rares et les plus délétères, c'est-à-dire des CNVs de novo (> 400 kb) ainsi que des mutations ponctuelles de novo qui affectent des gènes ayant une fonction cérébrale. Une analyse plus exhaustive de ces formes complexes d'hérité dans la DI nécessitera d'étudier l'ensemble des données de séquençage génomique chez les patients et les membres de leur famille, et de les confronter aux données cliniques (17).

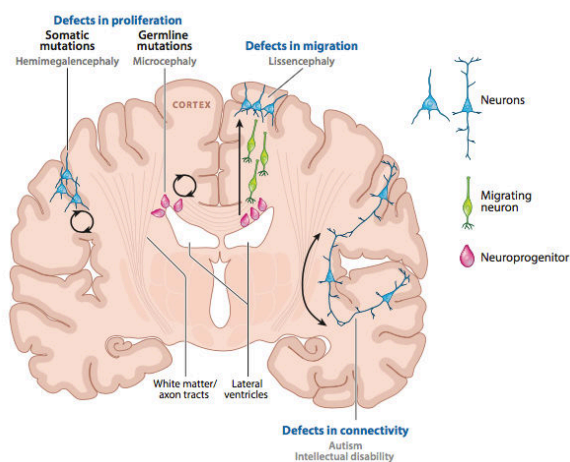
Il a également été montré qu'un individu pouvait être simultanément porteur de deux anomalies et pathologies génétiques distinctes expliquant un phénotype plus complexe (B Gilbert, communication personnelle).

Enfin, les interactions gènes - environnement pourraient également participer à cette variabilité phénotypique.



**Figure 20 - Chronologie des processus majeurs du développement cérébral.**

*D'après GZ Tau and BS Peterson. Neuropsychopharmacology Reviews. 2010*



**Figure 21 – Figure schématisant les conséquences d'une anomalie altérant un stade du développement cérébral.**

*D'après W F. Hu, M H. Chahrour, et C A. Walsh. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2014*

**Figure 22 - Schéma du développement du cortex.**

Le développement du cortex commence au niveau de la zone ventriculaire (VZ) pour les neurones de projection excitateurs et au niveau des éminences ganglionnaires pour les interneurons inhibiteurs. Les deux populations de progéniteurs ont plusieurs cycles de prolifération avant de se différencier en neurones et de migrer vers la plaque corticale, où les connexions interneuronales se créent. Abréviations: VZ : zone ventriculaire, SP : sous-plaque; SVZ : zone subventriculaire.

*D'après W F. Hu, M H. Chahrour, et C A. Walsh. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2014*

### **3. Fonctions des gènes impliqués dans la déficience intellectuelle**

Le cerveau est un organe constitué de différents types de cellules interconnectées (17). Son développement est un processus complexe, dynamique et continu débutant pendant la grossesse et se poursuivant pendant la période post-natale et jusqu'après l'adolescence. Il est constitué par une succession et un chevauchement de différentes étapes : neurulation, prolifération (avec des mitoses symétriques et asymétriques), migration (radiale et tangentielle), différenciation, synaptogenèse, apoptose, gliogénèse et myélinisation (figure 20) (176). Ces étapes, sous l'influence de facteurs environnementaux et génétiques, sont temps et tissus dépendant. Une anomalie altérant une ou plusieurs de ces étapes (exposition à un toxique, réarrangement chromosomique, mutation génique..) entraîne des conséquences sur le développement ou le fonctionnement cérébral (figure 21) (17).

Dans ce chapitre, nous nous concentrerons sur les gènes, impliqués dans la DI modérée à sévère, et leurs fonctions dans l'organisation et le fonctionnement cérébral. Nous avons divisé ces fonctions en trois grands groupes :

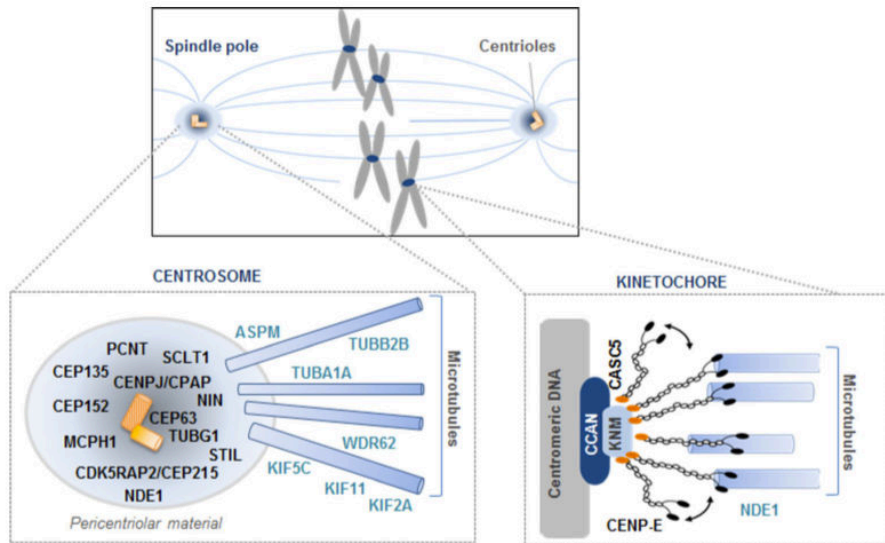
- 1) la neurogénèse, la migration neuronale et anomalies du cortex,
- 2) la formation, maturation et plasticité synaptique,
- 3) la régulation épigénétique de la transcription.

Chaque groupe sera illustré par des exemples.

#### **3.1. Neurogénèse, migration neuronale et anomalie du cortex**

Le cortex humain se compose de six couches histologiques distinctes. La neurogénèse débute au niveau de progéniteurs neuroépithéliaux bordant les ventricules latéraux. Ces progéniteurs se divisent pour développer un pool et donner ensuite naissance à des progéniteurs intermédiaires, qui eux-mêmes se divisent et donnent naissance à des neurones. Ces derniers migrent des zones ventriculaires vers la surface piale du cerveau pour former la plaque corticale, où se feront les connexions interneuronales (figure 22) (162,177).

Dans les anomalies de la neurogénèse associées à une DI, on retrouve les microcéphalies. Elles ont comme origine un défaut de la fonction des microtubules et/ou du centrosome, une fonction ciliaire altérée, ou une anomalie dans les voies de réparation de l'ADN (tables 6 et 7 en annexe) (162,178). Le rôle du cytosquelette est essentiel pour la neurogénèse, d'une part dans la régulation de la division cellulaire et



**Figure 23 - La répartition des défauts génétiques sous-jacents à la microcéphalie congénitale attribuable au centrosome, pole du fuseau et au kinetochore.**

La figure du haut représente une mitose normale. La figure en bas à gauche, représente le centrosome et les protéines associées à une microcéphalie congénitale (les protéines en noir sont des protéines spécifiques au centrosome tandis que celles en bleu sont des constituants du pôle du fuseau). La figure en bas à droite représente le kinetochore, la protéine CENP-E est représentée à partir du kinetochore via sa grande région qui est enroulée en spirale sur des microtubules. La section orange de la protéine CENP-E désigne son domaine moteur kinesin. CCAN: réseau constitutif associé au centromère.

*D'après D Alcantara et M O'Driscoll. Am J Med Genet C Semin Med Genet.2014*



d'autre part dans la migration. Un défaut de prolifération des progéniteurs entraîne une diminution du nombre de neurones et une plus petite taille du cerveau. Ce défaut de prolifération peut être dû à des anomalies dans les gènes codant pour des protéines centrosomales et pericentriolaires (figure 23).

Les centrioles sont des structures formées de microtubules qui composent les noyaux des centrosomes, qui aident à maintenir le cytosquelette cellulaire et coordonnent la ségrégation des chromosomes pendant la méiose et la mitose (162,179,180). De nombreux gènes, tels que *MCPH1*, *WDR62* (*MCPH2*), *CEP215* (*MCPH3*), *CASC5* (*MCPH4*), *ASPM* (*MCPH5*), *CENPJ* (*MCPH6*), *STIL* (*MCPH7*), *CEP135* (*MCPH8*), *CEP152* (*MCPH9*), impliqués dans l'organisation des centrosomes et du pôle du fuseau, sont mutés dans des tableaux de microcéphalie congénitale (178,181-189).

Plus spécifiquement, l'implication du gène *WDR62* dans une microcéphalie de transmission autosomique récessive a été mise en évidence en 2010 (183-185). *WDR62* code pour une protéine du même nom appartenant à la famille des protéines WD40 repeats. Cette protéine est exprimée au niveau des précurseurs neuronaux et des neurones post-mitotiques dans le cerveau en formation. Elle se localise au niveau du pôle du fuseau dans la cellule en division. Des mutations dans *WDR62* sont impliquées dans la microcéphalie mais également des anomalies corticales (pachygyrie) et une hypoplasie du corps calleux. Le modèle murin mutant et Knock-out (KO) confirme qu'une anomalie de *WDR62* entraîne une diminution des progéniteurs neuronaux, une instabilité du pôle du fuseau et une activation du check point de l'assemblage du fuseau, entraînant un arrêt mitotique et une mort cellulaire pouvant alors expliquer la microcéphalie (190,191).

Le phénomène de migration fait suite à la neurogénèse. Durant le développement cérébral, il existe deux types de migration : la migration radiale et la migration tangentielle. Pendant la migration radiale, les neurones pyramidaux corticaux excitateurs, nés des progéniteurs neuronaux dans la zone ventriculaire, migrent vers la plaque corticale. Dans un flux de migration séquentielle, les neurones vont occuper des couches plus superficielles de la plaque, ce qui génère un schéma de couches corticales. La migration radiale se produit largement dans le cortex cérébral et l'hippocampe pendant l'embryogénèse. Pendant la migration tangentielle, les interneurons inhibiteurs, qui sont générés à partir des différents types de progéniteurs au niveau de l'éminence ganglionnaire médiale ou latérale, migrent vers le néocortex (192).

Les pathologies de la migration neuronale peuvent être dues à une anomalie qui peut prendre place dès le début du processus, dans la migration elle-même ou à la fin de cette dernière (17). Dans ce groupe de pathologies, on retrouve les lissencéphalies qui sont définies par une perte des gyri à la surface cérébrale et un épaississement du cortex dû à une désorganisation de la structure laminée formée normalement par les





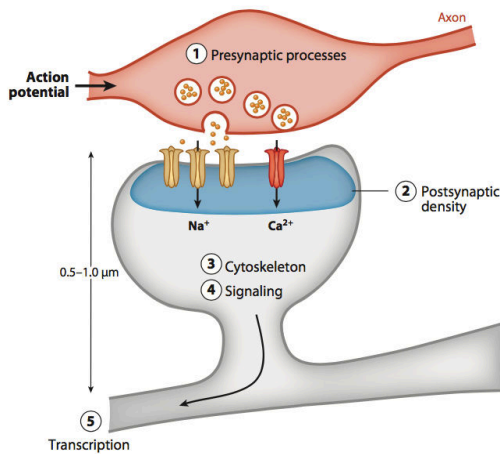
neurones (162,193). Les individus porteurs d'une lissencéphalie présente comme signes cardinaux un retard psychomoteur sévère et une DI ainsi qu'une épilepsie (194). Les lissencéphalies sont elles-même classifiées en 1) lissencéphalies classiques où trois gènes sont impliqués : *LIS1*, *DCX* et *TUBA1A*, 2) les tubulinopathies qui incluent les gènes *TUBB2B* (codant pour une isoforme de bêta-tubuline), *TUBB3* et *TUBB5* (encodant des isoformes de bêta-tubuline neuronales) et *KIF5C* (codant une kinésine spécifique de neurone), 3) les lissencéphalies de type 2 qui impliquent les gènes de la voies de le O-glycosylation (*POMT1*, *POMT2*, *POMGNT1*, *LARGE*, *FKTN*, and *FKRP*) (162,195). L'ensemble de ces gènes codent pour des protéines associées aux microtubules et à l'actine et jouent un rôle important dans la régulation de la dynamique du cytosquelette des microtubules et de l'actine durant la migration neuronale (162,192).

Enfin, comme nous l'avons vu précédemment dans les étiologies des DI, des malformations corticales localisées peuvent être dues à des mutations somatiques.

### **3.2. Formation, maturation et plasticité synaptique**

Le cerveau est constitué d'un vaste réseau de neurones qui communiquent entre eux par des jonctions cellulaires spécialisées appelées synapses. Durant les premières années de vie, il existe une surproduction de synapses qui explique qu'un enfant de deux ans a deux fois plus de synapses qu'un adulte. Jusqu'à l'âge de 16 ans, le cerveau va être sujet à une réorganisation plastique intense des connexions synaptiques via la suppression de neurones par des phénomènes d'apoptose, de prolifération, d'élimination et de modulation synaptiques (196-200). Ces phénomènes expliquent la plasticité et la capacité d'adaptation accrues des enfants pour l'apprentissage et leur récupération suite à des lésions cérébrales précoces (198,200). Cette capacité qu'a le cerveau de s'adapter et d'intégrer de nouvelles informations fait appel à la plasticité synaptique, phénomène qui permet aux synapses de se modifier dans leur structure et dans leur fonctionnement en réponse à différents stimuli (201,202).

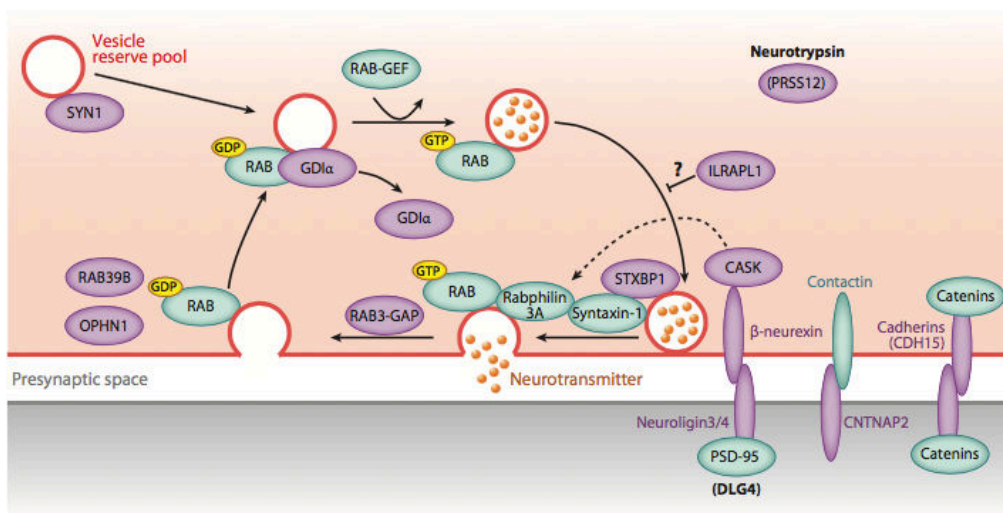
Les neurones sont des cellules hautement polarisées qui présentent une morphologie et une fonction complexes. Dans le cortex cérébral, la plupart des synapses sont des synapses chimiques au niveau desquelles un neurotransmetteur est libéré au niveau du bouton du neurone pré-synaptique. Ce neurotransmetteur diffuse à travers la fente synaptique pour agir au niveau de récepteurs du bouton du neurone post-synaptique. Chez l'homme, la plupart des synapses excitatrices utilisent le glutamate comme neurotransmetteur (199). Au niveau des synapses excitatrices, il a été montré que des activations brèves et répétitives provoquent une augmentation persistante de l'efficacité de la transmission synaptique appelée potentialisation à long terme (LTP pour Long Term Potentiation). De même, de longues stimulations à faible fréquence induisent



**Figure 24 - Voies neuronales communes au niveau synaptique impliquées dans la déficience intellectuelle.**

Structure d'une synapse chimique typique reliant l'axone d'un neurone présynaptique à un bouton dendritique d'un neurone postsynaptique. 1) Suite à une stimulation, les vésicules contenant des neurotransmetteurs s'ancrent à la membrane cellulaire, fusionnent et libèrent leur contenu dans la fente synaptique. Les récepteurs aux neurotransmetteurs situés au niveau de la membrane cellulaire postsynaptique sont alors activés, ce qui entraîne la libération de seconds messagers, un changement dans la densité postsynaptique sous-jacente (PSD), l'ouverture de canaux ioniques et la génération d'un potentiel postsynaptique concomitant. 2) L'activation du récepteur déclenche une série d'événements de signalisation dans le PSD, y compris le transfert de récepteurs et la traduction locale de protéines. En outre, d'autres événements contribuent à la plasticité synaptique. 3) la réorganisation du cytosquelette, 4) l'activation des voies de signalisation cellulaire, 5) qui influe finalement sur le contrôle de l'expression de gènes neuronaux. Chacun de ces processus peut être perturbé par des anomalies génétiques et peuvent être observés chez les patients ayant une DI.

*D'après Hans van Bokhoven. Annu. Rev. Genet. 2011*



**Figure 25 - Formation, transport et fusion des vésicules dans l'espace présynaptique.**

Ce schéma simplifié ne montre qu'un sous-ensemble limité de protéines qui sont nécessaires aux différentes étapes dans l'espace présynaptique. De nombreuses protéines qui contrôlent ces étapes sont codées par des gènes qui sont mutés sous différentes formes d'identité (sombre violet).

*D'après Hans van Bokhoven. Annu. Rev. Genet. 2011*

une diminution de l'efficacité de la transmission synaptique à long terme ou LTD (Long Term Depression) (203,204). Ensemble, la LTP et la LTD régulent, à l'échelle synaptique, l'homéostasie et la fonction du réseau neuronal (205).

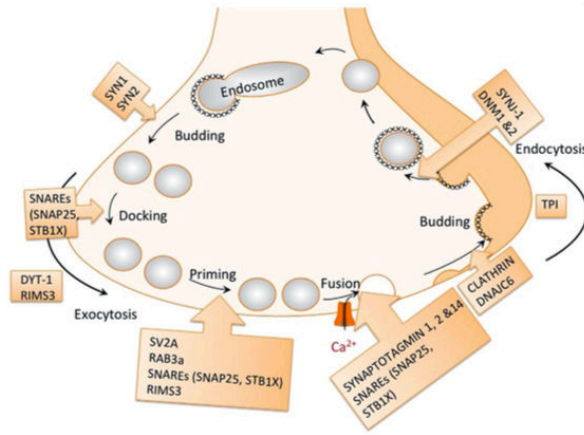
Les synapses et les dendrites ont une morphologie dynamique et peuvent subir des changements structuraux rapides en réponse à des stimuli. Ces changements structuraux ont été observés par des analyses histologiques de biopsies cérébrales, et des tissus post-mortem chez des individus porteurs de DI sans anomalie morphologique cérébrale, de trisomie 21, de trisomie 13, du syndrome de l'X Fragile ou du syndrome de Rett (48,206-208).

Des mutations dans les gènes codant pour les protéines synaptiques ont été associées aux pathologies neurodéveloppementales (DI, trouble du spectre autistique et schizophrénie) (123,209,210). En 2012, Grant *et al.* propose le terme de « synaptopathies » pour les pathologies ayant un dysfonctionnement synaptique comme étiologie commune (211). Sur le plan moléculaire, les gènes impliqués dans la DI vont être ceux codant pour des protéines ayant un rôle dans les processus présynaptiques, les complexes postsynaptiques, la dynamique du cytosquelette, les voies de transduction du signal intracellulaire, la régulation de la transcription et la modélisation épigénétique de la structure de la chromatine (figure 24) (48,200). Nous ne pourrions pas être exhaustifs mais nous prendrons des exemples qui nous semblent représentatifs de chaque processus.

### **3.2.1. Processus présynaptiques**

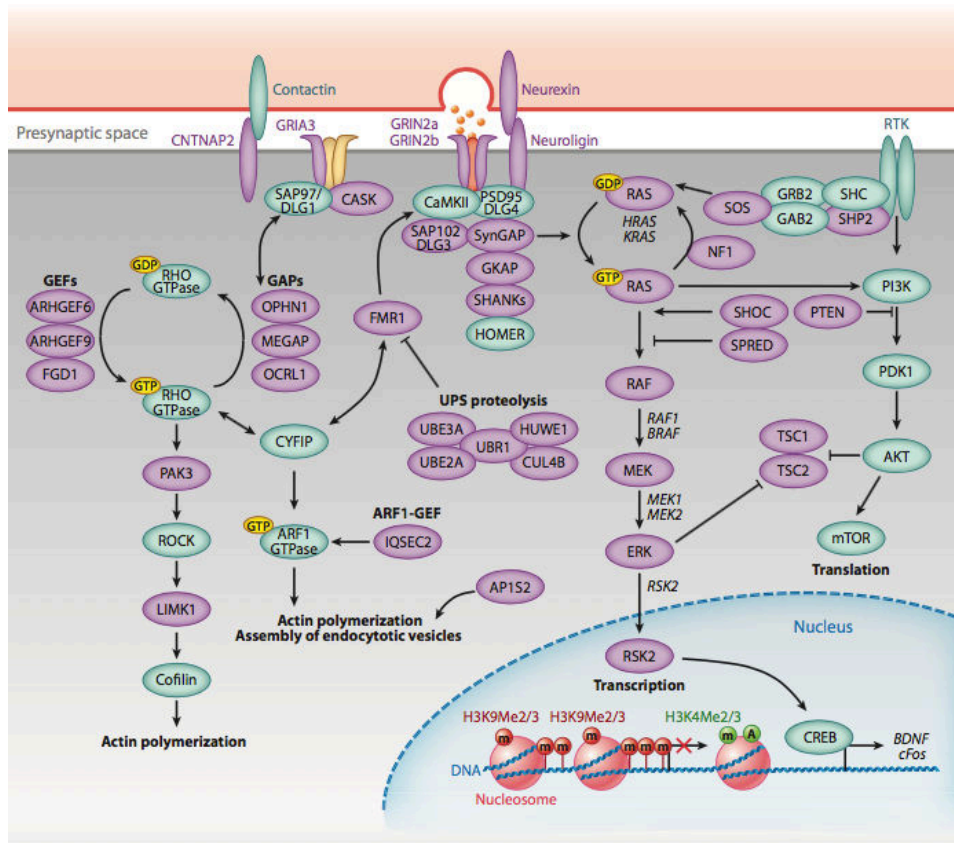
Le trafic intracellulaire neuronal joue un rôle clé dans la formation, le transport et la fusion des vésicules synaptiques contenant les neurotransmetteurs. Les vésicules contenant les neurotransmetteurs sont regroupés à la membrane pré-synaptique de l'axone-terminal. Suite à l'arrivée d'un potentiel d'action, et en réponse à une augmentation transitoire locale de la concentration de calcium, les vésicules synaptiques sont correctement ancrés, fusionnent avec la membrane pré-synaptique et libèrent leur contenu dans la fente synaptique (212,213).

Les protéines RAB, qui sont de petites GTPases, et qui appartiennent à la superfamille RAS, sont impliquées dans le bourgeonnement membranaire, la formation, la fission, le transport, l'ancrage, et la fusion des vésicules pré-synaptiques, via l'interaction avec d'autres protéines effectrices (214,215,213). Les protéines RAB passent d'un état inactif lié au Guanosine-50-DiPhosphate (GDP) à un état actif lié au Guanosine-50-TriPhosphate (GTP). À ce jour, 24 protéines RAB sont rapportées pour jouer un rôle au niveau du trafic neuronal cérébral (213,216). L'haploinsuffisance des protéines GDI $\alpha$  and Rab3GAP a été associée à une DI (figure 25) (48). En effet, les mutations dans les



**Figure 26 – Gènes et pathologies associés aux anomalies des vésicules présynaptiques.**

*D'après E. Cortès-Saladelafont et al. Semin Pediatr Neurol. 2016 (225)*



**Figure 27 - Réseaux des protéines postsynaptiques et voies de signalisation impliquées dans la déficience intellectuelle.**

Ce schéma montre les voies postsynaptiques les plus importantes: l'organisation de la densité postsynaptique, la dynamique du cytosquelette, les cascades de signalisation cellulaire et la régulation épigénétique de la transcription. Les protéines en violet ont été impliquées dans la DI. L'ADN dans le noyau est entouré de nucléosomes constitués d'histones. Certaines modifications des histones et de l'ADN sont indiquées: les modifications inhibitrices sont indiquées en rouge (méthylation de l'ADN (m) et méthylation de H3K9me2 / 3) et les modifications activatrices sont indiquées en vert (H3K4me2 / 3 et l'acétylation des histones (A)).

*D'après Hans van Bokhoven. Annu. Rev. Genet. 2011*

gènes *GDI1* et *RAB3GAP1* codant pour ces deux protéines ont été rapportés respectivement dans une DI non syndromique liée à l'X et dans le syndrome de Warburg Micro qui associe une microcéphalie, une dysplasie corticale, une hypoplasie du corps calleux, une DI sévère, une spasticité, des anomalies oculaires, et un hypogonadisme (217-222).

Les anomalies des protéines qui jouent un rôle dans la fusion des vésicules pré-synaptiques peuvent entraîner une diminution de la libération des neurotransmetteurs et peuvent alors compromettre l'activité synaptique. Plusieurs protéines sont nécessaires à cette étape : la Syntaxine-1, SNAP-25, la Synaptobrevin, Munc18 (STXBP1) et la Synaptotagmin (figure 25 et 26) (48,223,224). Les mutations dans le gène *STXBP1* sont associées à des encéphalopathies épileptiques mais également à des DI avec ataxie et tremblements (126,225-228). Patzke *et al.* ont montré que les mutations hétérozygotes de *STXBP1* réduisent d'environ 50% le niveau protéique de Munc18-1 et d'environ 30% celui de la Syntaxine-1, ayant pour conséquence une diminution de la libération de neurotransmetteurs (229).

Des mutations dans d'autres gènes, codant pour des protéines ayant un rôle dans les processus présynaptiques, tels que *CASK*, *OPHN1*, *ILRAPL1*, *PRSS12* ont été rapportés pour donner des DI (230-235,48).

### **3.2.2. Organisation et régulation de la densité post-synaptiques**

La densité post-synaptique (DPS) est la région intracellulaire (dense en microscopie électronique) immédiatement sous-membranaire, contenant la partie intracytoplasmique des récepteurs des neurotransmetteurs, des canaux ioniques, ainsi que le cytosquelette sous-membranaire. Cette structure est très importante pour la transduction post-synaptique du signal. En 2011, Bayes *et al.* ont réalisé une étude protéomique de DPS dans 9 biopsies de neo cortex humain combinée à une analyse systématique de l'impact de la maladie sur les mutations des protéines de la DPS. Ils ont montré que 200 mutations génétiques dans des gènes codant pour les protéines de la DPS provoquent 133 pathologies neurologiques (236).

Les complexes protéiques composant la DPS peuvent être répartis schématiquement en classes : 1) les protéines composant les récepteurs et canaux au niveau de la membrane, 2) les protéines « d'échafaudage » qui participent à la transduction de signaux en régulant l'activation de cascades moléculaires impliqués dans la transmission du signal, 3) les protéines d'adhésion, 4) les protéines de régulation, dont celles du système ubiquitine-protéasome, et 5) les protéines enzymatiques de signalisation (237). Ce système de DPS est relié au cytosquelette d'actine (figure 27) (48).



### a) Les récepteurs et canaux

Au niveau du cortex cérébral sont retrouvés principalement les neurones glutamatergiques, excitateurs, et les neurones GABAergiques, inhibiteurs. Des mutations dans les gènes codant pour les protéines constituant ces neurones ont été rapportés dans les pathologies neurodéveloppementales et la DI (238-242).

Nous nous intéresserons ici aux récepteurs des neurones glutamatergiques. Deux types principaux de récepteurs au glutamate se trouvent au niveau post-synaptique, le récepteur NMDA et le récepteur AMPA. Les mutations dans les gènes codant pour les sous-unités des récepteurs AMPA et NMDA ont été liées à des phénotypes variables du développement neurologique (48). Les récepteurs au glutamate AMPA sont les principaux médiateurs de la transmission synaptique excitatrice rapide dans le système nerveux central, et sont des complexes hétéro-multimères assemblés à partir de quatre sous-unités distinctes GluR1-GluR4 (également appelées GluRA-GluRD ou GRIA1-4) encodées par quatre gènes distincts (243). Alors que les récepteurs NMDA, qui sont des canaux ioniques di-hétéro-tétramères ou des tri- hétéro-tétramères composés de NR1, avec un site de liaison à la glycine (codé par *GRIN1*), et de deux sous-unités NR2 avec un site de liaison au glutamate (codés par *GRIN2A-D*), sont les médiateurs de la transmission synaptique lente (244). Une anomalie dans l'une des sous-unités d'un récepteur au glutamate affecte les propriétés globales du canal et pourrait avoir des conséquences au niveau de la transduction du signal et la plasticité synaptique (figure 27).

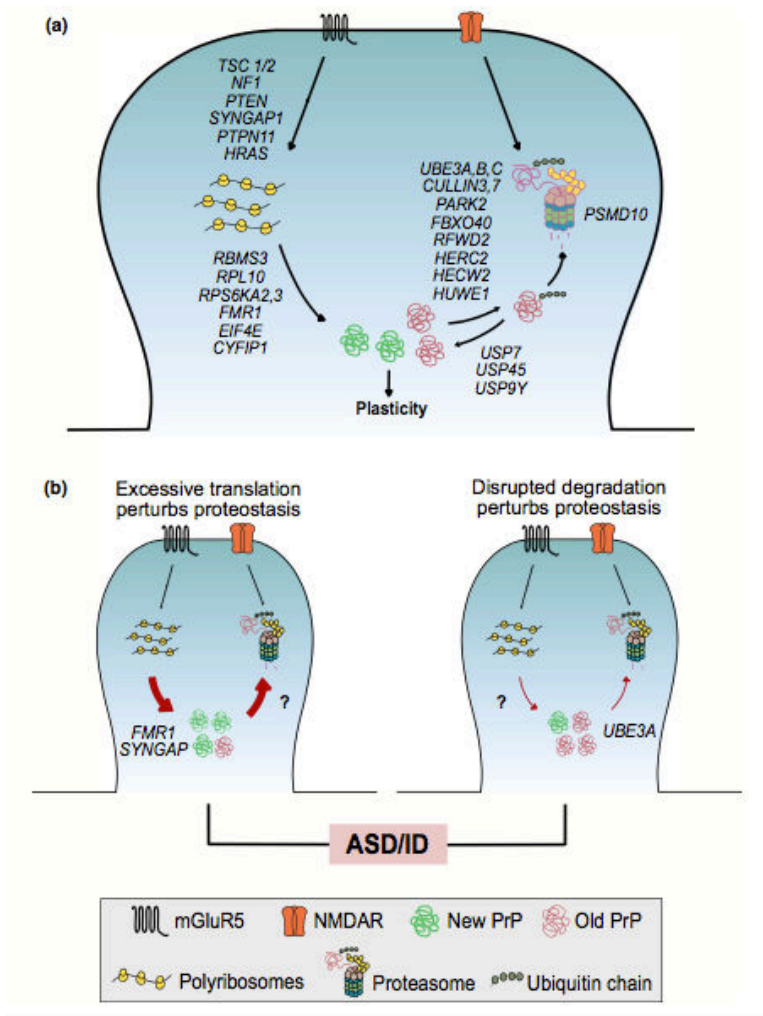
Des remaniements et mutations du gène *GRIA3*, codant pour la sous-unité 3 des récepteurs AMPA, ont été rapportés comme la cause d'une DI avec troubles du comportement liée à l'X (239,245-247). De même, Les remaniements et mutations des gènes *GRIN2A* et *GRIN2B*, codant pour des sous-unités NR2A et NR2B des récepteurs NMDA, ont été rapportées chez des individus avec une DI et/ou une épilepsie mais également des troubles du spectre autistique, des mouvements anormaux et des anomalies de gyration (248-253).

Suite à l'activation d'un seul récepteur au niveau des synapses excitatrices peuvent se déclencher des changements simultanés de la phosphorylation sur plus d'une centaine de protéines (254).

### a) Les protéines « d'échafaudage »

La DPS contient une collection de protéines « d'échafaudage », contenant des domaines protéiques spécialisés dans les interactions protéines-protéines, qui jouent un rôle pour l'assemblage de complexes de signalisation synaptique, et qui peuvent être modulées par des modifications post-traductionnelles (figure 27) (255). Parmi les familles de protéines « d'échafaudages » qui peuvent être considérées comme des organisateurs





**Figure 28 - La dérégulation de la synthèse ou de la dégradation des protéines entraînent un déséquilibre de la densité post synaptique.**

Des mutations dans plusieurs gènes qui régulent la traduction de l'ARNm et la fonction du système UPS ont été impliquées dans la DI et les troubles du spectre autistique.

*D'après S. R. Louros and E. K. Osterweil Journal of Neurochemistry 2016*

de l'interaction protéine-protéine, il y a la famille des guanylates kinase protéines associés à la membrane (MAGUK), dont PSD-95 (*DLG4*), SAP102 (*DLG3*), SAP97, PSD-93, et CASK, qui se connectent aux récepteurs au glutamate, et la famille des protéines SHANK (255,256). Parmi ces protéines « d'échafaudage », les protéines HOMER et SHANK sont parmi les plus abondantes, et forment une structure en réseau servant de plateforme d'assemblage pour d'autres protéines (257).

Nous prendrons l'exemple des protéines SHANK qui permettent l'interaction entre des récepteurs de neurotransmetteurs et d'autres protéines membranaires avec des protéines de signalisation et le cytosquelette d'actine. Les protéines SHANK participent à la maturation des épines dendritiques et à la formation de synapses (258). Les remaniements et mutations des gènes *SHANK1*, *SHANK2* et *SHANK3* sont impliqués dans la DI, les troubles du spectre autistique et l'épilepsie (259-268).

### **b) Régulation du taux de protéines post-synaptiques**

La régulation de la DPS est très importante pour la plasticité synaptique et les processus de mémorisation. Cette régulation s'effectue par 2 mécanismes : 1) l'action des facteurs de transcription qui augmentent l'expression de certaines protéines, et 2) la diminution du nombre de protéines soit par régulation de la traduction, soit par protéolyse entraînant la dégradation de ces protéines, en particulier via le système ubiquitine-protéasome (UPS). Les mutations dans plusieurs gènes codant pour les régulateurs de la traduction de l'ARNm et les membres de l'UPS ont été associées à un risque accru pour le développement de pathologies neurodéveloppementales (figure 28) (269).

Un des régulateurs de la traduction de l'ARNm est le gène *FMR1* qui code pour la protéine FMRP. FMRP est une protéine se liant à des ARNm, qui est fortement exprimée dans les neurones, et qui joue un rôle au niveau de nombreuses synapses pour inhiber la traduction locale stimulée par les récepteurs neuronaux (270). Les cibles post-synaptiques de FMRP comprennent environ 30% du protéome de la DPS et incluent les sous-unités des récepteurs NMDA (NR1, 2A, 2B et 3A), le récepteur mGluR5 et de nombreuses protéines telles que PSD-93 et PSD-95, SAPAP1-4, SHANK1-3, HOMER1, SynGAP1 et les neuroligines 1-3 (figure 27) (271,272). La perte de la protéine FMRP, est la cause du syndrome de l'X Fragile qui associe une DI modérée à sévère, des troubles du spectre autistique, un déficit de l'attention, des troubles de la coordination motrice, une dysmorphie, une éventuelle épilepsie et une macroorchidie.

Concernant le processus d'ubiquitination, il consiste en la liaison covalente de l'ubiquitine à la protéine cible et implique trois enzymes différentes: la ligase E1 qui active l'ubiquitine, la ligase E2 qui conjugue des monomères d'ubiquitine pour former une



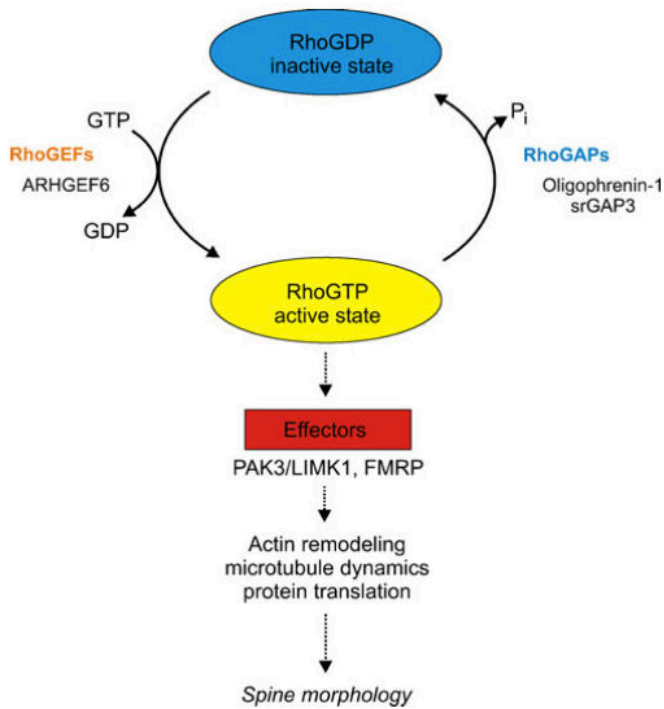
chaîne de polyubiquitine et enfin la ligase E3 qui conjugue sélectivement la polyubiquitine à sa protéine cible (273). C'est l'affinité des ligases E3 pour certaines cibles protéiques qui détermine la spécificité de l'UPS. Il est intéressant de noter que l'ajout d'une ubiquitine unique à une protéine cible, plutôt que d'une chaîne de polyubiquitine, peut être orientée vers le trafic intracellulaire plutôt que vers le processus de dégradation (269). L'UPS régule de nombreuses protéines qui ont un impact direct sur la transmission synaptique. Cela comprend des protéines « d'échafaudage » post-synaptiques majeures telles que PSD-95, GKAP et SHANK, ainsi que les principales protéines liées à la plasticité telles que Arg3.1 et CaMKII, mais également les récepteurs NMDA et AMPA (269,274).

Des mutations dans plusieurs gènes codant pour les protéines de l'UPS ont été associées à une DI. Ces gènes sont *UBE3A*, *UBR1*, *HUWE1*, *UBE2A* et *CUL4B* (figure 27) (48). Prenons à nouveau l'exemple du syndrome d'Angelman (AS), qui est causé par l'anomalie de la ligase E3 UBE3A. Bien que la plupart des cas d'AS soient dus à la perte spécifique de l'allèle maternel d'UBE3A, plusieurs études ont montré que des mutations affectant le domaine catalytique d'UBE3A peuvent également entraîner une symptomatologie d'AS (275-277). Une des hypothèses physiopathologiques a été montrée chez la souris : la transcription d'Ube3A est induite par l'activité neuronale. Cette transcription d'Ube3A, à son tour, favorise la dégradation de la protéine Arc, qui est une protéine synaptique régulant l'internalisation des récepteurs AMPA. La perturbation de la fonction d'Ube3A dans les neurones entraîne une augmentation de l'expression de la protéine Arc et une diminution concomitante du nombre de récepteurs AMPA au niveau des synapses excitatrices (269,278).

### 3.2.3. Dynamique du cytosquelette

Une des caractéristiques des épines dendritiques est leur diversité morphologique. Cette diversité ne serait pas attribuable à l'existence de différentes catégories d'épines dendritiques, mais serait le reflet d'un phénomène dynamique (279-281). Ainsi, les épines dendritiques peuvent changer de taille et de forme en quelques secondes. Ces changements dynamiques sont déterminés par l'architecture des microtubules et du cytosquelette d'actine (282). La bonne régulation de la morphologie des épines dendritiques est ainsi crucial pour le traitement de l'information (283).

Dans le syndrome de l'X Fragile, il existe une augmentation de la densité des épines dendritiques et un excès d'épines immatures témoin du déficit de régulation de la transcription des ARNm. On retrouve une densité augmentée des épines dendritiques au niveau de différentes zones corticales et de l'hippocampe chez les souris KO pour *fmr1* (284-287). Comme nous l'avons vu précédemment, la protéine FMRP est un des régulateurs de la traduction de l'ARNm. Elle réprime entre autre, la synthèse de la



### Figure 29 - Les RhoGTPases

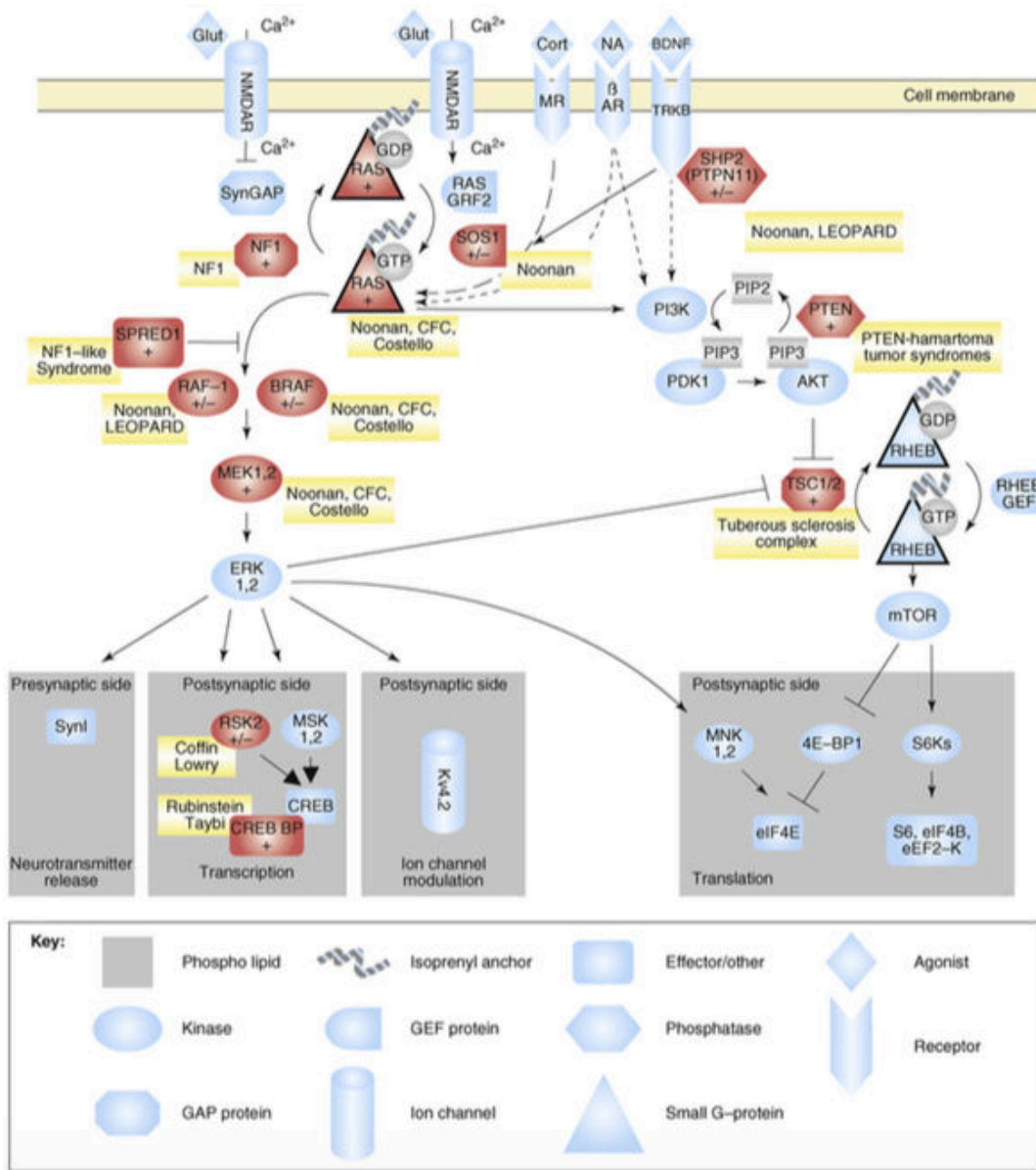
Ces protéines oscillent entre un état inactif et actif, modulées par des régulateurs positifs et négatifs. Les gènes de déficience intellectuelle associés aux RhoGTPases (*ARHGEF6*, *LIMK1*, *OPHN1*, *PAK3*, *MEGAP/srGAP3*) sont impliqués dans la régulation de ce cycle ou dans les voies de signalisation en aval.

*D'après O von Bohlen und Halbach. Cell Tissue Res. 2010*

protéine associée aux microtubules 1B (MAP1B). L'absence de protéine FMRP entraîne une baisse de MAP1B qui est essentielle pour la stabilisation des microtubules lors de l'allongement des dendrites et des neurites, contribuant à la morphologie des épines dendritiques dans le syndrome de l'X fragile (281,288,289).

Le cytosquelette d'actine des neurones est crucial pour la morphologie, la différenciation, la polarité cellulaire, la croissance des neurites, le développement de la morphologie dendritique, la formation et la plasticité synaptique, et le transport de protéines. Les protéines Rho GTPases ont été identifiées comme des composants clés des voies de signalisation qui contrôlent l'organisation du cytosquelette d'actine (290). Chez l'homme, 22 protéines Rho ont été identifiées et peuvent être divisées en 8 sous-groupes différents: Rho (RhoA-RhoC), Rac (Rac1-Rac3, RhoG), Cdc42 (Cdc42, TC10 et TCL, Chp, Wrch-1), RhoD (RhoD et Rif), Rnd (Rnd1, Rnd2, RhoE / Rnd3), RhoH / TTF, RhoBTB (RhoBTB1 et RhoBTB2) et Miro (Miro-1 et Miro-2) (291). Les protéines Rac1, Cdc42 et RhoA jouent un rôle au niveau neuronal (292,293). Les Rho GTPases sont de petites protéines de liaison aux nucléotides de guanine qui passent d'un état actif, liée au GTP, à un état inactif, lié au GDP. Leur activité est régulée de façon spatio-temporelle par des facteurs d'échange de guanine (GEFs) qui sont des régulateurs positifs (ARHGEF6, ARHGEF7, ARHGEF9, FGD1, FRABIN, VAV2), des protéines activant la GTPase (GAPs) qui sont des régulateurs négatifs (OPHN1, MEGAP, OCRL1, ARHGAP23) et des inhibiteurs de dissociation au nucléotide de guanine (GDIs) qui atténuent la signalisation des RhoGTPases en les liant et les séquestrant sous la forme inactive dans le cytosol (ARHGDIA, ARHGDIB, ARHGDIG) (figure 29) (283,294).

Par conséquent, il n'est pas surprenant que les mutations dans les gènes impliqués dans la régulation de ce cycle des Rho GTPases ou dans les voies de signalisation en aval soient associées à la DI (*ARHGEF6*, *ARHGEF9*, *FGD1*, *OPHN1*, *MEGAP*, *OCRL1*, *PAK3*, *LIMK1*) (figure 27). Prenons l'exemple du gène de l'*OPHN1* qui est le premier gène associé aux protéines Rho identifié dans la DI. Il code pour une protéine régulant négativement les protéines RhoA, Cdc42 et Rac1 dans les neurones (295). Les individus porteurs de mutations dans le gène *OPHN1* sont décrits comme porteurs d'une DI avec des anomalies cérébelleuses, dont l'hypoplasie cérébelleuse est le signe le plus fréquent, ainsi qu'une possible épilepsie (232,296-298). La perte de fonction de l'*OPHN1* provoque des changements dans la morphologie des épines dendritiques pendant le développement du fait de changements dans le cytosquelette d'actine dus à l'élévation des activités RhoA et Rho-kinase (295). Une étude a également montré que dans les cellules non neuronales, l'*OPHN1* peut interagir directement avec les filaments d'actine F pour réguler la dynamique du cytosquelette (299). Enfin, il a été montré que le courant post-synaptique au niveau des récepteurs AMPA et NMDA, ainsi que la maturation synaptique étaient inhibés dans les neurones d'hippocampe de souris KO pour *ophn1*.



**Figure 30 – Schématisation de la voie Ras-MAPK-ERK et PI3K-AKT-mTOR au niveau neuronal.**

*D'après LC Krab. Trends in Genetics. 2008*

Ces défauts sont dépendants de l'activité Rho-GAP et de l'interaction de l'OPHN1 avec les protéines HOMER 1b / c (283,300,301).

### 3.2.4. Cascades de signalisation intra-cellulaire

L'activation des récepteurs des neurotransmetteurs entraîne un certain nombre de cascades de signalisation cellulaire postsynaptique, dont la voie Ras-MAPK-ERK et la voie PI3K-AKT-mTOR (figure 27) (48,200).

Dans le cas de la voie Ras-MAKP-ERK, le groupe de pathologies nommé RASopathies est du à une anomalie qui touche un des gènes codant pour une protéine impliquée dans cette voie (*PTPN11, SOS1, RASA2, KRAS, NRAS, RAF1, CBL, SHOC2, BRAF, MEK1, MEK2, HRAS, CRAF, NF1, SPRED1, RASA1*) (302,303). De nombreux syndromes impliquant cette voie de signalisation ont été caractérisés à ce jour: la Neurofibromatose type 1 (NF1), le syndrome de Noonan (NS), le syndrome de Noonan avec lentigines multiples, le syndrome cardio-facio-cutané (CFC), le syndrome de Costello (CS), le syndrome de Legius et le syndrome de malformation capillaire - malformation artério-veineuse (CM-AVM). Bien que chaque RASopathie ait un phénotype particulier, ces syndromes ont de nombreuses caractéristiques communes, parmi lesquelles le morphotype, les anomalies cardiovasculaires, les anomalies musculo-squelettiques, les lésions cutanées, la DI et le risque tumoral accru (303). Le degré de DI est très variable au sein des RASopathies.

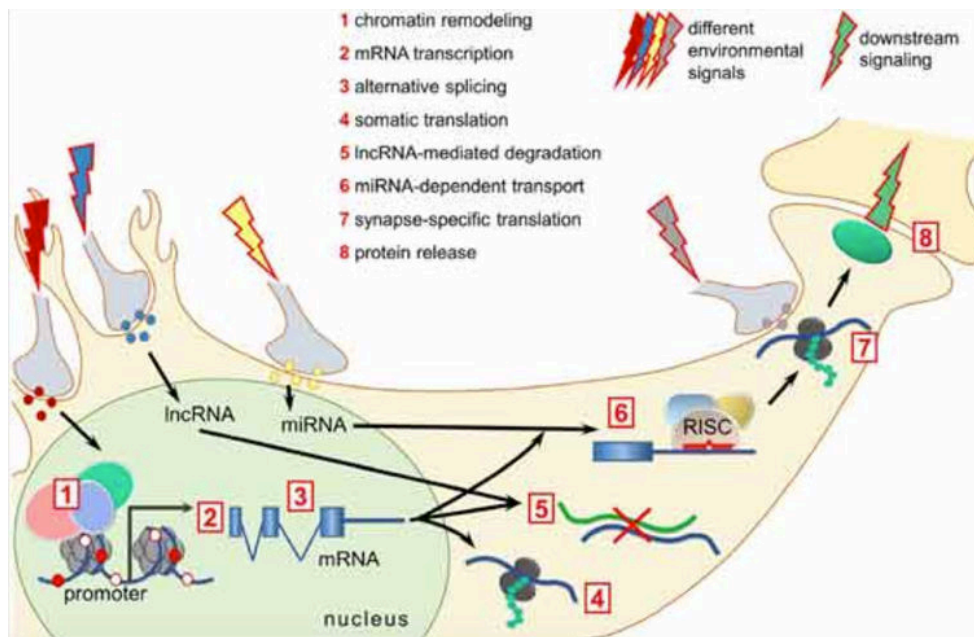
La voie Ras-MAPK-ERK contribue à la plasticité post-synaptique par différents mécanismes (304):

- en modifiant le nombre de récepteurs AMPA au niveau de la membrane cellulaire. Le neurone post-synaptique contrôle ainsi directement sa réponse au glutamate et le déclenchement d'un potentiel d'action. Une augmentation de ERK joue donc sur la quantité de récepteurs AMPA au niveau de la membrane post-synthétique (figure 30). Cela suggère un lien direct entre la signalisation post-synaptique ERK et la dynamique des récepteurs AMPA (305,306).

- La signalisation ERK joue également un rôle crucial dans le contrôle de la synthèse des protéines en régulant la transcription et la traduction. L'une des cibles de la voie Ras-MAPK-ERK est le facteur de transcription CREB, qui est un facteur important pour la mémoire à long terme (figure 30) (307).

- De plus, la signalisation ERK a été identifiée comme un élément clé dans la mémoire à long terme et la plasticité neuronale chez les vertébrés et les invertébrés (308-311). Il a également été montré, dans un modèle souris NF1, qu'une activité ERK plus élevée augmente la phosphorylation de la synapsine I dans les interneurons GABAergiques, ce qui réduit la LTP et la mémoire (312,313).





**Figure 31 - Schéma représentant les bases épigénétiques de la plasticité neuronale et synaptique.**

Etape 1 : remodelage chromatinien ; Etape 2 : transcription de l'ARN messager ; Etape 3 : splicing alternatif ; Etape 4 : traduction ; Etape 5 : dégradation médié par les ARN longs non codant ; Etape 6 : transport dépendant des miARN ; Etape 7 : traduction synapse-spécifique ; Etape 8 : libération protéique

*D'après N N Karpova et al. Curr Top Med Chem. 2017*

- Enfin au niveau pré-synaptique, la voie Ras-MAPK-ERK est impliquée dans la libération de neurotransmetteurs dans les suites de la liaison du BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) au récepteur présynaptique TRKB (récepteur tyrosine kinase type B) qui va induire une phosphorylation de ERK puis une activation de la synapsine 1 (protéine qui se lie aux vésicules synaptiques contenant des neurotransmetteurs) (314). Certaines mutations dans les gènes codant pour les composants de la voie Ras-MAPK-ERK augmentent l'activité ERK, ce qui fait soulever l'hypothèse qu'une activation excessive de la signalisation Ras-MAPK-ERK pendant le développement pourrait générer une organisation et une connectivité neuronales anormales (311).

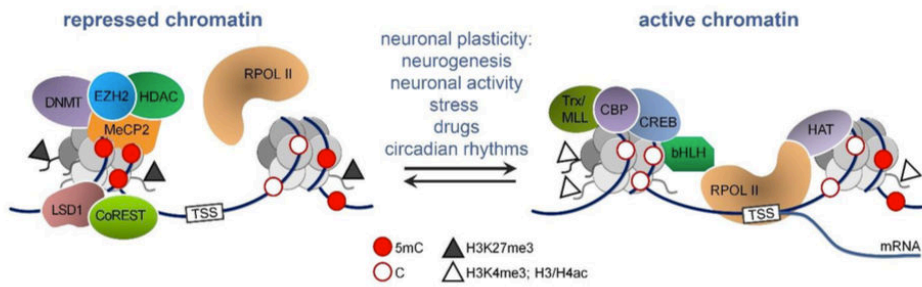
Dans le cas de la voie PI3K-AKT-mTOR, l'inactivation des gènes *mTOR*, *PTEN*, *TSC1*, *TSC2* sont impliqués dans la plasticité synaptique et la DI (figure 30) (48,304).

### 3.2.5. Régulation épigénétique de la plasticité synaptique

L'épigénétique est définie comme « l'étude des modifications de l'expression des gènes qui sont transmissibles lors de la mitose et/ou la méiose, mais ne découlent pas de modifications dans la séquence de l'ADN » (315).

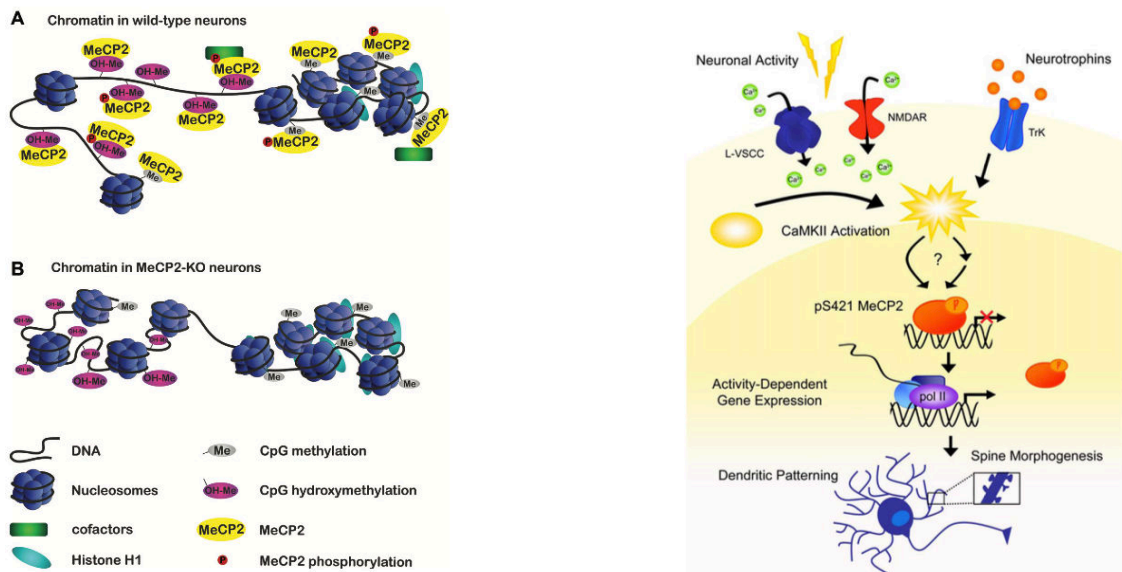
Il s'agit ici de changements et leurs conséquences au niveau de l'expression génique dans les cellules post-mitotiques tout au long du développement cérébral. Les modifications apportées à l'épigénome neuronal influent sur les interactions gènes-environnement et sont nécessaires pour une régulation fonctionnelle de la différenciation, de la maturation et de la plasticité neuronale. Les principales étapes de régulation épigénétique jouant un rôle dans les activités neuronales à long terme et dans la plasticité synaptique sont : la méthylation et la déméthylation de l'ADN, les modifications des histones, les enzymes de remodelage de la chromatine, les ARN non codants, la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des niveaux d'expression des gènes (figure 31) (48,316,317).

Les progrès majeurs dans la compréhension de la régulation épigénétique de la plasticité neuronale dans les troubles du développement neurologique ont été réalisés par les études de la fonction de la protéine MeCP2 et du syndrome de Rett (317). Le syndrome de Rett (MIM 312750), est un syndrome génétique touchant les filles, caractérisé par une régression psychomotrice survenant entre 1 et 3 ans, faisant suite à un développement quasi normal au cours de la 1ère année de vie. On observe par la suite, une perte de l'utilisation volontaire des mains, une quasi absence de langage, des stéréotypies manuelles, une microcéphalie secondaire, une marche instable et à un retrait social. Le développement de la maladie est attribué à une perte de fonction de la protéine de liaison au méthyl-CpG spécifique au cerveau MeCP2 (318,319).



**Figure 32 - Principaux mécanismes épigénétiques qui régulent la transcription des gènes.**

*D'après Karpova et al. Curr Top Med Chem. 2016*



**Figure 33 – Représentation schématique de certains rôles de MeCP2**

Image de gauche : Représentation schématique de la liaison de MeCP2 à la chromatine neuronale.

Image de droite : Régulation de la morphogénèse dendritique et de la maturation des épines dendritiques par l'activité phosphorylation dépendante de MeCP2

*D'après D Damen et R Heumann. Biol. Chem. 2013*

*D'après Zhou et al. Neuron. 2006*

Les dinucléotides CpG sont des résidus cytosines de dinucléotides palindromiques 5'-CG-3', qui sont répartis de façon non uniforme dans le génome, avec un enrichissement dans de courtes régions, appelées îlots CpG, positionnées au niveau des régions promotrices et/ou du premier exon de 60% des gènes humains. Ceci pointe l'importance de ces îlots et de la méthylation de l'ADN dans la régulation de l'expression génique (320). L'inhibition de l'expression des gènes est corrélée à l'hyperméthylation des îlots CpG. La méthylation de l'ADN crée des sites de liaison reconnus par les « methyl-binding protein » ou MBPs, dont fait partie MeCP2, et dont le rôle est de recruter des complexes de remodelage de la chromatine rendant l'ADN inaccessible aux complexes de transcription et empêchant alors l'expression génique (figure 32) (321).

L'haploinsuffisance de MeCP2 conduit à une dysrégulation des gènes cibles dans les neurones matures, entraîne une inhibition synaptique dans le cortex, affectant ainsi le fonctionnement normal des cellules gliales (322-324). Au niveau neuronal, il est alors observé des anomalies dans la ramification et la maturation dendritique, une altération de la plasticité synaptique des neurones excitateurs et une inhibition accrue (figure 33) (319,322,325,326). L'absence de réponse adaptée aux stimuli, par la méthylation de MeCP2, empêche sa liaison aux CpG méthylés au niveau des gènes cibles. De plus, la diminution de la phosphorylation de MeCP2 peut conduire à l'expression accrue de complexes répresseurs de la transcription contenant REST (repressor element 1 silencing transcription factor) et NRSF (neuron-restrictive silencer factor) (48,317,327-329). En l'absence de MeCP2, REST est surexprimé et inhibe la transcription du facteur BDNF qui est un régulateur important de la LTP au niveau neuronal, et joue un rôle dans la mémoire (330). En 2015, il a également été montré que MeCP2 réprime l'expression génique en se liant à des sites de CpA méthylés situés au niveau de gènes longs. Des mutations de *MeCP2* peuvent ainsi provoquer un dysfonctionnement neurologique en perturbant spécifiquement l'expression des gènes longs dans le cerveau (331).

### 3.3. La régulation épigénétique de la transcription

L'embryogenèse humaine est rigoureusement organisée par l'expression spatio-temporelle de nombreux gènes, et le fonctionnement cérébral repose également sur la régulation de la transcription génique. La dysrégulation de la transcription de certains gènes codant pour des protéines impliquées dans l'édition épigénétique du génome et d'autres composants des complexes de remodelage de la chromatine est la cause de syndromes génétiques avec DI (332). Il s'agit souvent de facteurs de transcription régulant la synthèse de protéines intervenant dans la méthylation de l'ADN, dans la méthylation et l'acétylation des histones, ou dans le remodelage de la chromatine (tableau 8 en annexe). La plupart de ces syndromes sont dus à des mutations hétérozygotes, suggérant que les processus cognitifs sont très sensibles au dosage génique des facteurs jouant un rôle épigénétique (332). Il est intéressant de noter que la

<b>Syndrome</b>	<b>Gènes</b>	<b>Fonctions des protéines</b>
<b>Syndrome de Rubinstein – Taybi</b>	<i>CREBBP</i> <i>EP300</i>	Histone acétyltransférase
<b>Syndrome de Say–Barber-Biesecker / Young-Simpson</b>	<i>KAT6B</i>	Histone acétyltransférase
<b>Syndrome Brachydactylie retard mental</b>	<i>HDAC4</i>	Histones déacétylase
<b>Syndrome de Wilson-Turner</b>	<i>HDAC8</i>	Histones déacétylase
<b>Syndrome de Wiedemann-Steiner</b>	<i>KMT2A</i>	Histone méthyltransférase
<b>Syndrome de Kabuki</b>	<i>KMT2D</i> , <i>KDM6A</i>	Histone méthyltransférase
<b>Syndrome de Sotos</b>	<i>NSD1</i>	Histone méthyltransférase
<b>Syndrome de Weaver</b>	<i>EZH2</i>	Histone méthyltransférase
<b>Syndrome de Kleefstra</b>	<i>EHMT1</i>	Histone méthyltransférase
<b>Déficience intellectuelle syndromique liée à l’X</b>	<i>KDM5C</i>	Histone déméthylase
<b>Syndrome de KBG</b>	<i>ANKRD11</i>	Régulation de l’acétylation des histones
<b>Syndrome de Coffin-Siris</b>	<i>ARID1A</i> <i>ARID1B</i> <i>SMARCA4</i> <i>SMARCB1</i> <i>SMARCE1</i>	Remodelage de la chromatine, sous-unité du complexe SWI/SNF
<b>Syndrome de Nicolaides-Baraitser</b>	<i>SMARCA2</i>	Remodelage de la chromatine
<b>A-Thalassémie, retard mental lié à l’X</b>	<i>ATRX</i>	Remodelage de la chromatine, hélicase, sous-unité du complexe SWI/SNF
<b>Syndrome de CHARGE</b>	<i>CHD7</i>	Hélicase, régulation de la transcription
<b>Syndrome FG</b>	<i>MED12</i>	Sous-unité du complexe Mediator, rôle dans la préinitiation de la transcription
<b>Syndrome de Cornelia de Lange</b>	<i>NIBPL</i> <i>SMC1A</i> <i>SMC3</i> <i>HDAC8</i>	Cohésines
<b>Syndrome de Borjeson-Forsman-Lehmann</b>	<i>PHF6</i>	Facteur de transcription (doigt de zinc)
<b>syndrome de Pitt-Hopkins</b>	<i>TCF4</i>	Facteur de transcription (hélice-boucle-hélice)
<b>Syndrome de CHOPS</b>	<i>AFF4</i>	Facteur d’élégation transcriptionnel

**Tableau 3 - Exemples de pathologies dues à une anomalie de la régulation transcriptionnelle.**

*D’après Hans van Bokhoven. Annu. Rev. Genet. 2011 et K Izumi. Mol Syndromol 2016*

plupart de ces syndromes ont souvent des caractéristiques phénotypiques communes (table 3).

Prenons l'exemple du syndrome de Rubinstein-Taybi (RTS) (MIM 180849 et 613684), qui se caractérise par une dysmorphie faciale (fentes palpébrales en bas et en dehors, une grande columelle, des sourcils en accent circonflexe, de longs cils), microcéphalie, pouces et hallux larges, retard de développement / déficience intellectuelle et retard de croissance (333). Le RTS est causé par des mutations hétérozygotes dans les gènes *CREBBP* ou *EP300* entraînant une haplo-insuffisance (334). La prévalence des mutations dans *CREBBP* et *EP300* chez les patients avec RTS est respectivement de 50% et 8% (335,336). Ces gènes codent pour des coactivateurs transcriptionnels ayant une activité lysine acétyltransférase (337).

*CREBBP* et *EP300* sont des coactivateurs de la transcription. Ce sont des lysine acétyltransférases de la famille des KAT3 (337,338). Les exemples les plus connus d'acétylation de la lysine se produisent en région N-terminal des quatre histones (H2A, H2B, H3 et H4) souvent appelés les queues d'histones. Ces queues possèdent une forte flexibilité intrinsèque leur permettant une interaction dynamique avec l'ADN. L'addition d'un groupe acétyle à des résidus de lysine libère le contact entre les histones et l'ADN. Ce changement de conformation provoque la relaxation de la chromatine et facilite l'accès des facteurs de transcription (336,338,339). Une réduction des histones H2B et de l'acétylation des histones H2A a été montrée dans les lignées cellulaires lymphoblastoïdes obtenues chez des personnes atteintes de RTS, (340). *CREBBP* et *EP300* jouent un rôle clé au cours du développement, contrôlant la prolifération et la différenciation de différentes lignées cellulaires, y compris celles du système nerveux (341). *CREBBP* et *EP300* sont également impliquées dans la différenciation des neurones et des cellules gliales des précurseurs corticaux (342).

Enfin, les modèles animaux de RTS suggèrent que l'altération des protéines KAT3, affectant la transcription et l'épigénome, contribue au phénotype du RTS. Dans les modèles murins, on a observé une dysmorphie cranio-faciale (front proéminent, nez émoussé et une grande fontanelle antérieure) et des anomalies squelettiques associées au RTS sauf les pouces et hallux larges (343-345). Des déficits cognitifs avec des défauts de mémoire sont également présents dans ces modèles (346).



## 4. Evaluation clinique et génétique

La DI est devenue la cause la plus fréquente de demande de consultation de génétique dans la population pédiatrique (17). Lors de la consultation de génétique, une attention particulière sera dirigée vers la recherche d'indices potentiels pour orienter vers une étiologie génétique ou acquise (347-351).

### 4.1. Evaluation clinique

#### 4.1.1. Anamnèse

La première étape essentielle de l'évaluation est celle du recueil des antécédents, familiaux et personnels.

Concernant les antécédents familiaux, les principales informations sont recueillies lors de la réalisation de l'arbre généalogique sur au moins 3 générations:

- unions consanguines,
- antécédents de DI, de malformations,
- antécédents de fausses couches, de morts fœtales in utero à répétition qui pourraient orienter vers un remaniement chromosomique,
- des décès dans la période périnatale, des morts subites dans l'enfance, qui pourraient orienter vers des anomalies du métabolisme,

Concernant les antécédents personnels, on s'appliquera à rechercher :

- si la grossesse a fait suite à une procréation médicale assistée,
- la possibilité d'une exposition à un agent tératogène (médicament comme des anti-épileptiques, drogue, toxique, alcool),
- des épisodes infectieux,
- des événements dans les périodes péri et néonatales (complications de la délivrance, anoxo-ischémie, hypotonie, hypoglycémies, épilepsie),
- les antécédents médico-chirurgicaux,
- une anomalie de la croissance staturo-pondérale et de la courbe du périmètre crânien,
- des anomalies sensorielles (ophtalmologique, auditive),
- des anomalies du développement psychomoteur (acquisition de la tenue de tête, acquisition de la station assise, acquisition de la marche, retard de langage, troubles de la motricité globale et fine, notion de régression),
- des troubles du comportement (troubles du sommeil, troubles de l'alimentation, troubles des relations sociales, auto ou hétéro-mutilation)

#### 4.1.2. Examen clinique

L'examen clinique fait suite à l'interrogatoire. Les aspects spécifiques de l'examen clinique sont :

- la prise des mensurations et leur comparaison à la population,



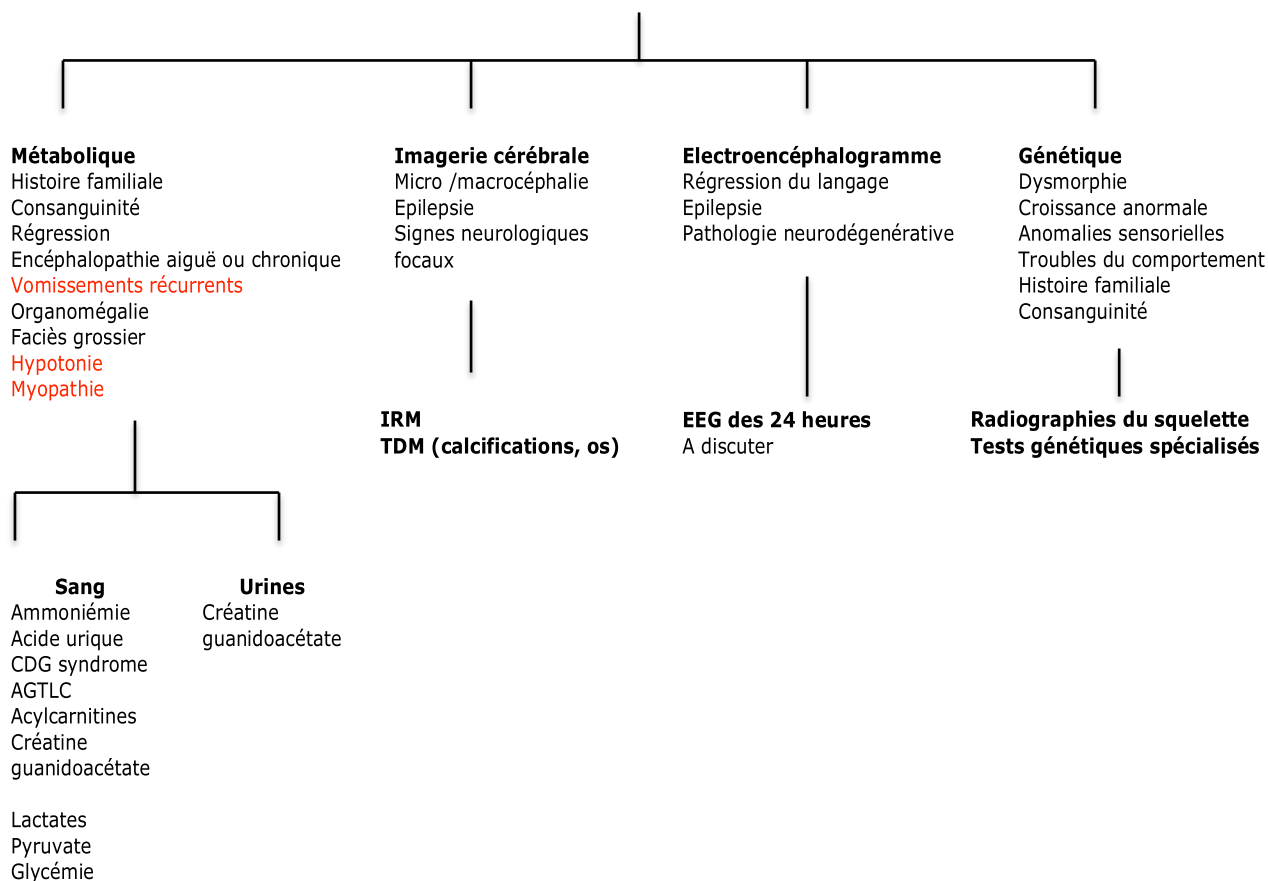
1. Anamnèse approfondie et examen clinique
2. Evaluation
3. Examen ORL
4. Examen ophtalmologique

#### Examens de première intention

Numération formule sanguine  
 Ferritine  
 Vitamine B12  
 Ionogramme sanguin, urée  
 Créatine Kinase  
 Plombémie  
 Fonction thyroïdienne  
 Chromatographie des acides aminés, des acides organiques, glycosaminoglycanes urinaires  
 ACPA  
 X Fragile

#### Examens de seconde intention

Avis de référence auprès d'un neurologue, métabolicien ou généticien qui **pourrait** prescrire



**Figure 34 - Recommandations pour la réalisation des investigations paracliniques chez les enfants ayant un retard de développement global d'étiologie inconnue.**

ACPA : Analyse Chromosomique sur Puce ADN ; CDG : Congenital Disorder of Glycosylation; AGTLC : Acides gras à très longue chaîne; IRM : Imagerie par résonnance magnétique; TDM : Tomodensitométrie; EEG : Electroencéphalogramme.

*D'après N Silove et al. Journal of Paediatrics and Child Health. 2013*

- la recherche de signes dysmorphiques, ou de malformations,
- la recherche de signes de pathologies de surcharge comme une hépatosplénomégalie,
- l'examen cutané soigneux à la recherche de signes en faveur d'une phacomatose, d'une mosaïque,
- un examen neurologique approfondi,
- la recherche de troubles du comportement.

## 4.2. Investigations

Plusieurs publications proposent des recommandations pour la réalisation des examens génétiques et paracliniques mais les dernières datent des années 2013-2014 et n'intègrent que très peu les nouvelles technologies de séquençage de l'ADN à haut débit (349,350,352).

Après l'évaluation génétique clinique, l'utilisation judicieuse des tests de laboratoire, d'imagerie et d'autres consultations de spécialistes sont prescrites sur la base des meilleures preuves. Soit le clinicien émet une hypothèse diagnostique forte et il va la confirmer par la réalisation du test génétique ou métabolique approprié, soit il n'a pas d'orientation diagnostique évidente et va s'orienter vers la réalisation de tests moins spécifiques mais dont le rendement diagnostique est supérieur à 1% (figure 34) (350).

### 4.2.1. Bilan biologique

Le bilan biologique simple comprend la réalisation d'une numération formule sanguine, d'un ionogramme sanguin, d'une évaluation de la fonction rénale, d'un dosage de la créatine kinase pour éliminer une pathologie neuromusculaire telle que la myopathie de Duchenne où les signes neurologiques peuvent précéder les signes musculaires, d'un dosage des hormones thyroïdiennes.

### 4.2.2. Bilan génétique et métabolique

Le bilan de première intention en génétique comprend la réalisation d'une ACPA et la recherche d'un syndrome de l'X Fragile.

Si ce premier bilan est négatif, il est alors évoqué de réévaluer l'enfant et à nouveau, s'il existe une hypothèse diagnostique de la confirmer ou dans le cas contraire, réaliser le séquençage d'un panel de gènes. Le séquençage de l'exome ou génomique est encore peu suggéré (349).

Concernant le bilan métabolique, il est proposé de réaliser un bilan de première ligne, variable selon les auteurs, comportant une chromatographie des acides aminés plasmatiques et des acides organiques urinaires, le dosage de l'homocystéine, le profil des acyl-carnitines, le dosage des glycosaminoglycanes et oligosaccharides urinaires, le dosage des bases puriques, pyrimidiques, l'analyse du métabolisme de la créatine



(349,352). Ce bilan est proposé pour éliminer les pathologies métaboliques qui pourraient être éventuellement traitables (349,353-356).

#### **4.2.3. Bilan radiologique**

Un bilan radiologique et plus précisément une IRM cérébrale sera demandée s'il existe une anomalie du périmètre crânien (micro ou macrocéphalie), des signes pathologiques à l'examen clinique neurologique ou la présence d'une épilepsie. La réalisation d'un scanner cérébral est éventuellement à discuter à la recherche de calcifications (352).

#### **4.2.4. Exploration fonctionnelle neurologique**

Un bilan électro-encéphalographique sera demandé dans le cadre d'une épilepsie, d'un tableau de régression ou de pathologie neuro-dégénérative (352).

### **4.3. Génétique médicale**

Pour la famille comme pour les cliniciens, il existe un réel intérêt à poser un diagnostic étiologique à la DI (17,349,357,358):

- pouvoir poser un nom ou une cause sur la maladie,
- donner, si cela est possible, un pronostic ou une possible évolution de la pathologie permettant de guider et de mettre en place la prise en charge adaptée,
- expliquer les mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent les signes cliniques,
- donner un conseil génétique aux parents, avec un risque de récurrence pour leur couple mais également pour leurs apparentés,
- permettre un éventuel diagnostic prénatal ou pré-implantatoire,
- orienter la famille vers des associations de patients,
- donner une information sur les traitements existants,
- permettre d'accéder à des programmes de recherche ou des protocoles de traitement,
- permettre une reconnaissance et une meilleure prise en charge sociale.



# **Premier article: Loss-of-function mutations in *WDR73* are responsible for microcephaly and steroid-resistant nephrotic syndrome: Galloway-Mowat syndrome.**

**Des mutations perte de fonction du gène *WDR73* sont responsables du syndrome de Galloway Mowat associant microcéphalie et syndrome néphrotique cortico-résistant.**

**Colin E**, Huynh Cong E, Mollet G, Guichet A, Gribouval O, Arrondel C, Boyer O, Daniel L, Gubler MC, Ekinici Z, Tsimaratos M, Chabrol B, Boddaert N, Verloes A, Chevrollier A, Gueguen N, Desquiret-Dumas V, Ferré M, Procaccio V, Richard L, Funalot B, Moncla A, Bonneau D, Antignac C.

***Am J Hum Genet.* 2014 Dec 4;95(6):637-48.**

Le syndrome de Galloway-Mowat est une pathologie autosomique récessive rare, caractérisée par un syndrome néphrotique associé à une microcéphalie et une déficience intellectuelle. Grâce à l'association des techniques de localisation par homozygotie (*homozygosity mapping*) et de séquençage exomique, nous avons identifié le gène *WDR73* comme un des gènes dont les mutations sont responsables de ce syndrome chez deux familles non apparentées.

*WDR73* code pour une protéine de fonction inconnue contenant des répétitions WD40. Nous avons montré que la protéine *WDR73* est présente dans le cerveau et le rein. Au niveau cellulaire, cette protéine a une localisation diffuse dans le cytoplasme pendant l'interphase de la mitose, mais elle se relocalise au niveau des pôles des fuseaux mitotiques et des microtubules pendant la division cellulaire.

Les fibroblastes d'un patient et les podocytes knock-down pour *WDR73* ont montré une morphologie nucléaire anormale, une faible viabilité cellulaire et des altérations du réseau des microtubules. Ces données suggèrent que la protéine *WDR73* joue un rôle crucial dans la maintenance de l'architecture et la survie des cellules.

Au total, les mutations du gène *WDR73* sont responsables du syndrome de Galloway-Mowat chez des individus présentant un syndrome néphrotique tardif, une microcéphalie postnatale, une déficience intellectuelle sévère et une imagerie cérébrale comparable. *WDR73* est un autre exemple de gène impliqué dans une maladie affectant à la fois le glomérule rénal et le système nerveux central.

Les données supplémentaires de cet article ont été mises en annexe (p 64).



# 1. Introduction de l'article

Nous nous sommes intéressés aux causes moléculaires du syndrome de Galloway Mowat (GAMOS) (MIM251300). La première description de l'association d'une microcéphalie, d'un retard cognitif et d'un syndrome néphrotique précoce a été publiée par Galloway et Mowat en 1968 (359). Ce syndrome génétique rare était défini initialement par la triade microcéphalie, hernie hiatale et syndrome néphrotique. Il débute précocement dans l'enfance, le syndrome néphrotique est généralement corticorésistant (SNCR) et son pronostic est sombre avec un décès survenant dans la première ou deuxième décennie. Son mode de transmission est autosomique récessif.

La plupart des SNCR sont d'origine génétique et sont dus à des défauts structuraux de la barrière de filtration glomérulaire. Cette dernière sépare le système sanguin de l'espace urinaire et est constituée de trois couches : un épithélium fenêtré, une membrane basale glomérulaire et les pédicelles des podocytes. Des mutations dans des gènes fortement exprimés dans les podocytes, ont été retrouvées chez deux tiers des enfants ayant un SNCR dans la première année de vie (360).

Sept gènes différents : *NPHS1*, *NPHS2*, *CD2AP*, *PLCE1*, *ACTN4*, *TRPC6* et *INF2*, sont impliqués dans les formes non syndromiques de SNCR et trois gènes sont principalement impliqués dans les syndromes néphrotiques congénitaux et infantiles non syndromiques : *NPHS1*, *NPHS2* et *WT1* (361).

Les formes syndromiques de SNCR, beaucoup plus rares, se définissent comme l'association de la pathologie glomérulaire avec des signes extra-rénaux. Neuf gènes : *LAMB2*, *Integrin  $\beta 4$* , *WT1*, *LMX1B*, *SCARB2*, *COQ2*, *PDSS2*, *MTTL1*, *SMARCAL1*, avaient été impliqués dans ce type de maladie avant notre publication (360,362-366).

Depuis la publication princeps de Galloway et Mowat, plus de 60 cas associant microcéphalie, retard psychomoteur et syndrome néphrotique précoce ont été rapportés dans la littérature (359,367-406). Ces publications ont montré qu'il existait une grande hétérogénéité clinique, avec des variations dans l'âge d'apparition de la microcéphalie (pré ou post-natale) ou du syndrome néphrotique et de l'histologie rénale. La principale caractéristique de ce syndrome est la microcéphalie, qui est souvent présente à la naissance (microcéphalie primaire), mais qui peut également se développer après la naissance (microcéphalie secondaire).

Les anomalies majeures du cerveau incluent l'atrophie cérébrale et les anomalies de la migration neuronale, comme l'agyrie, la microgyrie ou la polymicrogyrie. Ces anomalies structurelles cérébrales sont associées à une DI sévère, une hypotonie et à une épilepsie dans la moitié des cas.

Les manifestations rénales du GAMOS vont de la protéinurie isolée au SNCR qui progresse rapidement vers l'insuffisance rénale terminale après quelques mois. Le SNCR est généralement détecté dans les premiers mois de la vie, mais il peut apparaître plus





tard dans l'enfance (44 à 198 mois) (384,392,394). Compte tenu de son hétérogénéité clinique, il était très probable, lorsque nous avons débuté ce travail, que le GAMOS était également hétérogène sur le plan génétique. Cependant aucun gène n'avait été alors identifié.

En 2008, Dietrich *et al.* ont analysé des gènes candidats codant pour les protéines de la membrane basale glomérulaire (*LAMB2* et *LAMA5*) ou des protéines podocytaires (*ITGB1*, *ITGA3*, et *ACTN4*) sans trouver de mutation causale dans une cohorte de 18 individus atteints de GMS (399).

Grâce à une collaboration clinique avec le Pr Anne Moncla du CHU de Marseille et avec le Pr Corinne Antignac de l'Hopital Necker, nous avons eu l'opportunité d'étudier deux familles avec des enfants atteints de GAMOS. Par une technique d'*homozygosity mapping* et de séquençage exomique, nous avons identifié des variants pathogènes homozygotes dans le gène *WDR73*.

Nous avons ensuite montré que la localisation de la protéine *WDR73*, qui appartient à la famille des protéines avec répétition WD40 (WD40-repeats), était dépendante du cycle cellulaire. La protéine *WDR73* est répartie de manière diffuse dans le cytosol pendant l'interphase et se localise aux spindle poles et aux asters des microtubules pendant la mitose. Les études fonctionnelles dans les fibroblastes d'un des enfants atteints et dans des podocytes knock-down pour *WDR73* ont révélé que la perte de la protéine *WDR73* entraîne des défauts de survie cellulaire et une désorganisation des microtubules, ce qui pourrait expliquer le phénotype neurologique et rénal des individus atteints de GAMOS.

## 2. Article



# Loss-of-Function Mutations in *WDR73* Are Responsible for Microcephaly and Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome: Galloway-Mowat Syndrome

Estelle Colin,<sup>1,2,15</sup> Evelyne Huynh Cong,<sup>3,4,15</sup> Géraldine Mollet,<sup>3,4</sup> Agnès Guichet,<sup>1</sup> Olivier Gribouval,<sup>3,4</sup> Christelle Arrondel,<sup>3,4</sup> Olivia Boyer,<sup>3,4,5</sup> Laurent Daniel,<sup>6</sup> Marie-Claire Gubler,<sup>3,4,5</sup> Zelal Ekinci,<sup>7</sup> Michel Tsimaratos,<sup>8</sup> Brigitte Chabrol,<sup>9</sup> Nathalie Boddaert,<sup>4,10</sup> Alain Verloes,<sup>11</sup> Arnaud Chevrollier,<sup>1,2</sup> Naig Gueguen,<sup>1,2</sup> Valérie Desquret-Dumas,<sup>1,2</sup> Marc Ferré,<sup>1,2</sup> Vincent Procaccio,<sup>1,2</sup> Laurence Richard,<sup>12</sup> Benoit Funalot,<sup>12</sup> Anne Moncla,<sup>13</sup> Dominique Bonneau,<sup>1,2,16</sup> and Corinne Antignac<sup>3,4,14,16,\*</sup>

Galloway-Mowat syndrome is a rare autosomal-recessive condition characterized by nephrotic syndrome associated with microcephaly and neurological impairment. Through a combination of autozygosity mapping and whole-exome sequencing, we identified *WDR73* as a gene in which mutations cause Galloway-Mowat syndrome in two unrelated families. *WDR73* encodes a WD40-repeat-containing protein of unknown function. Here, we show that *WDR73* was present in the brain and kidney and was located diffusely in the cytoplasm during interphase but relocalized to spindle poles and astral microtubules during mitosis. Fibroblasts from one affected child and *WDR73*-depleted podocytes displayed abnormal nuclear morphology, low cell viability, and alterations of the microtubule network. These data suggest that *WDR73* plays a crucial role in the maintenance of cell architecture and cell survival. Altogether, *WDR73* mutations cause Galloway-Mowat syndrome in a particular subset of individuals presenting with late-onset nephrotic syndrome, postnatal microcephaly, severe intellectual disability, and homogenous brain MRI features. *WDR73* is another example of a gene involved in a disease affecting both the kidney glomerulus and the CNS.

## Introduction

Galloway-Mowat syndrome (GMS [MIM 251300]) is a rare autosomal-recessive disorder characterized by the combination of nephrotic syndrome (NS) and various CNS abnormalities.<sup>1</sup> Since the first report by Galloway and Mowat in 1968,<sup>2</sup> more than 60 cases of GMS have been reported.<sup>3</sup> Several case reports and studies on small series describing the clinical and histopathological features of GMS have revealed the clinical heterogeneity of this condition. Although some authors have tried to categorize GMS according to clinical presentation,<sup>4</sup> no classification is currently accepted for this disease. The consistent morphological hallmark is microcephaly, which is often present at birth (primary microcephaly) but might also develop postnatally (secondary microcephaly). Major brain abnormalities include cerebral atrophy and neural-migration defects, such as agyria, microgyria, or polymicrogyria. These structural brain abnormalities are associated with severe psychomotor impairment, hypotonia, and seizures in

half of all cases. Renal manifestations of GMS range from isolated proteinuria to overt, steroid-resistant NS, which rapidly progresses to end-stage kidney disease (ESKD) after a few months. Although NS is typically detected in the first months of life, later onset during childhood (44–198 months) has been reported in a few cases.<sup>5–7</sup> The anatomopathological lesions observed in kidney biopsies include minimal changes, focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) that might be of the collapsing type, and diffuse mesangial sclerosis, which is sometimes difficult to distinguish from FSGS.<sup>8</sup> The prognosis of GMS is poor, and most affected children die before the age of 6 years.

Although a growing number of genes have been implicated in syndromic and nonsyndromic hereditary NS, the molecular basis of GMS is currently unknown. Given its clinical heterogeneity, it is likely that this syndrome is genetically heterogeneous. In a previous study,<sup>9</sup> an analysis of candidate genes encoding proteins of the glomerular basement membrane (*LAMB2* [MIM 150325] and *LAMA5* [MIM 601033]) or podocyte proteins (*ITGB1*

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Genetics, Angers University Hospital, 49933 Angers, France; <sup>2</sup>Centre National de la Recherche Scientifique 6214 and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale 1083, Université Nantes Angers Le Mans, 49000 Angers, France; <sup>3</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité Mixte de Recherche 1163, Laboratory of Inherited Kidney Diseases, 75015 Paris, France; <sup>4</sup>Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Imagine Institute, 75015 Paris, France; <sup>5</sup>Department of Pediatric Nephrology, Necker Hospital, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, 75015 Paris, France; <sup>6</sup>Department of Pathology, Timone Hospital, Assistance Publique – Hôpitaux de Marseille, 13385 Marseille, France; <sup>7</sup>Department of Pediatric Nephrology, Faculty of Medicine, Kocaeli University, 41380 Kocaeli, Turkey; <sup>8</sup>Department of Pediatric Nephrology, Timone Hospital, Assistance Publique – Hôpitaux de Marseille, 13385 Marseille, France; <sup>9</sup>Department of Pediatric Neurology, Timone Hospital, Assistance Publique – Hôpitaux de Marseille, 13385 Marseille, France; <sup>10</sup>Department of Pediatric Radiology, Necker Hospital, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, 75015 Paris, France; <sup>11</sup>Department of Genetics, Robert Debré Hospital, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris and Université Paris Diderot, 75015 Paris, France; <sup>12</sup>Departments of Neurology, Biochemistry, and Genetics, Limoges University Hospital, 87000 Limoges, France; <sup>13</sup>Department of Genetics, Timone Hospital, Assistance Publique – Hôpitaux de Marseille, 13385 Marseille, France; <sup>14</sup>Department of Genetics, Necker Hospital, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, 75015 Paris, France

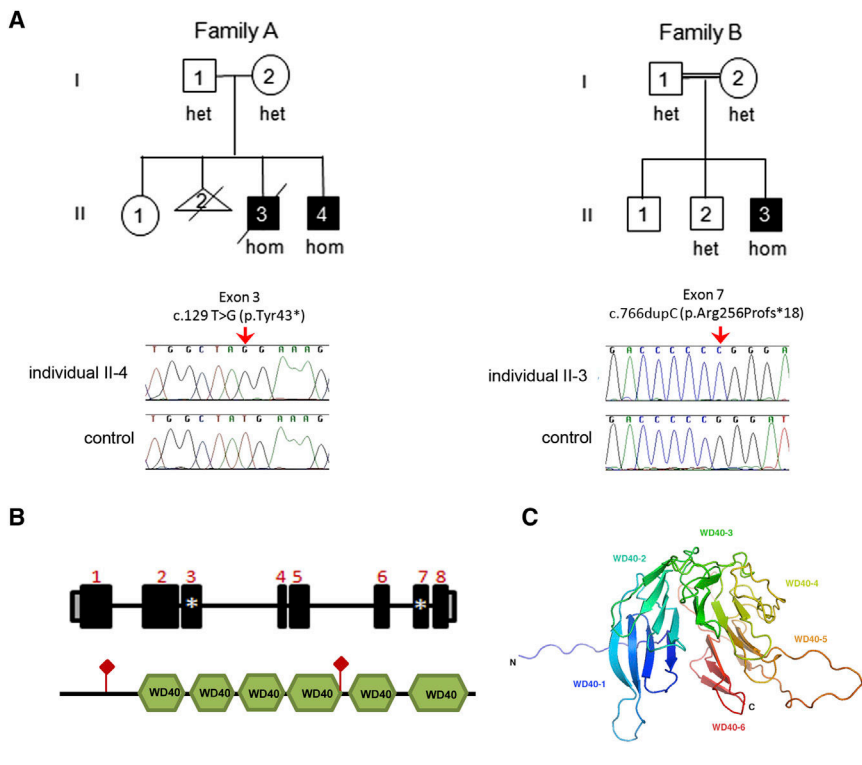
<sup>15</sup>These authors contributed equally to this work

<sup>16</sup>These authors contributed equally to this work

\*Correspondence: [corinne.antignac@inserm.fr](mailto:corinne.antignac@inserm.fr)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.10.011>. ©2014 by The American Society of Human Genetics. All rights reserved.





**Figure 1. Identification of *WDR73* Mutations, Gene Structure, and Protein Structure**

(A) Pedigrees of families A and B. The affected status is indicated by filled symbols, and the allele status is given below each tested individual. Representative chromatograms show the homozygous c.129 T>G (p.Tyr43\*) and c.766dupC (p.Arg256Profs\*18) mutations and the wild-type allele. Red arrows indicate the position of the nucleotide changes. Abbreviations are as follows: het, heterozygous; and hom, homozygous.

(B) Schematic overview of the eight exons (black boxes) of human *WDR73* and of the six WD40 repeats (green hexagons) predicted in *WDR73*. Asterisks (for the gene) and red diamonds (for the protein) denote the two mutations described in this article.

(C) Model of residues 73–370 of human *WDR73* (GenBank AAF28942.1). *WDR73* is shown as a rainbow-spectrum cartoon showing the six-bladed  $\beta$  sheets. Blades are numbered 1–6, and the direction of the polypeptide chain is indicated by a color ramp (N-terminal in blue and C-terminal in red) along the length of the ribbon.

[MIM 135630], *ITGA3* [MIM 605025], and *ACTN4* [MIM 604638]) failed to detect any causative mutation in a cohort of 18 GMS-affected individuals.

In this study, we used whole exome sequencing (WES) to identify *WDR73* mutations in two families affected by GMS. We demonstrated that the localization of the *WDR73* product, a WD40-repeat-containing protein, was cell-cycle dependent. *WDR73* was diffuse in the cytosol during interphase and enriched at the spindle poles and microtubule asters during mitosis. Functional studies in fibroblasts from one affected child and in *WDR73*-depleted podocytes revealed that loss of *WDR73* led to defects in cell survival and microtubule organization, and these might explain the dual neurologic and renal phenotype in this subset of individuals with GMS.

## Subjects and Methods

### Human Studies

Genomic DNA was isolated from blood or from cultured skin fibroblasts by standard procedures. Written informed consent was obtained from each subject involved in this study or from parents of subjects under 18 years of age. The study protocol was approved by two institutional review boards (Comité de Protection des Personnes Ile de France II and Comité d'Éthique du Centre Hospitalier Universitaire d'Angers) in accordance with French law. Pedigrees of the families involved in this study are shown in Figure 1A.

### Autozygosity Mapping and WES

Although no consanguinity was known in family A, we hypothesized that the parents could be related because of their close geographical origins. We performed a genome-wide search with

SNP microarrays (Illumina Human 660W-Quad ADN v.1.C) to identify shared runs of homozygosity (ROHs) in the two affected children (II-3 and II-4, both from family A). Data were interpreted with Illumina GenomeStudio v.2010.3 and CNVPartition v.3.1.6 (Illumina Genotyping v.1.8.4 Genome Viewer v.1.8). Analyses were mapped to the human reference genome sequence (UCSC Genome Browser assembly GRCh37/hg19).

WES was performed in individual II-3 from family A (Figure 1A) at Integragen (Evry). Whole-exome capture was performed with the SureSelect Human All Exon Kit v.2 (Agilent Technologies). The enriched library was then sequenced on an Illumina HiSeq 2000 ( $2 \times 75$  bases). Images were analyzed and the bases were determined with the pipeline Illumina RTA v.1.14 (CASAVA 1.8). Reads were mapped to the human reference genome sequence (UCSC Genome Browser assembly GRCh37/hg19). We subsequently applied autozygosity filtration to identify homozygous mutations in coding sequences within the ROHs previously detected by SNP-microarray analysis. Screening for *WDR73* mutations in additional affected individuals and segregation validation were performed by Sanger sequencing. PCR primers (Table S1, available online) were designed with the program Primer3 according to RefSeq accession number NM\_032856.2.

### Plasmids, Cell Culture, and Establishment of Lentiviral Cell Lines

The lentiviral vector pLenti-GIII-CMV-HA, which contains the human *WDR73* coding sequence (GenBank clone accession number BC063392), was purchased from Applied Biological Materials. Two hemagglutinin (HA) tags were added to the *WDR73* N terminus with the QuickChange site-directed mutagenesis kit according to the manufacturer's (Stratagene's) protocol. This construct, used for rescuing the *WDR73*-depleted podocyte phenotype, is called wild-type (WT) later in the text. Constructs were verified by Sanger sequencing. Lentiviral particles containing this construct were



produced by the lentivector production facility Structure Fédérative de Recherche BioSciences Gerland-Lyon Sud (UMS3444/US8). Two small hairpin RNAs (shRNAs) targeting the 3' UTR of the human *WDR73* mRNA (clone IDs TRCN0000135232 and TRCN0000135695 from the RNAi Consortium) in the lentiviral vector pLKO.1 were purchased from Thermo Scientific. Lentiviral particles were produced in human embryonic kidney 293T cells as previously described.<sup>10</sup> Stably *WDR73*-depleted human podocyte cell lines were obtained by transduction with both types of sh*WDR73* lentiviral particles and subsequent puromycin selection (2 µg/ml).

Primary skin fibroblasts, herein called A-II-4 fibroblasts, were obtained from individual II-4 from family A (Figure 1A) and were subsequently grown in OPTIMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum, sodium pyruvate, glutamine, fungizone, and penicillin and streptomycin (all from Life Technologies) at 37°C with 7% CO<sub>2</sub>.

A conditionally immortalized human podocyte cell line, developed by transfection with the temperature-sensitive mutant (tsA58) of the SV40-T-antigen-encoding gene, was kindly provided by M.A. Saleem (University of Bristol, Southmead Hospital, Bristol). In brief, the cells proliferated at the permissive temperature of 33°C, whereas growth arrest and differentiation were induced by incubation at the nonpermissive temperature of 37°C for 14 days. Cells were grown with 7% CO<sub>2</sub> in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, insulin-transferrin-selenium, glutamine, and penicillin and streptomycin (all from Life Technologies).

### Antibodies and Immunoblotting

Antibodies used for immunoblotting and immunofluorescence were mouse anti-GAPDH (Millipore), anti-HA (Covance), anti- $\alpha$ -tubulin (Sigma-Aldrich), rabbit anti-*WDR73* (Sigma-Aldrich), goat anti-synaptopodin, anti-lamin B, and anti- $\gamma$  tubulin (Santa Cruz), and Alexa Fluor-conjugated annexin V (Life Technologies).

Total cell lysate was extracted with lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, and 0.1% SDS). A total of 100 µg of protein was loaded onto a 4%–20% acrylamide gel (Biorad) or a 12% gel, and immunoblotting was carried out with the indicated antibodies as previously described.<sup>11</sup>

### Immunocytochemistry and Immunofluorescence

Five-micron-thick sections of formalin-fixed paraffin-embedded samples of human infant brain (3 months old) and fetal kidney (25 weeks of gestation) were obtained. Slides were dewaxed either in toluene or in Bioclear solution (Bio-Optica) for brain or kidney sections, respectively, and then immersed in water. Samples were boiled for 25 min in a water bath in antigen-retrieval solution (DakoCytomation) and subsequently cooled in the same solution at room temperature. Endogenous peroxidase activity was quenched by treatment in 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min. The sections were preincubated in normal serum diluted in PBS (10%) for 30 min for the prevention of nonspecific binding. The samples were then incubated with the anti-*WDR73* primary antibody overnight at 4°C. The bound antibodies were visualized with an avidin-biotin peroxidase kit (VECTASTAIN, Vector Laboratories), and 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) was used as a chromogen (DAB Peroxidase Substrate Kit, Vector Laboratories). Sections were counterstained with Mayer's hematoxylin, mounted, and observed with a Nikon optic microscope.

Fibroblasts and podocytes were plated on Lab-Tek Chamber Slides and on coverslips coated with rat-tail collagen type I (Corning), respectively. After 48 hr of culture, cells were fixed in either cold 100% methanol or 4% paraformaldehyde (PFA). PFA-fixed cells were treated with 50 mM NH<sub>4</sub>Cl. Cells were incubated with a blocking solution (PBS, 1% BSA, and 0.1% tween 20) for 1 hr prior to primary antibody hybridization. For tissue sections, slides were treated as described above before antibody incubation. Cells and tissues were then probed with appropriate Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (Life Technologies), and nuclei were stained with Hoechst (Life Technologies).

For assessment of microtubule repolymerization, human podocytes were incubated with 30 µM of nocodazole (Sigma) for 4 hr at 33°C or 37°C for undifferentiated or differentiated podocytes, respectively. Cells were then washed with PBS, incubated at 33°C or 37°C, and fixed after 0, 5, or 60 min. Finally, immunofluorescence was carried out as described above.

For the annexin V (Life Technologies) assay, cells were first incubated with annexin V in 10 mM HEPES, 140 mM NaCl, and 25 mM CaCl<sub>2</sub> before PFA fixation, and then nuclei were stained with Hoechst. Confocal images were obtained with a Leica TCS-SP8 microscope, and posttreatment analysis was performed with Image J.

### Cell-Proliferation Assay

Fibroblasts were seeded into 96-well plates at 8,000 cells per well in triplicate and were allowed to attach for 24 hr. Cell proliferation was assessed with the CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTT) (Promega) according to the manufacturer's protocol after 24, 48, 72, 96, and 120 hr of culture.

### WDR73 Modeling

The structure of *WDR73* was predicted with the WD40-Repeat Protein Structure Predictor (WDSP)<sup>12,13</sup> on the basis of *WDR73* sequence from GenBank accession number AAF28942.1 (residues 73–370). The structure was manually inspected, and figures were drawn in MacPyMOL (Schrödinger).

### Statistical Analysis

Results are presented as means  $\pm$  SEM or SD. Statistical analysis was performed with the Student's t test for pairwise comparisons and the ANOVA test for comparisons involving three or more groups. Analysis was carried out with GraphPad Prism. A p value of <0.05 was considered statistically significant (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.005). All experiments were performed at least three times.

## Results

### WDR73 Mutations in GMS

We performed autozygosity mapping combined with WES in a Moroccan family (family A) with two affected children to investigate the genetic basis of GMS. Both children developed secondary microcephaly and severe neurological impairment, and one also developed nephrotic syndrome (individual II-3 in family A; Figure 1A; Table 1). Genome-wide analysis with SNP arrays revealed that the affected siblings from family A share only one common ROH, which is 4.3 Mb in length and located on chromosome 15. This region contains 24 genes, one of which is





**Table 1. Clinical and Pathological Phenotypes of Affected Individuals**

	Family A		Family B
	II-3	II-4	II-3
Sex	male	male	male
Age of onset of proteinuria	NS at 5 years	no proteinuria	6 g/g at 8 years, 0.7 g/g at 13 years
Renal lesions	collapsing FSGS, podocyte hypertrophy	no (at 7 years)	FSGS, podocyte hypertrophy
Age of ESKD	5 years	no (at 7 years)	no (at 13 years)
Neurological features	secondary microcephaly (−1 SD at birth, −3 SDs at 5 years), peripheral hypertonia, axial hypotonia (diagnosed at 4 months), nystagmus, epileptic spasms, ID	secondary microcephaly (+1 SD at birth, −2.5 SDs at 2 years), peripheral and axial hypotonia (diagnosed at 4 months), epileptic spasms, ID	head circumference at −2 SDs at 5 months <sup>a</sup> and −3 SDs at 10 years, hypertonia, ID, spasticity
Brain MRI anomalies	cerebellar atrophy, thin corpus callosum	cerebellar atrophy, subtentorial atrophy	cerebellar atrophy, thin corpus callosum, subtentorial atrophy, ventricular dilation
Other features	facial dysmorphism, abnormal visual evoked potentials, optic atrophy, death at 5 years	facial dysmorphism, optic atrophy	facial dysmorphism, abnormal visual evoked potentials, optic atrophy

Abbreviations are as follows: ESKD, end-stage kidney disease; FSGS, focal segmental glomerulosclerosis; and ID, intellectual disability.

<sup>a</sup>No cranial circumference available at birth.

referenced in OMIM (*ZNF592* [MIM 613624]). Given the number of coding sequences in this ROH, we performed WES in one affected child (individual II-3 from family A). The average read coverage of chromosome 15 was 64×, and 77% of targeted bases were covered at least by 25 reads. A nonsense *WDR73* mutation (c.129T>G [p.Tyr43\*]; RefSeq NM\_032856.2) was the only homozygous damaging variant within the ROH (Figure S1). Next, we screened *WDR73* mutations in a cohort of 30 unrelated individuals with microcephaly and neurological impairment associated with glomerular lesions or isolated proteinuria. In one child from a consanguineous Turkish family, we detected another homozygous frameshift mutation in *WDR73* (c.766dupC [p.Arg256Profs\*18]). Both mutations segregated with the disease (Figure 1A), and neither is referenced in the NHLBI Exome Variant Server or in dbSNP. In addition, we screened for mutations in *WDR73* in a group of 26 individuals with microcephaly but without obvious renal involvement or any mutation in known primary microcephaly-associated genes; however, we found no mutations.

*WDR73* is predicted to encode a protein containing six WD40 motifs, which have an average score of 66.34 and an estimated accuracy of 89.5% in WDSP<sup>12,13</sup> (Figures 1B and 1C). The p.Tyr43\* alteration truncates the protein precociously and is located upstream of all of the WD40 repeats, whereas the p.Arg256Profs\*18 mutant is expected to contain four WD40 repeats (Figure 1B).

#### Phenotype of Individuals Carrying homozygous *WDR73* Mutations

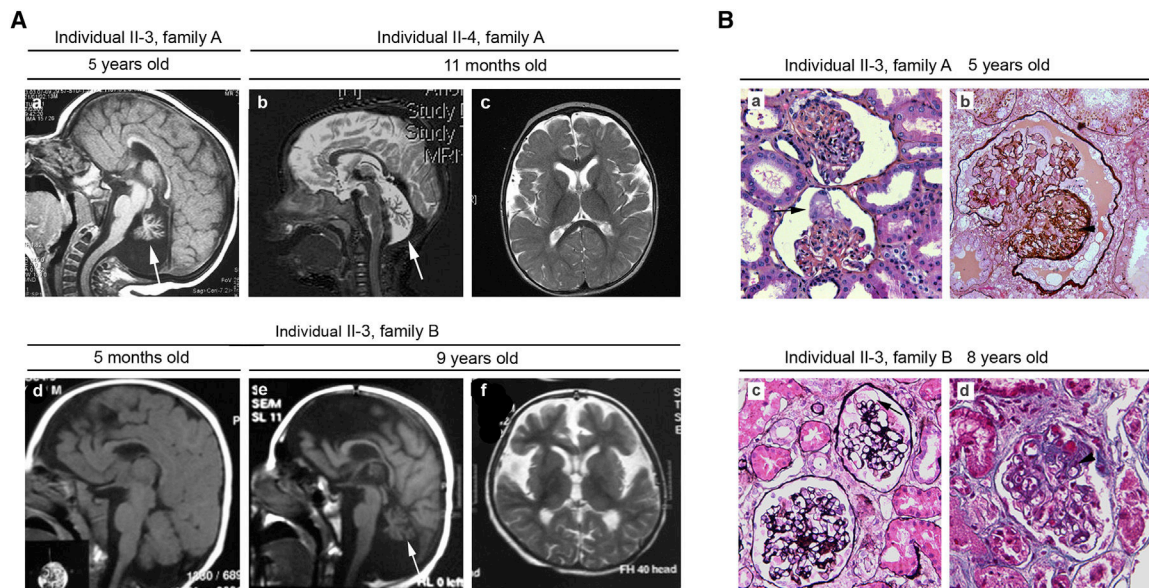
All three affected children presented with a similar neurological phenotype consisting of severe intellectual disability and secondary microcephaly diagnosed at 4 or

5 months of age (Table 1). Two of the children also suffered from epilepsy. In all affected individuals, brain MRI showed major cerebellar atrophy without brainstem anomalies, a thin corpus callosum, moderate sustentorial atrophy, and mild ventricular dilation. No apparent myelin or gyration defects were observed (Figure 2A; Table 1). Affected individuals II-3 from family A and II-3 from family B (Figure 1A) developed NS, which was detected at 5 and 8 years of age, respectively. Individual II-3 from family A presented with steroid resistant NS at 5 years of age, rapidly developed chronic renal insufficiency, and eventually died within a month. Individual II-3 in family B had normal renal function at the last examination at 13 years of age. Kidney biopsies were performed in both of these children. In individual II-3 in family A, tissue sections revealed severe collapsing FSGS, characterized by the diffuse retraction of the glomerular tufts surrounded by hypertrophic podocytes and the focal development of segmental sclerotic lesions. Foci of interstitial fibrosis and tubular dilations were associated with glomerular lesions (Figure 2B; Table 1). Lesions were less severe in individual II-3 in family B (Figure 1A), which is consistent with normal renal function in this child. However, glomerular tufts were lined by hypertrophic and focally vacuolated podocytes, and FSGS lesions affecting a small percentage of glomeruli were present along with moderate tubulointerstitial lesions (Figure 2B; Table 1). Individual II-4 from family A (Figure 1A) had no proteinuria and had normal renal function at the last follow-up examination at the age of 7 years.

#### *WDR73* Localization in the Human Kidneys and Brain

According to GeneCards, *WDR73* RNA is ubiquitously expressed in normal human tissues, including the brain and kidneys. We first sought to determine precisely the





**Figure 2. Neuroimaging and Renal Pathological Analysis**

(A) MRI features of three affected individuals with GMS. Sagittal T1 (a, d, and e) and T2 (b) images are shown. Microcephaly with no gyration defect, a thin corpus callosum, and cortical and cerebellar (arrows) atrophy without brainstem anomalies were common in all affected individuals. Axial T2 images (c and f) are shown. Ventricular dilations with moderate subtentorial atrophy were observed in individuals II-4 in family A and II-3 in family B.

(B) Kidney sections of individuals with *WDR73* mutations. Individual II-3 in family A showed (a) a marked collapse of the glomerular tufts associated with podocyte hypertrophy (arrow; trichrome-safranin stain; 63 $\times$  magnification) and (b) the presence of a FSGS lesion surrounded by a layer of enlarged podocytes. The adjacent capillary loops are retracted, and the capillary lumen is small (arrowhead; methenamine-silver stain; 100 $\times$  magnification). Individual II-3 from family B showed (c) diffuse podocyte hypertrophy and periglomerular fibrosis and large vacuoles in some cells (arrow; methenamine-silver stain; 63 $\times$  magnification) and (d) the presence of an FSGS lesion (arrowhead; trichrome-safranin stain in light green; 100 $\times$  magnification).

localization of *WDR73* in human fetal kidney and infant brain by performing immunochemistry staining on tissue sections. In fetal kidney, where all stages of nephrogenesis are present, we observed strong staining in immature podocytes from the S-shaped-body stage to the capillary-loop stage (Figure 3A, left and middle panels). In contrast to the persistent strong staining of the podocyte foot-process marker synaptopodin, *WDR73* labeling was weaker at the late stages than at the early stages of glomerular maturation. In mature glomeruli, *WDR73* had a punctuated distribution at the periphery of the glomerular tuft, outside the linear labeling of synaptopodin. This dissociated distribution suggests that *WDR73* is present in the cell body of mature podocytes (Figure 3A, right panel). We also detected an intense punctuated *WDR73* labeling in mature tubules (Figure 3A, right panel). In human infant brain, *WDR73* was found in a large variety of cells. In the cerebellum, *WDR73* immunostaining was strong in Purkinje cells and their projecting axons (Figure 3B, left panel), in the deep cerebellar nuclei (data not shown), and in pyramidal neurons of the cerebral cortex (Figure 3B, middle panel). In the white matter, *WDR73* appeared to be mainly present in astrocytes, but not in oligodendrocytes (Figure 3B, right panel). Finally, endothelial cells of cerebral capillaries also displayed a high amount of *WDR73* (Figure 3B, right panel). We observed a similar localization pattern in adult brain (data not shown).

### ***WDR73* Subcellular Localization throughout the Cell Cycle and Its Role in Cell Viability**

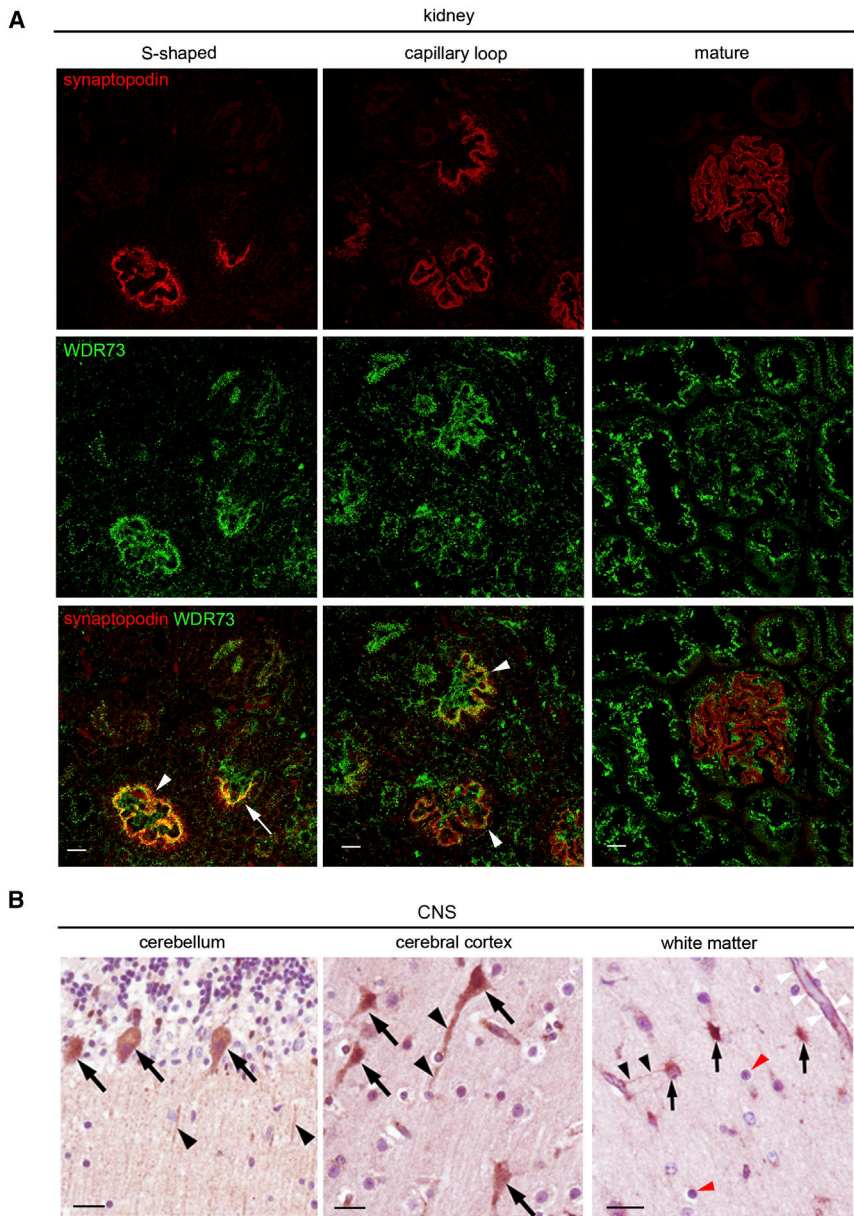
In control fibroblasts, *WDR73* displayed weak and diffuse staining within the cytoplasm during interphase, whereas during mitosis, it strongly accumulated at the spindle poles and microtubule asters and later in the cleavage furrow (Figure 4). We observed a similar pattern in a human immortalized podocyte cell line that is commonly used as a cellular model for studying glomerulopathy<sup>14</sup> (Figure S2).

We sought to elucidate the function of *WDR73*; therefore, we characterized the cellular phenotype of fibroblasts from individual II-4 in family A and podocytes stably expressing shRNA against *WDR73*. In both cell lines, the abundance of *WDR73* was drastically lower than that in the control cell lines (Figure S3A).

Interestingly, in A-II-4 fibroblasts, we observed striking abnormalities in the size and shape of the nuclei, such as budding or flecking nuclei or multinucleated cells (Figure 5A). Given that these nuclear abnormalities strongly suggest a defect in cell viability,<sup>15</sup> we conducted a cell-proliferation assay and found that cell survival was lower in A-II-4 fibroblasts than in control cells (Figure 5B). This difference could have been due to either a defect in cell proliferation or a higher rate of apoptosis. Annexin V labeling showed that the rate of apoptosis was higher in A-II-4 fibroblasts than in control cells







**Figure 3. WDR73 Localization in Kidneys and Brain**

(A) Immunofluorescence in normal human kidney sections shows the localization of WDR73 (in green) and synaptopodin (in red). During kidney development, strong labeling of WDR73 was observed from the S-shaped-body stage (white arrow) to the capillary-loop stage (arrowhead) and decreased along glomerulus maturation.

(B) Immunoperoxidase staining of endogenous WDR73 in the infant CNS. WDR73 localized to the cell body of Purkinje cells in the cerebellum (left panel, arrows), in pyramidal neurons in the cerebral cortex (middle panel, arrows), and in their projecting axons (left and middle panels, arrowheads). In the white matter (right panel), WDR73 antibodies stained the cell body of astrocytes (arrows) and their cell processes (black arrowheads) and also endothelial cells of cerebral capillaries (white arrowheads). WDR73 was not detected in oligodendrocytes (red arrowheads). Scale bars represent 20  $\mu\text{m}$ .

(Figure 5C). WDR73-depleted podocytes also presented nuclear abnormalities, mainly multilobulated nuclei. This phenotype was rescued by reintroduction of the wild-type protein (Figure 5A). However, no cell-survival defect was observed, which could have been due to the immortalization of podocytes (Figure S3B).

### Role of WDR73 in Organization of the Microtubule Network

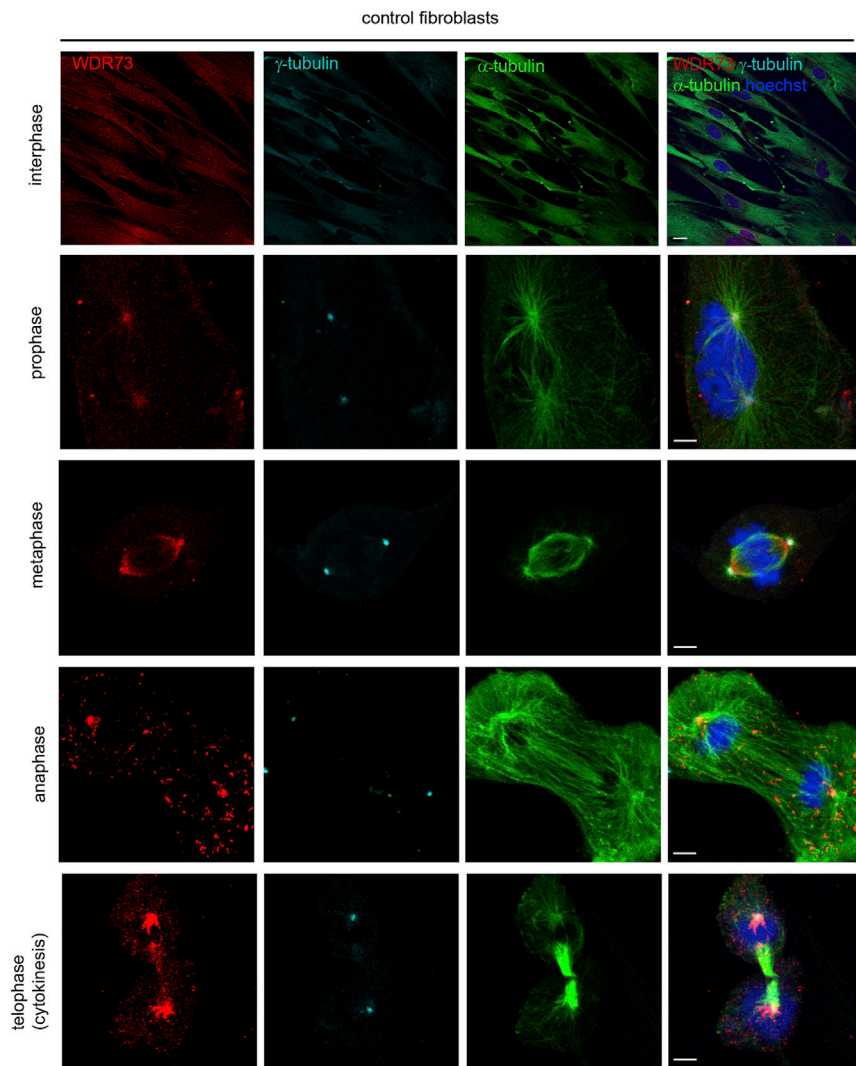
Gerlitz et al.<sup>16</sup> showed that newly synthesized microtubules anchored at the centriole generate pressure in the nucleus and thus transiently disturb its shape in physiological conditions. Once the microtubule network is reorganized, the nucleus returns to its usual shape. We thus wondered whether dysregulation of the microtubule network could be responsible for the abnormal nuclear

shape in WDR73-depleted podocytes (Figure 6, upper panel). We treated undifferentiated podocytes with nocodazole to depolymerize microtubules and monitored microtubule growth and nuclear morphology. After complete depolymerization, nuclear shape was restored, and cytosolic tubulin aggregates appeared in WDR73-depleted podocytes (Figure 6, middle panel). After 1 hr of repolymerization, the ratio of abnormally shaped nuclei to normal nuclei was higher in WDR73-depleted cells than in control cells (Figure 6, lower panel). In addition, WDR73-depleted cells displayed dense and disorganized

microtubule aggregates around the nucleus, whereas control cells showed well-spread and -distributed microtubule cables (Figure 6, lower panel).

We and others have shown that differentiated podocytes are delicate cells, and the maintenance of their architecture requires fine regulation of microtubule and actin dynamics.<sup>17–19</sup> Therefore, we also studied the organization of the microtubule network in differentiated WDR73-depleted podocytes. Whereas control and wild-type-re-expressing cells were spread with a partial localization of WDR73 adjacent to microtubule cables, the depleted cells clearly showed a loss of WDR73 along the microtubules and presented an abnormal shape (Figure 7A), also found in A-II-4 fibroblasts (Figure S4A). Similar to that in control cells, the presence of synaptopodin in differentiated WDR73-depleted podocytes suggests that WDR73





**Figure 4. WDR73 Localization during the Cell Cycle**

Immunolabeling of WDR73 (in red),  $\gamma$ -tubulin (in cyan), a marker of the centrioles, and  $\alpha$ -tubulin (in green) in control fibroblasts. During interphase, a weak cytosolic staining of WDR73 was observed. However, during mitosis (from prophase to anaphase), WDR73 relocalized to microtubule asters and the cleavage furrow. Scale bars represent 10  $\mu$ m.

deficiency does not impair podocyte differentiation (Figure S4B). We then treated differentiated podocytes with nocodazole as described above and examined the polymerization of microtubules into the aster after 5 min of recovery. The diameter of the asters was smaller in WDR73-depleted podocytes than in control cells (Figure 7B, left and middle panels). This alteration, which is a hallmark of a delay in microtubule polymerization,<sup>20</sup> was rescued by re-expression of the wild-type construct (Figure 7B, right panel). Altogether, these data suggest a crucial role for WDR73 in the regulation of microtubule dynamics and organization during interphase.

## Discussion

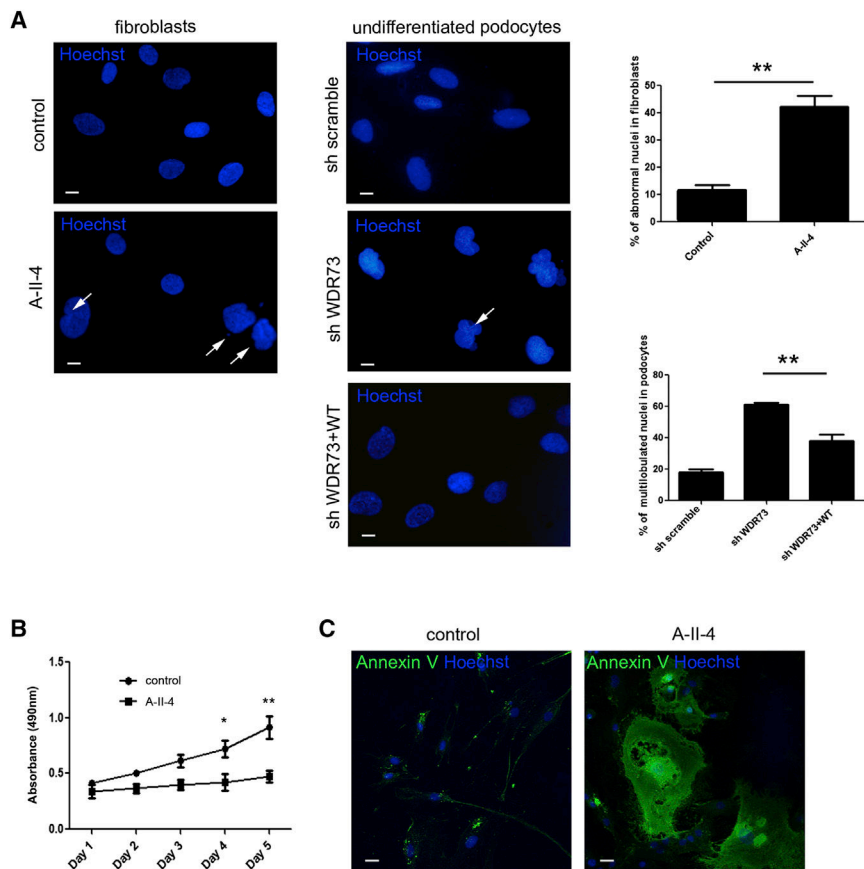
Through autozygosity mapping, WES, and subsequent genotyping in a small cohort of individuals with GMS, we identified two truncating homozygous mutations in *WDR73* in two families. The detection of mutations in a small subset of GMS-affected individuals (2 out of 31) further substantiates the idea that GMS is a genetically het-

erogeneous disease (an idea that was already suspected from its clinical heterogeneity). The main clinical manifestations in these two families were postnatal microcephaly diagnosed within the first year of life, marked cerebellar atrophy, severe intellectual disability, and late-onset NS. However, an important interfamilial and intrafamilial variability was observed for the severity of the renal phenotype: one affected child (individual II-4 in family A) showed no symptoms at the age of 7 years. This is reminiscent of what was observed in some families affected by early-onset NS and mutations in *PLCE1* (MIM 608414).<sup>21–23</sup> Furthermore, no additional mutations in genes known to be mutated in hereditary NS were found in these affected individuals, which could not explain the clinical heterogeneity of the renal phenotype. Conversely, we tested *WDR73* in 26 individuals with microcephaly without renal involvement and did not find any mutation, suggesting that *WDR73* is not involved in isolated microcephaly. Nevertheless, we suggest that physicians should screen for proteinuria in children with a neurological phenotype similar to that described above. Altogether, our data show that mutations in *WDR73* cause GMS.

*WDR73* encodes a protein containing WD40 repeats, which are motifs of approximately 40–60 amino acid residues usually ending with Trp-Asp (WD).<sup>24</sup> Each WD40 repeat folds into a four-stranded antiparallel  $\beta$  sheet blade. These blades often assemble into domains containing a seven-bladed propeller called the WD40 domain. These domains act as platforms for protein assembly, making them hubs in many cell-signaling networks.<sup>24</sup> Several genes encoding WD40-domain proteins have already been implicated in human genetic disorders.<sup>25–27</sup> *WDR73* is predicted to harbor six WD40 repeats leading to an incomplete six-bladed propeller protein. Some proteins, such as Seh1 and Sec, only have a six-bladed propeller, which interacts with another blade from a donor protein—Nup85 and Nup145, respectively—to form a  $\beta$  propeller with seven







**Figure 5. Phenotype of WDR73-Depleted Podocytes and Fibroblasts**

(A) Hoechst staining in fibroblasts (left panel) and podocytes (right panel). A-II-4 fibroblasts and WDR73-depleted podocytes displayed alterations in nuclear morphology, including budding, multilobulation (white arrows), shrinkage, or fragmentation. For generating the graphical quantification of the number of nuclear alterations, 100 nuclei from ten random fields in each condition were observed and classified as having either a normal or an abnormal nuclear shape. The Student's t test was used for comparing differences between A-II-4 and control fibroblasts. The mean  $\pm$  SEM is shown (\*  $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ). Scale bars represent 20  $\mu$ m.

(B) Graph showing the results of the colorimetric cell-proliferation assay (MTT) in fibroblasts. The viability of A-II-4 cells was significantly lower than that of control cells. The Student's t test was used for comparing differences between A-II-4 and control fibroblasts. The mean  $\pm$  SEM is shown (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).

(C) Immunolabeling of annexin V shows a higher rate of apoptosis in A-II-4 fibroblasts than in control fibroblasts. Scale bars represent 10  $\mu$ m.

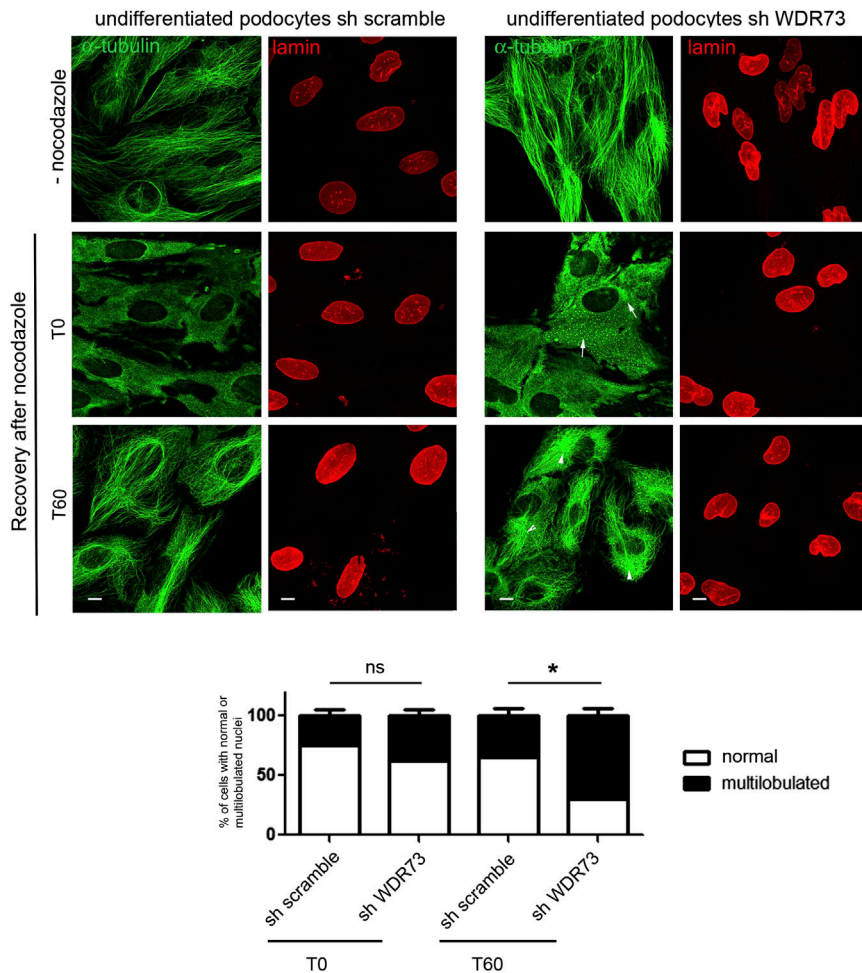
blades.<sup>28</sup> We can therefore hypothesize that WDR73 requires the association of another partner to form a complete standard propeller. WDR73 mutations, leading to the deletion of WD40 repeats, might prevent the assembly of this  $\beta$  propeller structure, thus impairing the recruitment of its partners.

Our experiments in various cell models clearly suggest a role for WDR73 in cell survival and microtubule regulation. We have shown that WDR73 is localized in the cytoplasm during interphase and then accumulates at the spindle poles and microtubule asters during mitosis. This behavior resembles that of proteins encoded by genes mutated in primary microcephaly, namely *CENPJ* (MIM 609279),<sup>29</sup> *ASPM* (MIM 605481),<sup>30,31</sup> and *WDR62* (MIM 613583).<sup>25,27,32</sup> Therefore, it is tempting to speculate that WDR73, similar to WDR62, is involved in mitosis in neural precursors during embryonic life. However, the head circumference of individuals at birth appeared normal, suggesting that the proliferation of neuronal precursors was normal; instead, we hypothesize that WDR73 has an important role in neuronal cell survival. Indeed, the cerebellar atrophy and the secondary microcephaly observed in these children could be due to a high rate of cells entering apoptosis, as observed in A-II-4 fibroblasts. In addition, the microtubule-polymerization defects observed in the cell lines and the localization of WDR73 in a large variety of neurons and their projecting axons in both the cerebral and cerebellar cortex suggest that

WDR73 is also involved in the organization of neuronal and axonal microtubule networks.<sup>33</sup> Indeed, fine regulation of the microtubule network is crucial for the completion of brain development and is required for dendritic and axonal arborization and growth, myelination, and synaptogenesis during the first years of life in both the cerebellum and the brain cortex.<sup>34</sup>

Our findings in the kidney support the idea that WDR73 plays a role in the regulation of the microtubule network, which is consistent with recent data on hereditary NS and FSGS. Indeed, genetic studies have identified >20 NS- and FSGS-associated genes, which mainly encode proteins expressed in podocytes.<sup>35</sup> This highly differentiated cell has an octopus-like shape with microtubule-enriched primary processes and interdigitated actin-rich secondary foot processes bridged by the slit diaphragm. These genes mainly encode slit-diaphragm components and actin-cytoskeleton regulators that confer to the podocyte its precise shape and plasticity. Mutations in these genes result in foot-process effacement driven by the global reorganization of the actin cytoskeleton and subsequent protein leakage in the urine. More recently, the identification of mutations in genes encoding microtubule regulators, such as *INF2* (MIM 610982),<sup>18</sup> and *TTC21B* (MIM 612014),<sup>19</sup> also suggests that the integrity of the slit diaphragm depends on microtubules, which are crucial for the maintenance of cell architecture and protein trafficking. Interestingly, the distinct





**Figure 6. Effect of WDR73 Invalidation on Microtubule Polymerization and Nuclear Shape in Undifferentiated Podocytes**

Immunolabeling of  $\alpha$ -tubulin (in green) and lamin (in red), a marker of the nuclear envelope, before and after nocodazole treatment. After microtubule depolymerization induced by 4 hr incubation with nocodazole (T0), the shape of the nucleus in WDR73-depleted cells became similar to that in control cells, and microtubule aggregates within the cytosol were observed (white arrows). After microtubule repolymerization (T60), WDR73-depleted cells contained a nonhomogenous repartition of microtubules cables (arrow head) that did not properly diffuse within the cytosol, and the nucleus became multilobulated. A graph at T0 and T60 shows the number of multilobulated cells during the microtubule-regrowth assay. The Student's t test was used for comparing differences between WDR73-depleted and control podocytes. The mean  $\pm$  SEM is shown (ns, not significant; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ). Scale bars represent 20  $\mu$ m.

immunostaining patterns of WDR73 and the actin-associated protein synaptopodin suggest that WDR73 preferentially localizes to the microtubule-enriched primary foot processes and not to the actin-rich secondary foot processes.

Although podocytes and neurons are highly differentiated cells, which are very dissimilar in terms of structure and function, both cell types share many common biological features.<sup>36–38</sup> Neurons and podocytes are both organized into a main cell body, giving rise to multiple projections that subsequently form axons and dendrites in neurons and primary foot processes in podocytes with the same atypical microtubule polarity.<sup>39</sup> In addition, several structural and regulatory proteins—such as synaptopodin,<sup>40</sup> Huntingtin-interacting protein 1, neurofascin, and olfactomedin-like 2a<sup>38</sup>—are specifically localized in both neurons and podocytes. Other similarities between podocytes and neurons include the presence of functional-neuron-like synaptic vesicles in podocytes<sup>41</sup> and the importance of glutamatergic signaling, which in podocytes contributes to the integrity of the glomerular-filtration barrier.<sup>42</sup> However, there are still very few examples of genes in which mutations have been identified as responsible for genetic diseases impairing both the glomerulus and the nervous system. Mutations in *INF2*

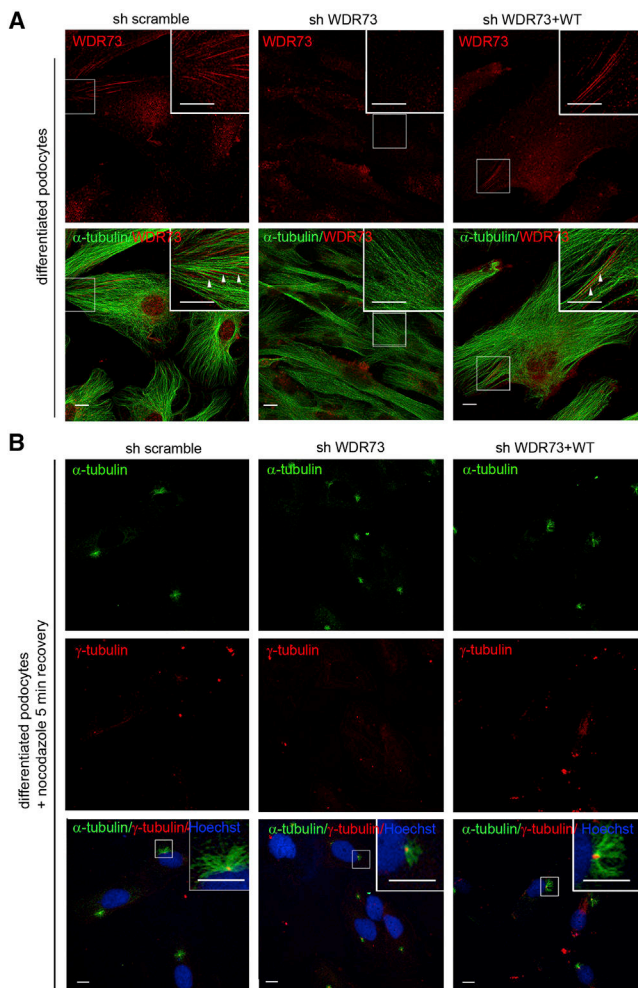
affect podocytes, Schwann cells, and peripheral nerve axons, leading to a disease associating an intermediate neuropathy with impaired glomerular function. *WDR73* is another example of a gene in which mutations result in this dual phenotype, providing additional evidence of the existence of common molecular processes of development and maintenance in the glomerulus and the nervous system.<sup>36</sup>

In conclusion, we have demonstrated that mutations in *WDR73* are responsible for GMS. The implication of *WDR73* in the regulation of the microtubule network during the cell cycle suggests that it plays a crucial role in the development and maturation of the nervous system and in the maintenance of the proper function and integrity of glomerular filtration. The identification of proteins interacting with *WDR73* and/or mutations in other genes associated with GMS will shed more light on the role of *WDR73* and the pathophysiology of this very rare condition.

#### Supplemental Data

Supplemental Data include four figures and one table and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.10.011>.





**Figure 7. Effect of WDR73 Depletion on Microtubule Polymerization and Cell Shape in Differentiated Podocytes**

(A) Immunostaining of WDR73 (in red) and  $\alpha$ -tubulin (in green) in differentiated podocytes. WDR73 localized adjacent to some microtubule cables (arrow heads). WDR73 depletion was associated with abnormal morphology and altered WDR73 localization, which was rescued by the wild-type protein.

(B) Nocodazole treatment in differentiated podocytes was conducted before immunolabeling with  $\gamma$ -tubulin (in red) and  $\alpha$ -tubulin (in green) antibodies. After 5 min of microtubule regrowth, WDR73-depleted podocytes displayed a delay in microtubule polymerization, which was restored by reintroduction of the wild-type protein.

Scale bars represent 20  $\mu$ m.

## Acknowledgments

We thank Moin A. Saleem for kindly providing the conditionally immortalized human podocyte cell line. We greatly acknowledge the Necker Institute cell-imaging facility for providing expert knowledge on confocal microscopy. We are grateful to Integragen for exome sequencing. We thank Gisèle Froment, Didier Nègre, and Caroline Costa from the lentivector production facility Structure Fédérative de Recherche Biosciences Gerland-Lyon Sud (UMS3444/US8). We thank all the individuals with Galloway-Mowat syndrome and their families for their participation in this study. We thank Kalman Tory and Sophie Saunier for helpful discussions. Financial support for this work was provided by grants

from the Agence Nationale de la Recherche (GenPod project ANR-12-BSV1-0033.01), the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013/n°305608-EURenOmics), and the "Investments for the Future" program (ANR-10-IAHU-01) to C.A., from the Angers University Hospital to E.C., and from the Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et de la Technologie to E.H.C.

Received: September 24, 2014

Accepted: October 24, 2014

Published: November 13, 2014

## Web Resources

The URLs for data presented herein are as follows:

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

Ensembl, <http://www.ensembl.org/index.html>

GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

GeneCards, <http://www.genecards.org/>

The Human Protein Atlas, <http://www.proteinatlas.org/>

NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) Exome Variant Server, <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.omim.org/>

Primer3, <http://primer3.ut.ee/>

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

WD40-Repeat Structure Predictor (WDSP), <http://wu.sccb.pkusz.edu.cn/wdsp/>

## References

- Pezzella, M., Yeghiazaryan, N.S., Veggiotti, P., Bettinelli, A., Giudizioso, G., Zara, F., Striano, P., and Minetti, C. (2010). Galloway-Mowat syndrome: an early-onset progressive encephalopathy with intractable epilepsy associated to renal impairment. Two novel cases and review of literature. *Seizure* 19, 132–135.
- Galloway, W.H., and Mowat, A.P. (1968). Congenital microcephaly with hiatus hernia and nephrotic syndrome in two sibs. *J. Med. Genet.* 5, 319–321.
- Ekstrand, J.J., Friedman, A.L., and Stafstrom, C.E. (2012). Galloway-Mowat syndrome: neurologic features in two sibling pairs. *Pediatr. Neurol.* 47, 129–132.
- Meyers, K.E., Kaplan, P., and Kaplan, B.S. (1999). Nephrotic syndrome, microcephaly, and developmental delay: three separate syndromes. *Am. J. Med. Genet.* 82, 257–260.
- Hazza, I., and Najada, A.H. (1999). Late-onset nephrotic syndrome in galloway-mowat syndrome: a case report. *Saudi J. Kidney Dis. Transpl.* 10, 171–174.
- Steiss, J.O., Gross, S., Neubauer, B.A., and Hahn, A. (2005). Late-onset nephrotic syndrome and severe cerebellar atrophy in Galloway-Mowat syndrome. *Neuropediatrics* 36, 332–335.
- Kang, L., Kuo, P.-L., Lee, K.-H., Liu, Y.-C., Chang, C.-H., Chang, F.-M., and Lin, S.-J. (2005). Late-onset growth restriction in Galloway-Mowat syndrome: a case report. *Prenat. Diagn.* 25, 159–162.
- Sartelet, H., Pietrement, C., Noel, L.-H., Sabouraud, P., Birembaut, P., Oligny, L.L., Roussel, B., and Doco-Fenzy, M. (2008). Collapsing glomerulopathy in Galloway-Mowat syndrome: a case report and review of the literature. *Pathol. Res. Pract.* 204, 401–406.



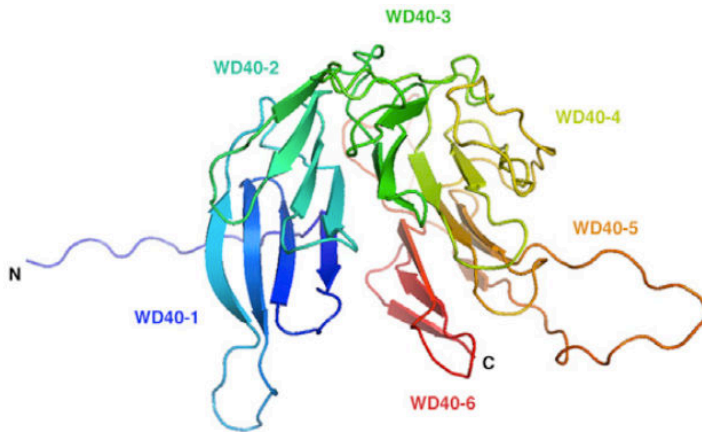


9. Dietrich, A., Matejas, V., Bitzan, M., Hashmi, S., Kiraly-Borri, C., Lin, S.-P., Mildenerger, E., Hoppe, B., Palm, L., Shiihara, T., et al. (2008). Analysis of genes encoding laminin beta2 and related proteins in patients with Galloway-Mowat syndrome. *Pediatr. Nephrol.* *23*, 1779–1786.
10. Mahuzier, A., Gaudé, H.-M., Grampa, V., Anselme, I., Silbermann, F., Leroux-Berger, M., Delacour, D., Ezan, J., Montcouquiol, M., Saunier, S., et al. (2012). Dishevelled stabilization by the ciliopathy protein Rpgrip11 is essential for planar cell polarity. *J. Cell Biol.* *198*, 927–940.
11. Mollet, G., Ratelade, J., Boyer, O., Muda, A.O., Morisset, L., Lavin, T.A., Kitzis, D., Dallman, M.J., Bugeon, L., Hubner, N., et al. (2009). Podocin inactivation in mature kidneys causes focal segmental glomerulosclerosis and nephrotic syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* *20*, 2181–2189.
12. Wu, X.-H., Wang, Y., Zhuo, Z., Jiang, F., and Wu, Y.-D. (2012). Identifying the hotspots on the top faces of WD40-repeat proteins from their primary sequences by  $\beta$ -bulges and DHSW tetrads. *PLoS ONE* *7*, e43005.
13. Wang, Y., Jiang, F., Zhuo, Z., Wu, X.-H., and Wu, Y.-D. (2013). A method for WD40 repeat detection and secondary structure prediction. *PLoS ONE* *8*, e65705.
14. Saleem, M.A., O'Hare, M.J., Reiser, J., Coward, R.J., Inward, C.D., Farren, T., Xing, C.Y., Ni, L., Mathieson, P.W., and Mundel, P. (2002). A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *J. Am. Soc. Nephrol.* *13*, 630–638.
15. Yu, C.-S., Huang, A.-C., Lai, K.-C., Huang, Y.-P., Lin, M.-W., Yang, J.-S., and Chung, J.-G. (2012). Diallyl trisulfide induces apoptosis in human primary colorectal cancer cells. *Oncol. Rep.* *28*, 949–954.
16. Gerlitz, G., Reiner, O., and Bustin, M. (2013). Microtubule dynamics alter the interphase nucleus. *Cell. Mol. Life Sci.* *70*, 1255–1268.
17. Welsh, G.I., and Saleem, M.A. (2012). The podocyte cytoskeleton—key to a functioning glomerulus in health and disease. *Nat. Rev. Nephrol.* *8*, 14–21.
18. Boyer, O., Nevo, F., Plaisier, E., Funalot, B., Gribouval, O., Benoit, G., Huynh Cong, E., Arrondel, C., Tête, M.-J., Montjean, R., et al. (2011). INF2 mutations in Charcot-Marie-Tooth disease with glomerulopathy. *N. Engl. J. Med.* *365*, 2377–2388.
19. Huynh Cong, E., Bizet, A.A., Boyer, O., Woerner, S., Gribouval, O., Filhol, E., Arrondel, C., Thomas, S., Silbermann, F., Canaud, G., et al. (2014). A Homozygous Missense Mutation in the Ciliary Gene TTC21B Causes Familial FSGS. *J. Am. Soc. Nephrol.* Published online May 29, 2014. <http://dx.doi.org/10.1681/ASN.2013101126>.
20. Recino, A., Sherwood, V., Flaxman, A., Cooper, W.N., Latif, F., Ward, A., and Chalmers, A.D. (2010). Human RASSF7 regulates the microtubule cytoskeleton and is required for spindle formation, Aurora B activation and chromosomal congression during mitosis. *Biochem. J.* *430*, 207–213.
21. Gbadegesin, R., Hinkes, B.G., Hoskins, B.E., Vlangos, C.N., Heeringa, S.F., Liu, J., Loirat, C., Ozaltin, F., Hashmi, S., Ulmer, F., et al. (2008). Mutations in PLCE1 are a major cause of isolated diffuse mesangial sclerosis (IDMS). *Nephrol. Dial. Transplant.* *23*, 1291–1297.
22. Hinkes, B., Wiggins, R.C., Gbadegesin, R., Vlangos, C.N., Seelow, D., Nürnberg, G., Garg, P., Verma, R., Chaib, H., Hoskins, B.E., et al. (2006). Positional cloning uncovers mutations in PLCE1 responsible for a nephrotic syndrome variant that may be reversible. *Nat. Genet.* *38*, 1397–1405.
23. Gilbert, R.D., Turner, C.L.S., Gibson, J., Bass, P.S., Haq, M.R., Cross, E., Bunyan, D.J., Collins, A.R., Tapper, W.J., Needell, J.C., et al. (2009). Mutations in phospholipase C epsilon 1 are not sufficient to cause diffuse mesangial sclerosis. *Kidney Int.* *75*, 415–419.
24. Xu, C., and Min, J. (2011). Structure and function of WD40 domain proteins. *Protein Cell* *2*, 202–214.
25. Bilgüvar, K., Oztürk, A.K., Louvi, A., Kwan, K.Y., Choi, M., Tatli, B., Yalnizoğlu, D., Tüysüz, B., Çağlayan, A.O., Gökben, S., et al. (2010). Whole-exome sequencing identifies recessive WDR62 mutations in severe brain malformations. *Nature* *467*, 207–210.
26. Li, D., and Roberts, R. (2001). WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* *58*, 2085–2097.
27. Yu, T.W., Mochida, G.H., Tischfield, D.J., Sgaier, S.K., Flores-Sarnat, L., Sergi, C.M., Topçu, M., McDonald, M.T., Barry, B.J., Felie, J.M., et al. (2010). Mutations in WDR62, encoding a centrosome-associated protein, cause microcephaly with simplified gyri and abnormal cortical architecture. *Nat. Genet.* *42*, 1015–1020.
28. Hsia, K.-C., Stavropoulos, P., Blobel, G., and Hoelz, A. (2007). Architecture of a coat for the nuclear pore membrane. *Cell* *131*, 1313–1326.
29. Bond, J., Roberts, E., Springell, K., Lizarraga, S.B., Scott, S., Higgins, J., Hampshire, D.J., Morrison, E.E., Leal, G.F., Silva, E.O., et al. (2005). A centrosomal mechanism involving CDK5RAP2 and CENPJ controls brain size. *Nat. Genet.* *37*, 353–355.
30. Bond, J., Roberts, E., Mochida, G.H., Hampshire, D.J., Scott, S., Askham, J.M., Springell, K., Mahadevan, M., Crow, Y.J., Markham, A.F., et al. (2002). ASPM is a major determinant of cerebral cortical size. *Nat. Genet.* *32*, 316–320.
31. Fish, J.L., Kosodo, Y., Enard, W., Pääbo, S., and Huttner, W.B. (2006). Aspm specifically maintains symmetric proliferative divisions of neuroepithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *103*, 10438–10443.
32. Nicholas, A.K., Khurshid, M., Désir, J., Carvalho, O.P., Cox, J.J., Thornton, G., Kausar, R., Ansar, M., Ahmad, W., Verloes, A., et al. (2010). WDR62 is associated with the spindle pole and is mutated in human microcephaly. *Nat. Genet.* *42*, 1010–1014.
33. Lewis, T.L., Jr., Courchet, J., and Polleux, F. (2013). Cell biology in neuroscience: Cellular and molecular mechanisms underlying axon formation, growth, and branching. *J. Cell Biol.* *202*, 837–848.
34. Friede, R.L. (1973). Dating the development of human cerebellum. *Acta Neuropathol.* *23*, 48–58.
35. Akchurin, O., and Reidy, K.J. (2014). Genetic causes of proteinuria and nephrotic syndrome: Impact on podocyte pathobiology. *Pediatr. Nephrol.* Published online March 2, 2014. <http://dx.doi.org/10.1007/s00467-014-2753-3>.
36. Kobayashi, N., Gao, S.Y., Chen, J., Saito, K., Miyawaki, K., Li, C.Y., Pan, L., Saito, S., Terashita, T., and Matsuda, S. (2004). Process formation of the renal glomerular podocyte: is there common molecular machinery for processes of podocytes and neurons? *Anat. Sci. Int.* *79*, 1–10.
37. Sun, Y., Zhang, H., Hu, R., Sun, J., Mao, X., Zhao, Z., Chen, Q., and Zhang, Z. (2014). The expression and significance of neuronal iconic proteins in podocytes. *PLoS ONE* *9*, e93999.



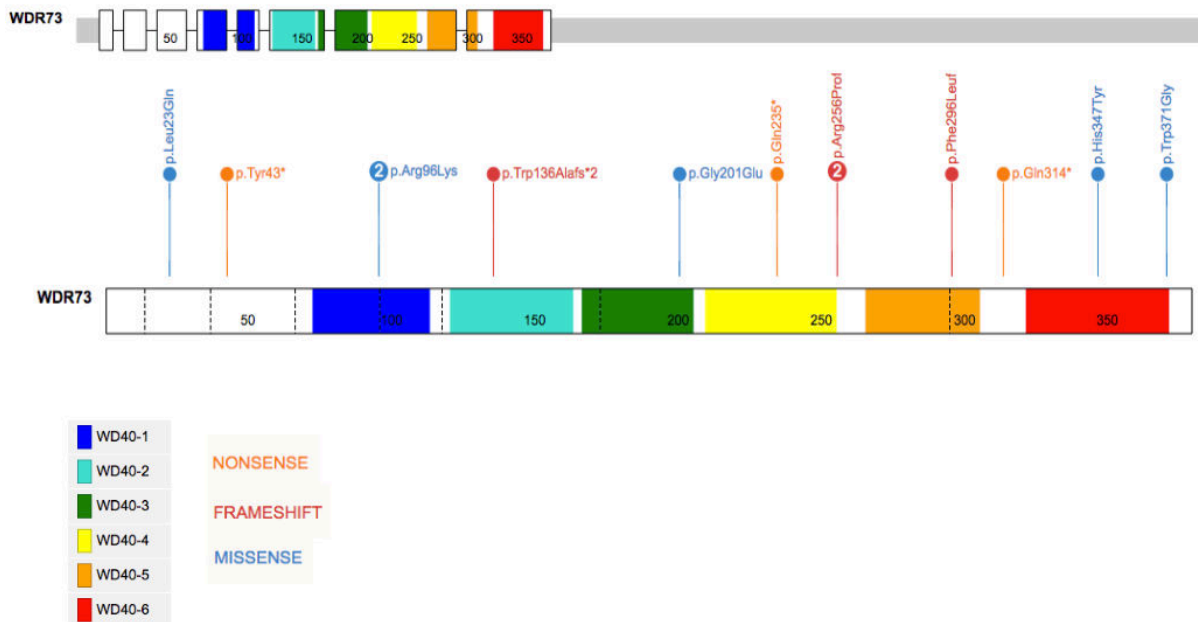


38. Sistani, L., Rodriguez, P.Q., Hultenby, K., Uhlen, M., Betsholtz, C., Jalanko, H., Tryggvason, K., Wernerson, A., and Patrakka, J. (2013). Neuronal proteins are novel components of podocyte major processes and their expression in glomerular crescents supports their role in crescent formation. *Kidney Int.* *83*, 63–71.
39. Kobayashi, N., Reiser, J., Kriz, W., Kuriyama, R., and Mundel, P. (1998). Nonuniform microtubular polarity established by CHO1/MKLP1 motor protein is necessary for process formation of podocytes. *J. Cell Biol.* *143*, 1961–1970.
40. Mundel, P., Heid, H.W., Mundel, T.M., Krüger, M., Reiser, J., and Kriz, W. (1997). Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J. Cell Biol.* *139*, 193–204.
41. Rastaldi, M.P., Armelloni, S., Berra, S., Calvaresi, N., Corbelli, A., Giardino, L.A., Li, M., Wang, G.Q., Fornasieri, A., Villa, A., et al. (2006). Glomerular podocytes contain neuron-like functional synaptic vesicles. *FASEB J.* *20*, 976–978.
42. Giardino, L., Armelloni, S., Corbelli, A., Mattinzoli, D., Zenaro, C., Guerrot, D., Tourrel, F., Ikehata, M., Li, M., Berra, S., et al. (2009). Podocyte glutamatergic signaling contributes to the function of the glomerular filtration barrier. *J. Am. Soc. Nephrol.* *20*, 1929–1940.



**Figure 35 – Modélisation de la protéine humaine WDR73 du résidu 73 à 370. (GenBank AAF28942.1). WDR73 est présenté avec ses 6 domaines WD40 numérotés de 1 à 6 et la direction de la chaîne de polypeptide est indiquée par une rampe de couleur (N-terminal en bleu et C-terminal en rouge).**

*D'après Colin et al. Am J Hum Genet. 2014 Dec 4;95(6):637-48.*



**Figure 36 – Schématisation de l'ARN et de la protéine WDR73 avec les six domaines WD40 et les mutations des six publications concernant le gène WDR73.**

Les mutations non-sens sont en orange, les tronquantes en rouge et les faux-sens en bleu.

*D'après le site <https://pecan.stjude.org/proteinpaint>*

### 3. Discussion

Dans cette étude, nous avons pu mettre en évidence, par l'association des techniques d'*homozygosity mapping* et de séquençage exomique, des variants homozygotes perte de fonction dans le gène *WDR73* responsables du syndrome GAMOS.

*WDR73* est un gène de huit exons, localisé en 15q25.2, codant pour une protéine contenant 6 domaines WD40 (figure 35) constitués de 4 pales de brins  $\beta$  antiparallèles. Cette protéine appartient à la famille des protéines WD40-repeats qui comportent classiquement l'assemblage des domaines WD40 en une hélice à 7 pales. Dans le cas de *WDR73*, il y aurait donc une hélice incomplète avec seulement 6 pales. Ces domaines WD40 agissent comme des plates-formes d'assemblage des protéines et les protéines WD40-repeats jouent un rôle dans de nombreux réseaux de signalisation cellulaire. Certaines de ces protéines, telles que Seh1 et Sec, ont seulement une hélice à six pales et interagissent avec une autre pale d'une protéine donneuse Nup85 et Nup145 respectivement, pour former une hélice complète à sept pales (407). Nous pouvons donc supposer que *WDR73* nécessite d'être associée à une protéine partenaire pour former une hélice standard complète. Jinks *et al.* ont exploré les interactions de *WDR73* avec d'autres protéines, par des techniques de SDS-PAGE et de spectrométrie de masse ; ils ont identifié que *WDR73* interagit dans un complexe avec la p70 S6 kinase régulée par mTORC1 et son substrat naturel, CAD (complexe multi-enzymatique constitué de carbamoyl-phosphate synthetase 2, d'aspartate transcarbamylase et de dihydroorotase) (408-410). De façon intéressante, les souris KO *Rptor*, qui inactivent la signalisation mTORC1, présentent une microcéphalie associée à une prolifération réduite et un ralentissement du cycle cellulaire des progéniteurs neuronaux, une apoptose neuronale accrue, ainsi qu'une protéinurie et une glomérulosclérose progressive (411,412).

La fonction de *WDR73* était inconnue lorsque nous avons débuté ce travail. *WDR73* s'exprime de façon ubiquitaire dans les tissus humains. En raison du phénotype clinique des patients ayant un GAMOS, nous avons confirmé sa forte expression dans les podocytes immatures et dans les tissus cérébraux au niveau des corps des cellules de Purkinje au niveau du cervelet, dans les neurones pyramidaux et leurs axones de projection au niveau du cortex cérébral et dans les corps des astrocytes et les cellules endothéliales des capillaires cérébraux de la substance blanche. Ces données ont été confirmées par Jinks *et al.* (408). Depuis notre publication, cinq articles impliquant des mutations bi-alléliques du gène *WDR73* dans un phénotype GAMOS ou CAMOS (Cerebellar Atrophy, Mental retardation, Optic atrophy and Skin abnormalities) ont été publiés. Cela représente, à l'heure actuelle, 55 individus issus de 16 familles différentes et 11 mutations dans *WDR73* dont trois non-sens, trois tronquantes et cinq faux-sens (figure 36) (408,413-417). Les mutations non-sens et tronquantes amputent la protéine *WDR73* d'au moins un domaine WD40.

Total des 55 Individus et pourcentage		
Consanguinité	52/54	96%
Age (années)	1,4-35	
Microcéphalie ( <-3DS)	43/54	80%
Epilepsie	21/54	39%
Spasticité	42/54	78%
Mouvements anormaux	40/54	74%
Atrophie cérébelleuse	23/23	100%
Corps calleux fin	9/14	64%
Atrophie cérébrale	17/22	77%
Faciès grossier	7/14	50%
Atrophie optique	43/50	86%
Hernie hiatale	1/22	4%
Déficiência intellectuelle	55/55	100%
Protéinurie	28/54	52%

**Tableau 4 – Tableau récapitulatif du phénotype des individus porteurs de mutations bi-alléliques de *WDR73* dans la littérature.**

55 patients ont été rapportés dans la littérature mais certains de leur symptômes n'étaient pas mentionnés dans les articles. Le pourcentage est calculé à partir des cas rapportés en détail.

Table 9 plus détaillée en annexe.

Les trois individus de notre publication présentaient tous une déficience intellectuelle sévère, une microcéphalie secondaire, une hypoplasie cérébelleuse et une atrophie optique. Sur le plan rénal, seuls deux individus présentaient une protéinurie associée ou non à une insuffisance rénale terminale. Dans l'ensemble des six articles, l'âge au dernier examen varie entre 1,4 à 35 ans (table 4 et table 9 en annexe). Le phénotype neurologique semble le plus constant. En effet, 100% des individus présentent une DI sévère ou profonde, 80% présentent une microcéphalie, 78% une spasticité, 74% des mouvements anormaux, 39% une épilepsie et 86% une atrophie optique. Concernant l'imagerie cérébrale, 100% des cas rapportés présentent une atrophie cérébelleuse, 64% un corps calleux fin, 77% une atrophie cérébrale (figure 2 en annexe). Sur le plan de la corrélation génotype-phénotype, on note que la mutation faux-sens p.Leu23Gln qui se trouve en N-terminal de la protéine est la mutation la moins sévère avec une DI modérée, une spasticité et des mouvements anormaux mais une absence de microcéphalie et d'épilepsie. Les microcéphalies les plus sévères, de -3,5 à -6,5 DS, sont retrouvées chez les individus porteurs des mutations faux-sens p.Arg96Lys et p.Gly201Glu. En revanche, nous ne retrouvons pas de corrélation génotype-phénotype pour les autres mutations, en particulier il semble ne pas y avoir de lien entre le nombre de domaines WD40 restant et le phénotype neurologique ou rénal. Enfin, seulement 52% des individus présentent une atteinte rénale avec une protéinurie. Lorsqu'une biopsie rénale a été réalisée, elle a mis en évidence une glomérulosclérose segmentaire et focale avec possible collapsing (figure 3 en annexe) et un cas de sclérose mésangiale diffuse (table 9 en annexe).

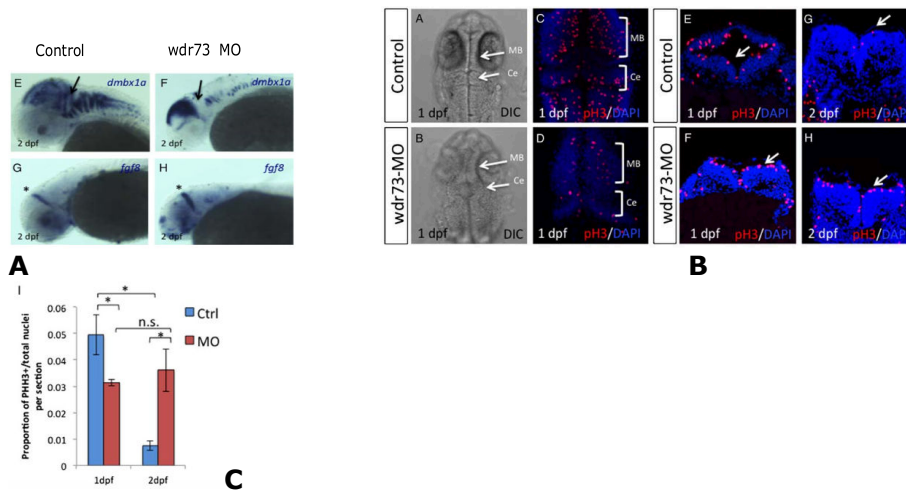
Les études de localisation cellulaire de WDR73 ont montré des variations au cours du cycle cellulaire :

- Pendant l'interphase, WDR73 est présente de façon diffuse dans le cytoplasme.
- Pendant les premières phases de la mitose, elle se relocalise au niveau des pôles du fuseau.

- Alors que pendant la télophase elle se trouve au niveau du pont de clivage.

Ce type de localisation au niveau du fuseau mitotique a déjà été rapporté pour la protéine WDR62, qui appartient également à la famille de WD40-repeats et qui est impliquée dans une microcéphalie primaire avec des anomalies corticales et une hypoplasie du corps calleux (184,190,191). WDR62 est présente au niveau des précurseurs neuronaux et des neurones post-mitotiques dans le cerveau en développement et se localise au niveau des pôles du fuseau des cellules en division.

Nous avons rapporté que l'haploinsuffisance de WDR73 entraîne des altérations de la morphologie nucléaire, majore l'apoptose cellulaire, mais altère également la polymérisation des microtubules. Le phénotype neurologique des enfants porteurs de mutations de *WDR73* (microcéphalie secondaire, DI, épilepsie) pourrait être expliqué par



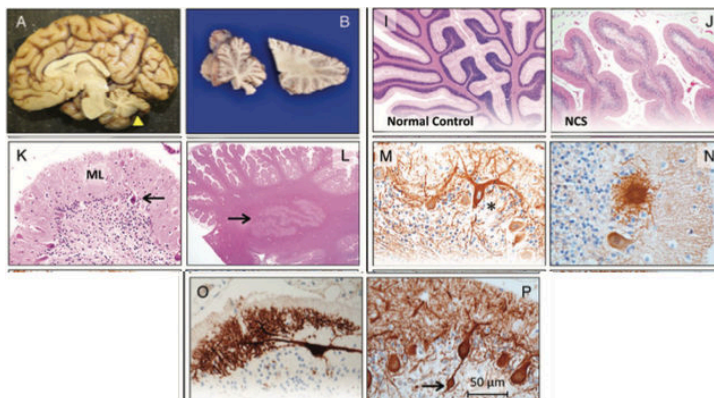
**Figure 37 - Rôle de WDR73 dans la neurogénèse cérébelleuse.**

A - Coupe antéro-postérieure d'embryons KO *wdr73* à deux jours post fertilisation. E et G contrôles, versus F et H embryons KO *wdr73*. L'astérisque marque la limite du cerveau cervico-médian et la flèche marque le cervelet. Pour toutes les images représentatives: vue latérale antérieure gauche ( $n \geq 5$  chaque groupe).

B - Déficit de croissance cérébrale des embryons KO *wdr73*. En utilisant l'immunohistochimie, nous avons observé que le nombre de cellules mitotiques progénitrices exprimant pHH3 chez les embryons KO (D et F) est diminué par rapport aux contrôles.

C - Quantification des cellules pHH3 + à un jour post fertilisation chez les contrôles et les embryons KO *wdr73* ( $n = 4$  chacun) et à deux jour post fertilisation ( $n = 3$  chacun). \*  $p < 0,05$ ; n.s. = non significatif.

D'après Ben-Omran et al. *J Med Genet.* 2015



**Figure 38 – Neuropathologie**

(A) Un enfant atteint de GAMOS est décédé des complications de son insuffisance rénale à l'âge de 3,5 ans. Le poids total du cerveau était de 636 g (60% des cas attendus) et le cerveau postérieur pesait 7,9% du total (12% prévu). (I) Le cortex cérébelleux normal coloré avec de l'hématoxyline-éosine est comparé à celui d'un enfant atteint (J), qui a une foliation courte avec des noyaux clairsemés dans la couche de cellules granuleuses. (K) Un grossissement plus élevé montre une diminution drastique des cellules granuleuses avec une préservation relative des neurones de Purkinje (flèche) et une couche mince hypercellulaire (ML). (L) Les noyaux dentelés (flèche) ont une structure et une cellularité normales. (M) Les neurones de Purkinje (astérisque) ont un gonflement des corps cellulaires et une arborescence dendritique anormale (N) et d'autres motifs de ramification complexes (O) et (P) en bulbe avec un gonflement dans les axones proximaux (flèche).

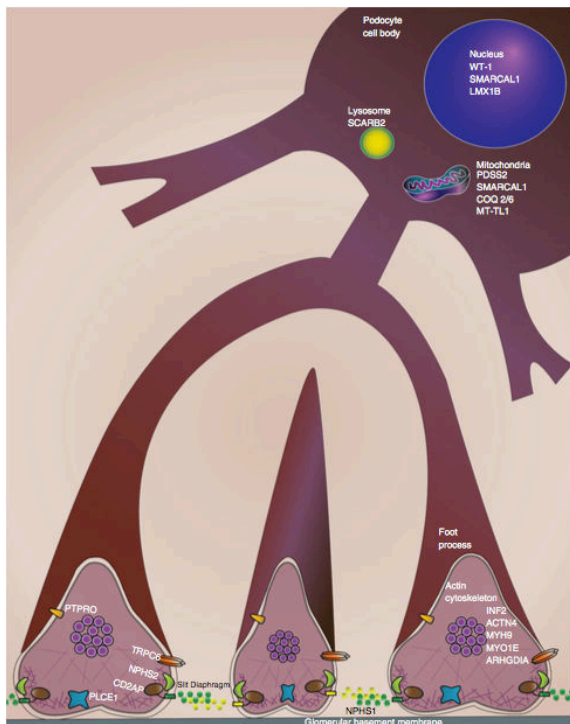
D'après Jinks et al. *Brain.* 2015.

le rôle de WDR73 dans la survie des cellules neuronales, mais également par sa participation à l'organisation de réseaux de microtubules neuronaux et axonaux. En effet, la régulation fine du réseau de microtubules est cruciale pour la maturation cérébrale, la croissance dendritique et axonale, la myélinisation et la plasticité synaptique (418).

En 2015, Ben Omran *et al.* ont montré, grâce à un modèle de poisson zèbre KO pour *wdr73*, que la protéine WDR73 jouait un rôle dans la neurogénèse cérébelleuse. En effet, ils ont mis en évidence un déficit de progéniteurs au niveau du mésencéphale. Les progéniteurs mitotiques (pH3) sont en nombre diminué à un jour post fertilisation et ils restent dans un état anormal de prolifération à deux jours post fertilisation (figure 37) (414). Étant donné que les cellules progénitrices ne parviennent pas à sortir du cycle cellulaire, Ben Omran *et al.* ont regardé si la différenciation neuronale était affectée chez les embryons KO *wdr73*. Ils ont analysé l'expression de Zebrin II par immunohistochimie, un marqueur des neurones de Purkinje dans le cervelet des mammifères, mais également des neurones analogues chez le poisson zèbre (419,420). Aucun des embryons KO *wdr73* analysés ne contenait de neurones exprimant la Zebrin II à quatre jours post fertilisation. Ces données confirment le rôle de WDR73 dans la régulation de la neurogénèse, potentiellement au niveau de la sortie ou de la différenciation du cycle cellulaire des progéniteurs. En 2015, Jinks *et al.* ont montré, par des études neuropathologiques, que le cervelet, contrairement au cortex cérébral, était anormal. Les foliations des hémisphères et du vermis étaient plus courtes et les cellules granuleuses étaient en nombre drastiquement diminué. La morphologie des neurones de Purkinje était normale mais ils étaient distribués en cluster et leur nombre était diminué. Une gliose excessive était aussi observée. L'étude immuno-histochimique de ces neurones a révélé un gonflement des corps cellulaires et une arborescence dendritique anormale pouvant évoquer une dégénérescence cellulaire (figure 38).

Le phénotype rénal du GAMOS pourrait, quant à lui, être expliqué par le rôle de WDR73 dans l'organisation des réseaux de microtubules. En effet, Les podocytes ont une forme de pieuvre avec des processus primaires, enrichis en microtubules, et des processus secondaires ou pédicelles, enrichis en actine, qui sont accolées au niveau du diaphragme des fentes de filtration (figure 39). C'est ce cytosquelette qui confère au podocyte sa forme précise et sa plasticité. Il a été montré que des mutations dans les gènes codant principalement pour les composants du diaphragme des fentes de filtration et régulant le cytosquelette, entraînaient l'effacement des processus avec pour conséquence la fuite des protéines dans l'urine (421-423). Bien que l'atteinte rénale ne semble pas être constante dans la maladie associée aux mutations de *WDR73*, l'espérance de vie des personnes semble dépendre de l'apparition d'une maladie rénale glomérulaire.





**Figure 39 – Schématisation d'un podocyte, cellule en forme de pieuvre avec des processus primaires, enrichis en microtubules, et des processus secondaires ou pédicelles, enrichis en actine.**

Les mutations génétiques associées au syndrome néphrotique induisent une lésion due à des effets sur la structure du podocyte, le cytosquelette d'actine, la signalisation du calcium et la fonction lysosomale et mitochondriale.

*D'après O Akchurin et KJ Reidy. *Pediatr Nephrol.* 2014*

Enfin, de façon un peu surprenante, il existe de nombreuses similitudes entre les neurones et les podocytes. Bien que ces deux types de cellules soient très différenciés, et qu'elles soient très différentes en termes de structure et de fonction, les neurones et les podocytes partagent de nombreuses caractéristiques biologiques communes (424,425). Ces cellules sont toutes les deux organisées en un corps cellulaire principal, qui se prolonge par de multiples projections formant des axones et des dendrites pour les neurones et les processus primaires pour les podocytes avec la même polarité atypique des microtubules (426). En outre, plusieurs protéines, telles que la synaptopodine, l'Huntingtin-interacting protein 1, la neurofascine et l'olfactomedin-like 2a sont retrouvées à la fois dans les neurones et les podocytes. Dans les podocytes on retrouve également des vésicules synaptiques « neurone-like » et la voie glutamatérique a un rôle important contribuant à l'intégrité de la barrière de filtrage glomérulaire (427,428).

Le GAMOS présente une grande hétérogénéité phénotypique qui laisse supposer une aussi grande hétérogénéité génétique. En effet, lorsque l'on reprend l'ensemble des publications sur ce syndrome, malgré ses caractéristiques cliniques communes que sont la microcéphalie, la DI avec des anomalies de cerveau et les manifestations rénales, on observe un grand nombre de signes distincts d'un individu à un autre (359,367-372,374-406,408,413,415-417,429,430). La microcéphalie peut être primaire ou secondaire ; les anomalies cérébrales peuvent être des anomalies malformatives comme des anomalies de myélinisation et le syndrome néphrotique peut être absent ou n'apparaître qu'à partir de l'adolescence. Cette grande variabilité se retrouve au niveau génétique, puisqu'à l'heure actuelle, six gènes différents sont impliqués dans ce syndrome : *WDR73*, *LAGE3*, *OSGEP*, *TP53RK* et *TPRKB* et *NUP107* (413,429,430).

Comme nous l'avons vu, *WDR73* joue un rôle au niveau du centrosome et des pôles du fuseau mitotique. Ses mutations entraînent des altérations de la morphologie nucléaire, majore l'apoptose cellulaire, et altère la polymérisation des microtubules.

Les gènes *LAGE3*, *OSGEP*, *TP53RK* et *TPRKB* codent chacun pour une des cinq sous-unités du complexe KEOPS (kinase endopeptidase and other protein of small size). Ce complexe régule une modification chimique des ARN de transfert nécessaire pour l'efficacité et la précision de la traduction. Les autres fonctions connues du complexe KEOPS concernent le contrôle de la longueur des télomères, la maintenance du génome et la régulation de la transcription des gènes. Ce complexe a également été impliqué dans la voie de signalisation de la réponse aux dommages de l'ADN associé aux télomères et présente une capacité intrinsèque de liaison à l'ADN. Son implication dans la pathogénèse du GAMOS serait due à une induction de la réponse aux dommages de l'ADN et une apoptose accrue (429).

Le gène *NUP107* appartient quant à lui à la famille des complexes associés aux pores nucléaires impliqués dans une fonction double: la régulation du trafic bidirectionnel à l'interface noyau-cytoplasme et la régulation du processus mitotique.



L'haploinsuffisance de NUP107 induit une apoptose. Les mutations de *NUP107* pourraient donc conduire à une instabilité génomique à travers des voies multiples qui perturbent les processus mitotique pendant le développement neuronal et glomérulaire (430).

L'ensemble des gènes impliqués dans le GAMOS semble donc jouer un rôle au niveau de la neurogénèse mais également au niveau du cytosquelette en ce qui concerne *WDR73*.



## **Deuxième article: Biallelic Variants in *UBA5* Reveal that Disruption of the UFM1 Cascade Can Result in Early-Onset Encephalopathy.**

**Des variants bi-alléliques d'*UBA5* révèlent que l'altération de la cascade d'*UFM1* peut être responsable d'encéphalopathies précoces.**

**Colin E**, Daniel J, Ziegler A, Wakim J, Scrivo A, Haack TB, Khiati S, Denommé AS, Amati-Bonneau P, Charif M, Procaccio V, Reynier P, Aleck KA, Botto LD, Herper CL, Kaiser CS, Nabbout R, N'Guyen S, Mora-Lorca JA, Assmann B, Christ S, Meitinger T, Strom TM, Prokisch H; FREX Consortium, Miranda-Vizueté A, Hoffmann GF, Lenaers G, Bomont P, Liebau E, Bonneau D.

***Am J Hum Genet.* 2016 Sep 1;99(3):695-703.**

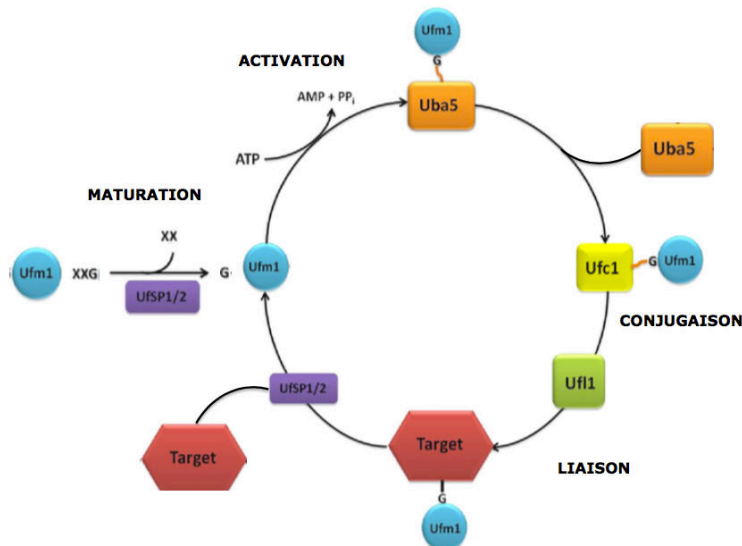
Grâce au séquençage exomique, nous avons identifié des variants récessifs rares dans le gène *UBA5* chez cinq enfants de quatre familles non apparentées affectés d'une déficience intellectuelle sévère, d'une microcéphalie, de mouvement anormaux et / ou d'épilepsie pharmaco-résistante à début précoce.

*UBA5* code pour une enzyme d'activation E1 de la protéine UFM1 (ubiquitin-fold modifier 1), impliqué dans l'ufmylation, un processus récemment identifié et similaire à l'ubiquitination.

Les études biochimiques des protéines mutantes *UBA5* et les études sur fibroblastes provenant d'individus atteints ont révélé que les mutations d'*UBA5* affectent l'ufmylation, ce qui entraîne une structure de réticulum endoplasmique anormale.

Les modèles de *Caenorhabditis elegans* knock-out pour *uba-5* et pour des gènes orthologues humains de la cascade d'ufmylation, altèrent la neurotransmission cholinergique mais pas glutamatérgique. En outre, le modèle de poisson zèbre knock-out pour *uba5* montre une diminution de sa motilité et des mouvements anormaux équivalents à des crises épileptiques. Ces résultats cliniques, biochimiques et expérimentaux confirment que les mutations d'*UBA5* altèrent le processus d'ufmylation et sont en cause dans la physiopathologie de cette encéphalopathie à début précoce.

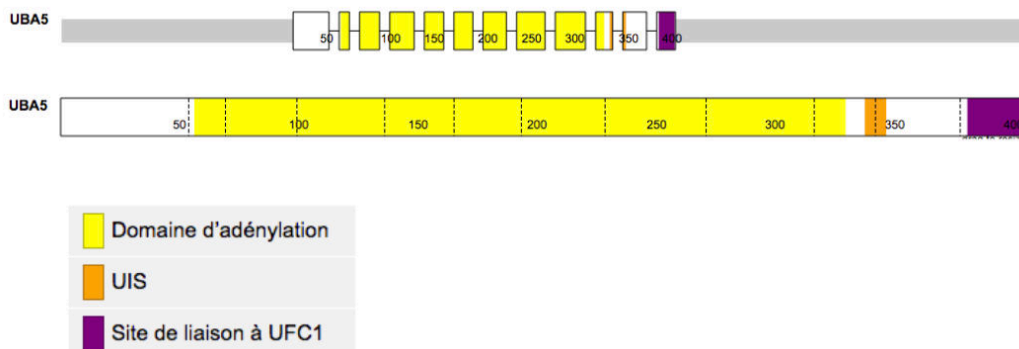
Les données supplémentaires à l'article ont été mises en annexe (p 64).



**Figure 40 – Cascade UFM1 ou ufmylation.**

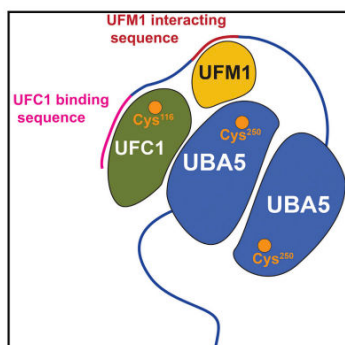
UFM1 UBA5 est l'enzyme E1 activatrice, UFC1 est l'enzyme E2 de conjugaison, UFL1 est l'enzyme E3 de liaison, UISP1 et UISP2 sont des protéases. L'activation se fait via une liaison thioesther et la conjugaison via liaison trans-thioesther.

*D'après J Daniel and E Liebau. Cells. 2014*



**Figure 41 - Schématisation de l'ARN et de la protéine UBA5 avec le domaine d'adénylation, le domaine d'interaction à UFM1 (UIS) et le site de liaison à UFC1.**

*D'après le site <https://pecan.stjude.org/proteinpaint>*



**Figure 42 - La dimérisation de UBA5 est nécessaire pour l'activation UFM1.**

L'activation d'UFM1 par UBA5 est exécutée par un mécanisme de liaison en trans et UBA5 transfère UFM1 vers UFC1 à l'aide d'un mécanisme en trans.

*D'après Oweis et al. Cell Reports 2016*

# 1. Introduction de l'article

Dans cette seconde partie de notre travail, nous nous sommes intéressés à un nouveau processus cellulaire impliqué dans la DI sévère : l'ufmylation.

Les modifications post-traductionnelles des protéines (PTM) sont des modifications covalentes et généralement enzymatiques des protéines pendant ou après leur synthèse. L'ubiquitination et l'ubiquitination-like sont des processus permettant une augmentation de la diversité du protéome. Ces processus sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires, y compris le contrôle du cycle cellulaire, la réponse au stress, la transduction du signal et la réponse immunitaire (431).

Le processus d'ufmylation est une cascade où, comme l'ubiquitine, la protéine UFM1 (ubiquitin-fold modifier 1) est conjuguée à ses protéines cibles par une réaction enzymatique en trois étapes. Les trois enzymes intervenant dans l'ufmylation sont E1 (UBA5), enzyme activatrice d'UFM1, E2 (UFC1), enzyme conjuguant UFM1 activée et E3 (UFL1), enzyme de liaison qui transfère UFM1 à ses cibles également (figure 40) (432,433). Cette cascade est conservée chez la quasi-totalité des organismes eucaryotes, mais pas chez la levure (432,434). La plupart des acteurs de la cascade UFM1 et ses protéines cibles sont localisés au niveau de la lumière du réticulum endoplasmique (RE) et sont impliqués dans la régulation de la réponse aux protéines mal repliées (unfolded protein response, UPR) et de l'apoptose médiée par le stress du RE, au métabolisme des acides gras et à la biogenèse du récepteur couplé aux protéines G (GPCR) (435-438).

*UBA5* code pour un polypeptide de 404 résidus d'acides aminés avec un poids moléculaire de 44,7 kilo Dalton. La protéine UBA5 possède un site de fixation à l'ATP, un domaine d'adénylation où se trouve une cystéine catalytique en position 250 (Cys250), un domaine d'interaction avec UFM1 (UIS) et un domaine de liaison à UFC1. Le transfert d'UFM1 de la protéine UBA5 vers UFC1 se produit via un mécanisme en trans, qui nécessite l'homodimérisation d'UBA5 (figures 41 et 42) (439,440).

Des anomalies de la cascade d'ufmylation ont été associées à certaines pathologies humaines, parmi lesquelles le cancer, les maladies cardiaques ischémiques, le diabète, la dysplasie de la hanche, la schizophrénie et l'ataxie cérébelleuse autosomique récessive (441-444,436,445-448). Cependant, la fonction biologique spécifique de l'ufmylation et les implications cliniques de son dysfonctionnement restent mal caractérisées.

Par l'utilisation du séquençage exomique chez cinq enfants de quatre familles non apparentées, nous avons mis en évidence des variants bi-alléliques du gène *UBA5*. Les caractéristiques phénotypiques de ces enfants sont : une DI sévère avec une hypotonie axiale, une spasticité et / ou des mouvements anormaux, une épilepsie pharmaco-





résistante inconstante, une microcéphalie secondaire, des anomalies à l'imagerie cérébrale, et un retard staturo-pondéral.

Notre travail a consisté à démontrer l'implication de la cascade d'ubiquitylation dans un trouble neurologique sévère précoce, de transmission autosomique récessive, par l'identification de variants bi-alléliques dans le gène *UBA5*. Grâce à une collaboration avec le Dr Eva Liebau du département de physiologie moléculaire de Münster (Allemagne) et le Dr Antonio Miranda-Vizueté de l'Institut de Biomédecine de Séville (Espagne), nous avons pu étudier les impacts des mutations sur les réactions enzymatiques de la cascade et au niveau de la neurotransmission chez *C. elegans*. Grâce à une autre collaboration avec le Dr Pascal Bomont de l'Institut de Neurosciences de Montpellier, nous avons pu montrer l'impact de l'absence d'*uba5* chez le poisson zèbre.

## 2. Article



# Biallelic Variants in *UBA5* Reveal that Disruption of the UFM1 Cascade Can Result in Early-Onset Encephalopathy

Estelle Colin,<sup>1,2,13</sup> Jens Daniel,<sup>3,13</sup> Alban Ziegler,<sup>1,2,13</sup> Jamal Wakim,<sup>2,13</sup> Aurora Scrivo,<sup>4,13</sup> Tobias B. Haack,<sup>5,13</sup> Salim Khiati,<sup>2</sup> Anne-Sophie Denommé,<sup>1,2</sup> Patrizia Amati-Bonneau,<sup>1,2</sup> Majida Charif,<sup>2</sup> Vincent Procaccio,<sup>1,2</sup> Pascal Reynier,<sup>1,2</sup> Kyriekos A. Aleck,<sup>6</sup> Lorenzo D. Botto,<sup>7</sup> Claudia Lena Herper,<sup>3</sup> Charlotte Sophia Kaiser,<sup>3</sup> Rima Nabbout,<sup>8</sup> Sylvie N'Guyen,<sup>9</sup> José Antonio Mora-Lorca,<sup>10</sup> Birgit Assmann,<sup>11</sup> Stine Christ,<sup>11</sup> Thomas Meitinger,<sup>5,12</sup> Tim M. Strom,<sup>5,12</sup> Holger Prokisch,<sup>5,12</sup> The FREX Consortium, Antonio Miranda-Vizuete,<sup>10</sup> Georg F. Hoffmann,<sup>5,14</sup> Guy Lenaers,<sup>2,14</sup> Pascale Bomont,<sup>4,14</sup> Eva Liebau,<sup>3,14</sup> and Dominique Bonneau<sup>1,2,14,\*</sup>

Via whole-exome sequencing, we identified rare autosomal-recessive variants in *UBA5* in five children from four unrelated families affected with a similar pattern of severe intellectual deficiency, microcephaly, movement disorders, and/or early-onset intractable epilepsy. *UBA5* encodes the E1-activating enzyme of ubiquitin-fold modifier 1 (UFM1), a recently identified ubiquitin-like protein. Biochemical studies of mutant *UBA5* proteins and studies in fibroblasts from affected individuals revealed that *UBA5* mutations impair the process of ufmylation, resulting in an abnormal endoplasmic reticulum structure. In *Caenorhabditis elegans*, knockout of *uba-5* and of human orthologous genes in the UFM1 cascade alter cholinergic, but not glutamatergic, neurotransmission. In addition, *uba5* silencing in zebrafish decreased motility while inducing abnormal movements suggestive of seizures. These clinical, biochemical, and experimental findings support our finding of *UBA5* mutations as a pathophysiological cause for early-onset encephalopathies due to abnormal protein ufmylation.

Post-translational modifications (PTM) of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like peptides increase the functional diversity of the proteome and are critical regulatory processes involved in many cellular functions including the control of cell cycle, stress response, signaling transduction, and immune response.<sup>1</sup>

The covalent attachment of the ubiquitin-fold modifier 1 (UFM1) to a target protein, also named ufmylation, is a recently identified ubiquitin-like PTM.<sup>2</sup> Similarly to ubiquitination, ufmylation requires a series of enzymes referred to as E1 activating enzyme (*UBA5*), E2 conjugating enzyme (*UFC1*), and E3 ligase (*UFL1*) to transfer UFM1 to its targets.<sup>3</sup> Most members of the UFM1 cascade and target proteins are localized in a large protein complex at the luminal site of the endoplasmic reticulum (ER) and are involved in the regulation of the unfolded protein response (UPR) and ER-stress-mediated apoptosis.<sup>4,5</sup> The UFM1 cascade has also been involved in the development of various cancers<sup>6,7</sup> and other diseases.<sup>5,8,9</sup> However, the specific biological function of ufmylation and the clinical implications of its dysfunction remain largely uncharacter-

ized, even though Duan et al.<sup>10</sup> reported recently the putative involvement of *UBA5* in a single family affected with recessive cerebellar ataxia. Here, we report the involvement of the ufmylation cascade in a severe autosomal-recessive early-onset neurological disorder through the identification of biallelic mutations in *UBA5* (MIM: 610552) in four unrelated families.

This study was approved by the Angers University Hospital Ethics Committee (N° 2016-40). Participants or their parents provided informed, written consent for genetic studies. Using whole-exome sequencing (WES) as a clinical diagnostic tool, we identified rare variants in *UBA5* (GenBank: NM\_024818) in two children from a French family (family A, [Figure 1](#)). These children developed an early-onset severe neurological disorder consisting of infantile spasms followed by the development of intractable epilepsy, movement disorders, severe intellectual disability, acquired microcephaly, and failure to thrive ([Table 1](#) and [Supplemental Note](#)). We excluded a dominant mutation with a germline mosaicism in one of the parents, and X-linked mutations. Then, in the absence of obvious

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Genetics, University Hospital, 49933 Angers Cedex 9, France; <sup>2</sup>UMR CNRS 6214-INSERM 1083 and PREMMI, University of Angers, 49933 Angers Cedex 9, France; <sup>3</sup>Department of Molecular Physiology, Westfälische Wilhelms-University Münster, 48143 Münster, Germany; <sup>4</sup>Avenir-Atip team, INSERM U1051, Institute of Neurosciences of Montpellier, University of Montpellier, 34091 Montpellier Cedex 5, France; <sup>5</sup>Institute of Human Genetics, Technische Universität München, 81675 München, Germany; <sup>6</sup>Department of Genetics and Metabolism, Phoenix Children's Medical Group, Phoenix, AZ 85016, USA; <sup>7</sup>Division of Medical Genetics, Department of Pediatrics, University of Utah, Salt Lake City, UT 84132, USA; <sup>8</sup>Department of Pediatric Neurology, National Reference Center for Rare Epilepsies, University Hospital Necker-Enfants-Malades, 75015 Paris, France; <sup>9</sup>Department of Pediatric Neurology, University Hospital, 49933 Angers Cedex 9, France; <sup>10</sup>Institute of Biomedicine of Seville, University Hospital Virgen del Rocío/CSIC/University of Seville, 41013 Seville, Spain; <sup>11</sup>Department of General Pediatrics, Division of Pediatric Metabolic Medicine and Neuropediatrics, University Hospital Heidelberg, 69120 Heidelberg, Germany; <sup>12</sup>Institute of Human Genetics, Helmholtz Zentrum München, 85764 Neuherberg, Germany

<sup>13</sup>These authors contributed equally to this work

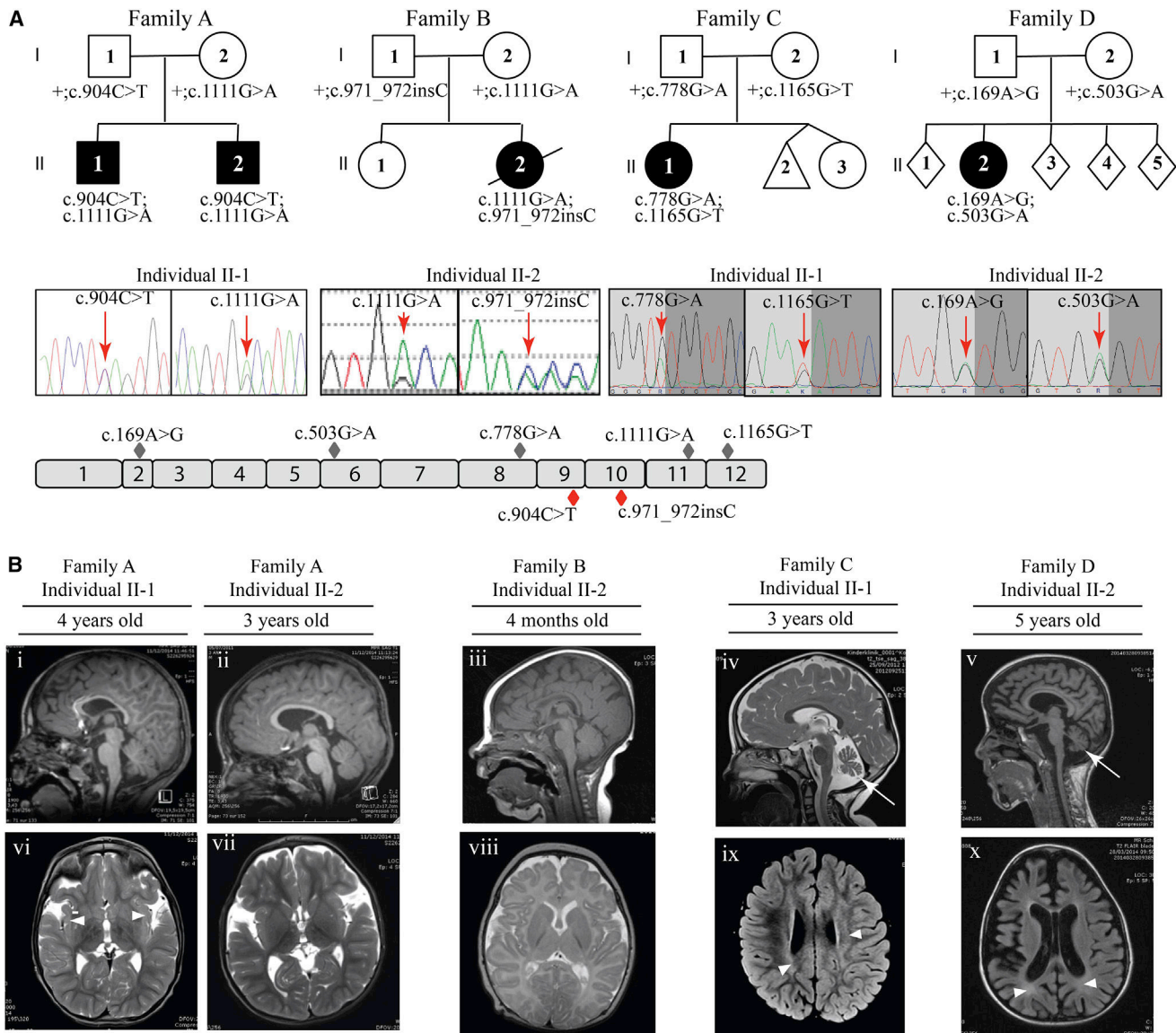
<sup>14</sup>These authors contributed equally to this work

\*Correspondence: [dobonneau@chu-angers.fr](mailto:dobonneau@chu-angers.fr)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.06.030>

© 2016 American Society of Human Genetics.





**Figure 1. Identification and Segregation of *UBA5* Mutations and Brain MRI of the Five Affected Individuals**

(A) Families with mutations in *UBA5*. Filled black symbols represent the affected individuals. Allelic status is given below each tested individual. Representative chromatograms show the compound heterozygous mutations for each family (family A: c.904C>T, c.1111G>A; family B: c.1111G>A, c.971\_972insC; family C: c.778G>A, c.1165G>T; family D: c.169A>G, c.503G>A). Red arrows indicate the position of the nucleotide change. Schematic overview of the 12 exons (gray boxes) of human *UBA5*, with missense (gray diamonds) and nonsense (red diamonds) mutations.

(B) Brain MRI of the five affected individuals. Sagittal T1 (i, ii, iii, and v) and sagittal T2 (iv) images are shown. A thin corpus callosum in individuals II-1 from family A, II-2 from family B, and II-2 from family D (i, iii, v), cortical atrophy in individual II-2 from family D (v), and cerebellar atrophy (arrows) without brainstem anomalies in individuals II-1 from family C and II-2 from family D (iv, v) are observed. Axial T2 images (vi, vii, and viii) and T2 Flair (ix, x) are shown. White matter hyperintensities (arrowheads) in insula subcortical white matter (individual II-1 in family A [vi]), periventricular region (individuals II-1 in family C and II-2 in family D [ix, x]), and delayed myelination (individual II-2 in family B) are observed (viii). Widening of sylvian fissures (individuals II-1 and II-2 in family A [vi, viii]) and global cortical atrophy with ventricular dilation (individual II-2 in family D [x]) are observed.

consanguinity and blocks of homozygosity on the SNP array (data not shown), we prioritized WES data filtering for compound-heterozygous damaging variants and found that both children harbored rare biallelic *UBA5* variants (Table 1).

We then evaluated *UBA5* using Sanger sequencing in a cohort of 51 children affected with early-onset epileptic encephalopathy of unknown etiology, and we failed to

find any additional case subjects. Next, we contacted several European genetic centers performing WES for genetic determination of unknown disorders and identified two additional unrelated families (C and D, Figure 1A) with rare biallelic variants of *UBA5* (Table 1). In each of these families, the child had severe intellectual disability and movement disorder, but no epilepsy (Table 1 and Supplemental Note).



**Table 1. Clinical Features of Individuals with *UBA5* Mutations**

Individual	Age (Years)	Sex	Nucleotide and Amino Acid Changes	Hypotonia	Spasticity	Movement Disorder	Epilepsy	ID	Vision Defect	Microcephaly	Brain MRI	EEG Abnormalities	Failure to Thrive
Family A: II-1	5	M	c.1111G>A (p.Ala371Thr); c.904C>T (p.Gln302*)	+	+	+	+	+	+	+	thin corpus callosum, hyperintensities subcortical white matter	+	+
Family A: II-2	4	M	c.1111G>A (p.Ala371Thr); c.904C>T (p.Gln302*)	+	+	-	+	+	+	+	widening of sylvian fissures	+	+
Family B: II-2	2.5	F	c.1111G>A (p.Ala371Thr); c.971_972insC (p.Lys324Asnfs*14)	+	-	-	+	+	+	+	delayed myelination, thin corpus callosum	+	+
Family C: II-1	6	F	c.778G>A (p.Val260Met); c.1165G>T (p.Asp389Tyr)	+	-	+	-	+	+	+	mild cerebellar hypoplasia, white matter hyperintensities	-	+
Family D: II-2	6	F	c.169A>G (p.Met57Val); c.503G>A (p.Gly168Glu)	+	+	+	-	+	+	+	severe cortical atrophy, thin corpus callosum, cerebellar atrophy	-	+

Abbreviations are as follows: M, male; F, female; ID, intellectual deficiency; EEG, electroencephalogram.

An additional child (family B) was identified through the family's blog that mentioned the identification through WES of *UBA5* variants. We contacted this family and the geneticists treating the child and obtained detailed clinical and molecular information (Table 1 and Supplemental Note).

WES was performed on affected children and on their both parents in families A and B and was performed only on affected children in families C and D. WES was performed at Integragen SA (family A), GeneDX (family B), and the Institute of Human Genetics, Helmholtz Center (families C and D). Whole-exome capture was performed using Agilent SureSelect Human All-Exon kit (v.2 for families A, B, and C and v.4 for family D). Sequencing was performed with Illumina HiSeq 2000 or 2500 generating paired-end reads. Average depth of coverage for families A, B, C, and D was 35×, 43×, 134×, and 78×, respectively. More than 91% of targeted regions were covered at least 10 times. DNA sequences were mapped to the reference human genome sequence (UCSC hg19) with Eland V2 for individuals from family A and BWA for individuals from families B, C, and D. CASAVA v.1.8 was used to perform variant calling and annotation for individuals from family A. SAMtools v.0.1.7 was used to detect single-nucleotide variants and small insertions and deletions for individuals from families B, C, and D.

Variants predicted to result in nonsynonymous or frame-shift changes were further filtered to prioritize both rare variants with a minor allele frequency (MAF) of less than 1% and novel variants. None of the affected children had rare variant with a MAF of less than 0.1% in any known genes associated with early-onset encephalopathies.

All *UBA5* variants were verified by Sanger sequencing. In all families, the segregation was consistent with a recessive mode of inheritance. We identified a total of seven rare *UBA5* variants including five missense variants, one nonsense variant, and one 1-bp insertion resulting in a frameshift followed by a premature stop codon (Table 1). Notably, all missense variants affected highly conserved amino acid residues (Figure S1). All these variants but one are predicted to be damaging by SIFT, MutationTaster, PolyPhen-2 HVAR, and PROVEAN prediction algorithms (Table S1). The p.Val260Met change is predicted to be neutral and benign by PROVEAN and PolyPhen-2 HVAR but damaging and disease-causing by SIFT and MutationTaster, respectively. Two of the missense variants are recorded in dbSNP 141 and Exome Aggregation Consortium (ExAC) databases: c.1111G>A (p.Ala371Thr) and c.169A>G (p.Met57Val) (Table S1).

In ExAC, the allele frequency of the c.169A>G variant is  $8.3 \times 10^{-5}$ , which is compatible with the expected very low prevalence of the disease. However, the allele frequency of c.1111G>A is 0.0046 in the Finnish population, 0.0028 in the remaining European population, and 0.00297 in the French Exome (FREX) Project database. The calculated prevalence of individuals who are homozygous for this variant would therefore vary from 1/113.370





and 1/128.460 in the French and European populations, respectively, to 1/47,260 in the Finnish population. However, c.1111G>A may act as a hypomorphic allele, as one individual who is homozygous for this allele was identified among 10,490 persons enrolled in the Finnish Sequencing Initiative Suomi (SISu) database. Importantly, this individual, who is in his fifties, is free from any neurological disorder (A.-E. Lehesjoki, personal communication). Nevertheless, in the three individuals with the most severe phenotypes of this study (families A and B), the c.1111G>A allele is associated with a loss-of-function (LOF) allele. Five LOF variants are recorded for *UBA5* in the ExAC database (Table S2) and none in the FREX database. Given the allele frequency of these variants in the European population, the maximum probability that compound heterozygosity of c.1111G>A and a LOF allele would occur by chance is  $1/3.06 \times 10^6$  (Table S2), whereas that of c.1111G>A and c.169A>G would be  $1/2.62 \times 10^6$ . These associations are absent in the ExAC and FREX databases.

Similarly, homozygosity or compound heterozygosity of LOF alleles would have a maximum frequency of  $1/73 \times 10^6$  in the European population. However, the combination of two LOF alleles is likely to be embryonically lethal, as reported for *Uba5* KO mouse<sup>11</sup> and *Drosophila*<sup>10</sup> models. Finally, any other association of pathogenic missense variants cannot be calculated, as they are not recorded in any database.

To analyze the consequences of the seven *UBA5* mutations identified in this study on UFM1 activation, a time-dependent in vitro thioester formation assay was performed as previously described<sup>2</sup> (Figures 2A and S2). We used recombinant *UBA5* isoforms reproducing the seven mutations and UFM1 (MIM: 610553), synthesized in fusion with Glutathion-S-Transferase (GST). Reaction mixtures containing one of each *UBA5* proteins, UFM1, and ATP were incubated during 0, 2, and 20 min before analyses. Conjugates of UFM1 to *UBA5* variants were observed for all *UBA5* proteins, except for the p.Gln302\* and p.Gly168Glu mutants. Nevertheless, we observed a significantly delayed activity for the p.Met57Val and p.Val260Met proteins and a slightly reduced activity for the p.Ala371Thr and p.Asp389Tyr proteins. Surprisingly, we also found a residual activity for the p.Lys324Asnfs\*14 truncated protein.

We also investigated whether *UBA5* mutations affect UFM1 conjugation to UFC1 using a trans-thioester assay.<sup>2</sup> We incubated *UBA5* isoforms with UFM1, UFC1, and ATP for 0, 3, and 30 min (Figures 2B and S3). *UBA5*-p.Asp389Tyr conjugation activity was similar to WT *UBA5*, whereas p.Met57Val, p.Val260Met, and p.Ala371Thr proteins had significantly delayed trans-thiol activities and p.Lys324Asnfs\*14, p.Gln302\*, and p.Gly168Glu proteins had no detectable activity (Figure 2B).

Thus, in vitro *UBA5* activation and conjugation assays show that p.Gln302\* and p.Gly168Glu proteins are catalytically inactive, whereas p.Met57Val, p.Val260Met, and

p.Lys324Asnfs\*14 proteins have drastic reductions in catalytic activities. In contrast, the p.Ala371Thr and p.Asp389Tyr protein activities are barely reduced which is consistent with the fact that both amino acid changes are located out of the catalytic domain (aa. 57–329) and which gives an additional argument in favor of hypomorphic alleles.

Notably, the clinical severity of the disorder appears to correlate with residual *UBA5* activity. Infantile spasms and pharmacoresistant epilepsy were observed in the three children with a null allele (families A and B) associated with drastically decreased *UBA5* activity, whereas children with two missense variants (families C and D) associated with milder impairment of *UBA5* activity had developmental delays and movement disorder but no epilepsy.

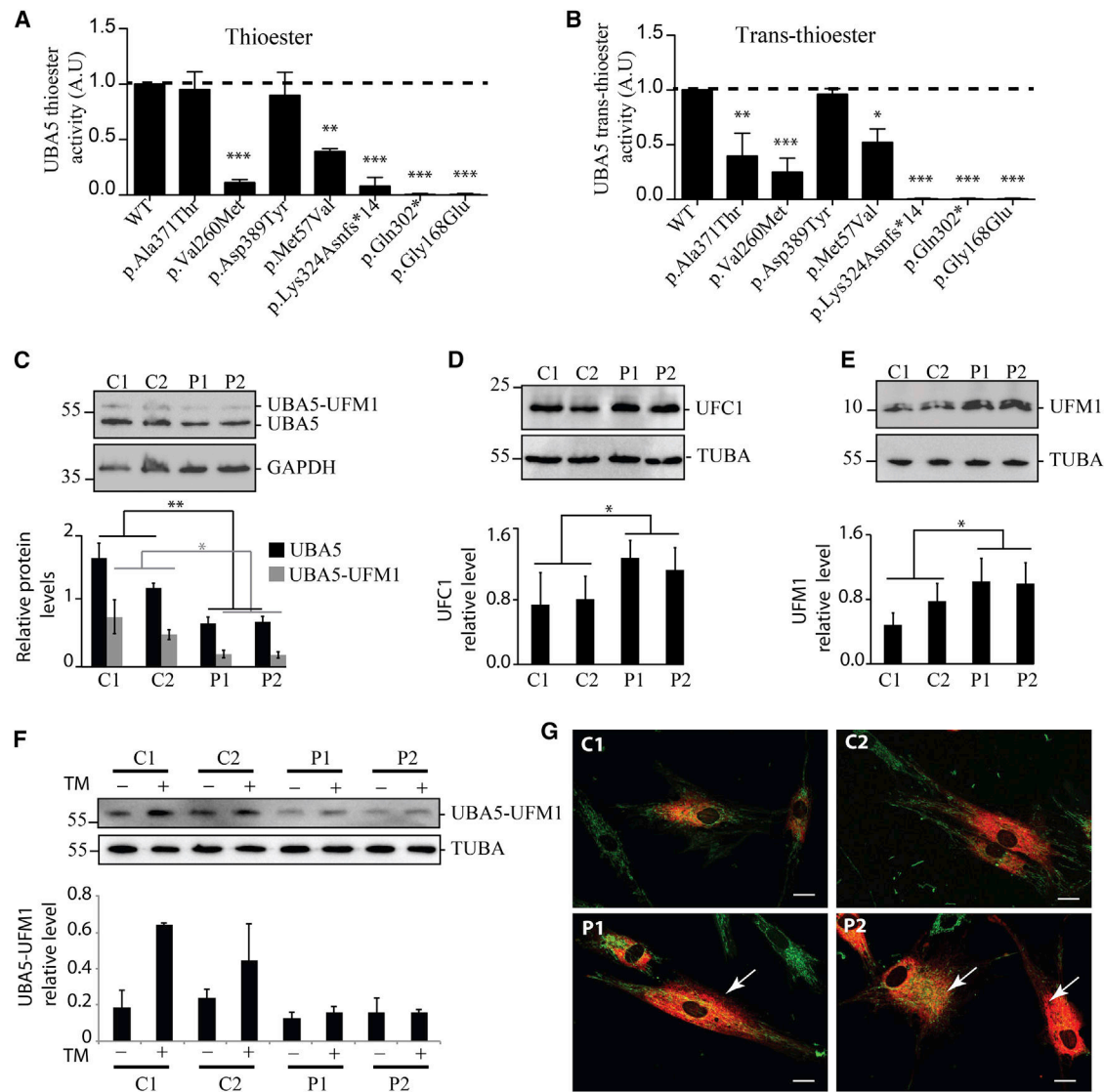
We also analyzed skin fibroblasts from the two affected children in family A. In a western blot assay, fibroblasts from these individuals, compared to WT fibroblast, showed markedly decreased expression of *UBA5* (50% decrease) and ufmylated *UBA5* (60% decrease) (Figure 2C). Expression of UFC1, encoding the E2 enzyme of the ufmylation cascade, and UFM1 were increased in the individual's fibroblasts compared to WT fibroblasts (Figure 2D and 2E). *UBA5* ufmylation after a 24 hr-long tunicamycin (TM) treatment was increased in WT cells, while mutant cells were unable to increase *UBA5* ufmylation (Figure 2F). In addition, mutant cells were resistant to TM long exposure and showed similar pro-apoptotic staurosporine sensitivity as WT cells (Figure S4). Confocal live cell imaging revealed an expanded ER network in *UBA5* mutant compared to WT fibroblasts (Figure 2G). Taken together, these results indicate that the ufmylation pathway is defective in *UBA5* mutant fibroblasts, with decreased content of *UBA5* and increased content of UFC1 and UFM1.

At a cellular level in mutant fibroblasts, the ER volume is increased and response to TM treatment is deficient. Both of these features are typically observed in cells suffering from ER stress.

The Ufm1 cascade in *C. elegans* is evolutionarily conserved, with similar targets as in humans.<sup>12</sup> Thus, we analyzed the neurotransmission capacity of worm carrying deletions in the genes encoding for the E1 enzyme *Uba5*, the protease *Ufsp2*, and for the ufmylation targets *Ufbp1* or *Cdkr3*, using aldicarb, an Ach esterase inhibitor, and pentylentetrazole (PTZ), a GABA receptor antagonist.<sup>13</sup>

Wild-type (N2 Bristol)<sup>14</sup> and Ufm1 cascade mutant worms (Table S3) did not show a seizure phenotype in the presence of PTZ, whereas PTZ-sensitive worms (*unc-43*)<sup>15</sup> showed severe seizure phenotypes (data not shown). However, compared to WT animals, all Ufm1 cascade mutants displayed a significantly higher rate of pharynx grinder paralysis in the presence of aldicarb (Figure 3A), pointing to a pathophysiological mechanism involving an increased amount of ACh in the neuromuscular junctions.<sup>13</sup> Our data are consistent with those obtained in a *Drosophila* model in which *UBA5* knockdown induced





**Figure 2. Biochemical and Cellular Characterization of the UBA5 Disease-Causing Variants**

(A and B) UBA5, UFM1, and UFC1 recombinant proteins were produced in *E. coli*, purified, and used for in vitro UFM1 thioester activation and trans-thioester conjugation reactions, according to published protocols.<sup>2</sup>

(A) In vitro assessment of UFM1 thioester activation by the UBA5-Glutathion-S-Transferase (GST) fusion proteins, each carrying one of the mutations of the affected families. The thioester formations were monitored after 2 min of incubation.

(B) Assessment of UFM1 trans-thioester conjugation to UFC1 by the UBA5-GST fusion proteins carrying each one of the mutations of the affected families. The trans-thioester formations were monitored after 3 min of incubation.

Three independent experiments were used for quantification and statistical analyses by one-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

(C–G) Skin fibroblasts from the two affected individuals from family A (P1 equate to II-1 and P2 equate to II-2) and from two control subjects were grown in DMEM-F12 for 24 hr and used for assessing the UFM1 cascade.

(C) Representative western blots (top) of free (lower bands) and ufmylated (upper bands) UBA5 (Proteintech cat# 12093-1-AP, RRID: AB\_2211743) and GAPDH (GeneTex cat# GTX100118, RRID: AB\_1080976) proteins in control (C1, C2) and UBA5 mutant (P1, P2) fibroblast protein extracts, and quantification (bottom) of the relative levels of UBA5/GAPDH and UBA5-UFM1/GAPDH.

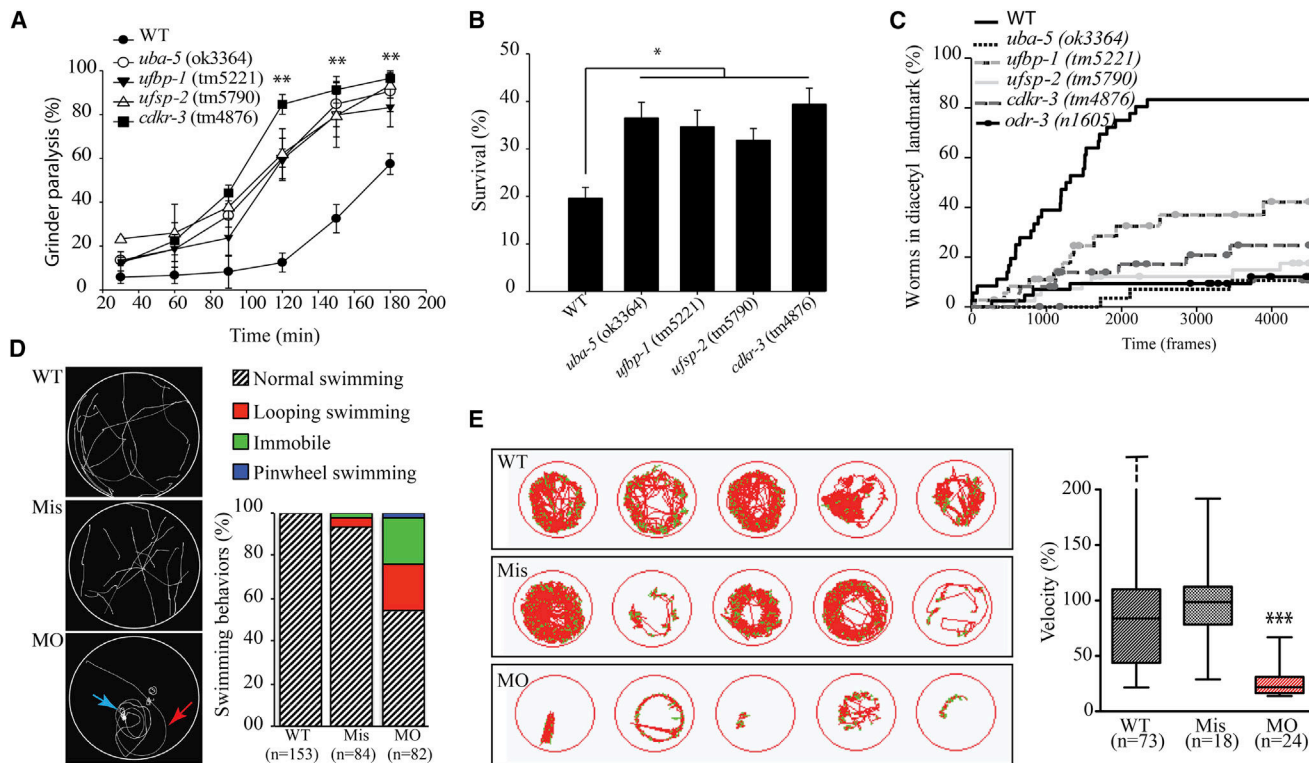
(D) Representative western blots (top) of UFC1 (Abcam cat# ab189251) and quantification (bottom) of UFC1 expression level related to TUBA (Sigma-Aldrich cat# T9026, RRID: AB\_477593).

(E) Representative western blots (top) in non-reducing conditions (using Optiblot LDS Sample buffer, Abcam) of free UFM1 (Abcam cat# ab109305, RRID: AB\_10864) and quantification (bottom) of UFM1 expression level related to TUBA.

(F) Representative western blots (top) of UBA5 ufmylation with (+) and without (–) 10  $\mu$ g/mL of tunicamycin (TM, BML-CC104, Enzo Life Sciences) treatment for 24 hr and quantification (bottom) related to TUBA. Three independent experiments were used for quantification and statistical analyses using Student's t test, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

(G) Confocal live images of WT (C1, C2) and UBA5 mutant (P1, P2) fibroblasts transduced by an RFP-tagged ER red probe (C10591, Cell-Light ER-RFP, BacMam 2.0, Thermo Fischer Scientific), and stained with MitoTracker-green (M7514, Thermofisher) to reveal the ER and mitochondria. Arrows highlight expanded ER network in UBA5 mutant fibroblasts. Scale bar represents 10  $\mu$ m.





**Figure 3. Characterization of *C. elegans* Strains Deleted for Genes Involved in Ufm1ylation and Zebrafish Silenced for *uba5***

(A–C) *C. elegans* UFM-1 cascade deletion strains *uba-5(ok3364)*, *ufbp-1(tm5221)*, *ufsp-2(tm5790)*, and *cdkr-3(tm4876)* were used for the following experiments and compared to the wild-type (WT) strain (N2 Bristol).

(A) Assessment of grinder paralysis of the UFM-1 cascade deletion strains treated with 0.5 mM aldicarb for 60 min reveal that the mutants display a highly significant increase in grinder paralysis, witnessing failure to negatively regulate acetylcholine release (ANOVA,  $**p < 0.01$ ).

(B) Assessment of survival of the UFM-1 cascade deletion strains, after an 18 hr treatment with the ER-stressor dithiothreitol (DTT, 11 mM), show that mutants are resistant to ER stress, compared to WT animals (ANOVA,  $*p < 0.05$ ).

(C) Assessment of chemotaxis toward the attractant diacetyl of the UFM-1 cascade deletion strains shows that the percentage of animals entering the landmark containing diacetyl (1/1,000) was significantly lower for the UFM-1 cascade deletion mutants compared to WT (Kaplan-Meier curve,  $p < 0.01$ ). Negative control *odr-3(n1605)* worms were unable to sense diacetyl. Trajectories of the worms were recorded for 7.5 min with 10 frames per second via the FTIR-based Imaging Method (FIM).<sup>26</sup>

(D and E) Zebrafish from the AB genetic background were maintained at 28°C on a 14 hr light and 10 hr dark cycle, and fertilized eggs were injected with the antisense *uba5* morpholino oligonucleotide (MO) and the mismatch oligonucleotide (Mis) at a concentration of 0.35 pM.

(D) Assessment of 72 hpf larvae motility, after a slight mechanical stimulation on the tail. The motion of individual larvae was examined (left) and scored (right) as normal swimming, looping swimming (red arrow), pinwheel swimming (blue arrow), or immobile and revealed a significant and specific alteration of swimming in *uba5*-depleted animals (MO), compared to larvae injected with the mismatch morpholino (Mis) and control larvae (WT). Quantification of the swimming behavior showed a normal motility for WT and Mis-injected larvae, whereas 45.1% of the MO showed impaired motility: 22% were immobile, 20.7% exhibited looping swimming, and 2.4% showed pinwheel swimming.

(E) Spontaneous motility of zebrafish monitored at 5 days post fertilization (dpf) using the Zebrabox recording system (Viewpoint). The cumulative movement of representative WT, Mis, and MO larvae is represented (left). The quantification of the velocity (right, mm/s), expressed as percentages of the WT values, revealed a significant decreased motility in *uba5*-depleted zebrafish ( $***p < 0.001$  between WT/MO and between Mis/MO but not significant between WT/Mis; statistical significance was inferred with the non-parametric Mann-Whitney test). Horizontal bars in the boxes represent the median values, horizontal bars outside the boxes represent the maximal and minimal individual values (in the WT, the maximal individual value was 676%).

locomotive defects, a shortened lifespan, and aberrant neuromuscular junctions (NMJs).<sup>10</sup> Treatment with levamisole, an ACh receptor agonist known to paralyze worms,<sup>16</sup> did not induce differences in motility between control and mutant worms (Figure S5), suggesting that the alteration of Ufm1 cascade and of Ufbp1 and Cdkr3 induce increased ACh release in neuromuscular junctions. Although it is premature to directly extrapolate these results to brain dysfunction in humans, it is interesting to note the estab-

lished associations between ACh neuron function and severe central neurological disorders. First, mutations in *CHRNA4* (MIM: 118504), *CHRN2* (MIM: 118507), and *CHRNA2* (MIM: 118502), encoding nicotinic acetylcholine receptor (nAChR)  $\alpha$  and  $\beta$  subunits, cause autosomal-dominant nocturnal frontal lobe epilepsy (ADNFLE [MIM: 600513]), an epileptic disorder with clusters of motor seizures occurring predominantly during sleep.<sup>17,18</sup> In addition, neuronal nAChRs participating in synaptic plasticity





are involved in learning, memory, and brain development.<sup>19</sup> Second, disruptions or alterations of nicotinic cholinergic mechanisms are involved in neurological disorders, including epilepsy, schizophrenia, Parkinson disease, dementia with Lewy bodies, and Alzheimer disease.<sup>19</sup> Finally, a selective reduction in acetylcholinergic neurons (AChNs) has been found in the pedunculopontine tegmental nucleus of people with refractory epilepsy including infantile spasms.<sup>20</sup> Although these findings support a role for AChNs dysfunction in neurologic disorders (including some with epilepsy), it is fair to conclude that the specific chain of events from UBA5 dysfunction to the associated clinical condition reported here (with refractory epilepsy, movement disorders, and severe developmental delay) remains largely uncharacterized—an unsurprising situation given the complexity of the cholinergic regulation in both developing and mature brains.<sup>21</sup>

In addition, because *C. elegans uba-5(ok3364)* mutants are resistant to ER stress,<sup>12</sup> we monitored the effect of dithiothreitol (DDT) treatment on all Ufm1 cascade mutants and found that, compared to WT, they were resistant to ER stress (Figure 3B). Therefore, both in mutated fibroblasts and in *C. elegans*, alteration of the Ufm1 cascade induces ER-stress resistance, although without triggering the unfolded protein response (UPR; data not shown). Together, these data suggest that a close connection exists between ufmylation and ER physiology, without pointing to the UPR as the culprit mechanism in this disease. Our results further suggest that the ufmylation targets UFBP1 and CDK5RAP3, which are involved in functions downstream of UFM1 cascade,<sup>5,6,22–24</sup> might play a crucial role in the pathogenicity of the disease. Indeed, these proteins aggregate in a large complex with UFL1 and UFSP2 at the ER membrane,<sup>5,6,23,25</sup> and CDK5RAP3 decreases the kinase activity of CDK5, which mutations are responsible for a severe form of epileptic encephalopathy associated with lissencephaly.<sup>26</sup>

In a next step, using a computer-aided chemotaxis assay, we analyzed the effects of the Ufm1 cascade on *C. elegans* sensorial behavior by a chemotaxis assay with the attractant diacetyl.<sup>27</sup> Results revealed a decreased ability in sensing diacetyl in all mutants compared to WT animals (Figure 3C), pointing to a failure in the *C. elegans* sensory system in the absence of the Ufm1 cascade and its targets.

Finally, we examined the phenotype of zebrafish (*Danio rerio*) silenced for *uba5*. We first identified the single *uba5* ortholog gene in the zebrafish genome (GenBank: NP\_001292546.1), which encodes a protein sharing 80% identity with human UBA5. The *uba5* morpholinos (MOs) and mismatch MOs (Mis) (Gene Tools) were designed against the splice junction between intron 1 and exon 2 of the zebrafish *uba5*. Embryos injected with *uba5*-MO or control *uba5*-Mis did not reveal morphological alteration in comparison to non-injected WT embryos at 24, 48, and 72 hr post fertilization (hpf) (data not shown), indicating a normal development of *uba5*-depleted larvae. Nevertheless, the motility of the

morphants was considerably altered, as suspected by their decreased movements and difficulty to exit the chorion (data not show). To quantify the motility defect, we examined the touch-escape response of larvae at 72 hpf. Although WT and *uba5*-Mis injected larvae exhibited linear movement upon stimulation, morphants were either unable to move or exhibited looping or pinwheel swimming (Figure 3D, showing representative traces of Movies S1, S2, and S3). The analysis of large populations revealed a pronounced impaired motility in 45.1% of the *uba5*-MO-injected larvae (Figure 3D, Movies S4, S5, and S6), with predominant looping (37% of the mobile morphants). To further characterize the motor activity of *uba5*-depleted zebrafishes, we tracked the spontaneous motility of 5-day-old larvae, which revealed a severe and specific decrease in morphant motility (Figure 3E). Thus, silencing of *uba5* in zebrafish resulted in seizure-like behavior<sup>28,29</sup> and decreased locomotor function, both reminiscent of clinical phenotypes in the most severely affected children in this study. The findings underscore the crucial importance of UBA5 activity and thereby protein ufmylation in central nervous system function.

Further suggestive evidence linking ufmylation to neurological disorders derives from the observation that UFC1 and UFM1 colocalize with NCAM on the cell surface of neurons.<sup>30</sup> NCAM is a neural cell adhesion molecule implicated in axon growth, neuronal differentiation, and synaptic plasticity in brain. UFM1 overexpression also increases the endocytosis of NCAM, a process that has to be fine-tuned for proper nervous system development.<sup>31</sup> Finally, interactors of the ufmylation cascade have been found using mass spectrometry,<sup>32</sup> including USP9X, which is required for proper neural cell migration and axonal growth. Loss-of-function mutations of *USP9X* (MIM: 300072) cause an X-linked intellectual disability.<sup>33</sup>

In summary, we report clinical, molecular, and experimental evidence indicating that biallelic *UBA5* mutations cause early-onset encephalopathy characterized by seizures, developmental delays, and movement disorders. We suggest that adding *UBA5* to gene panels targeted to individuals with early-onset refractory seizures or movement disorders accompanied by severe intellectual deficiency could increase the diagnostic yield and help with clinical management and genetic counseling.

#### Accession Numbers

Whole-exome sequencing data for family A have been deposited in the European Nucleotide Archive (ENA) with accession PRJEB9854. The GenBank accession number for zebrafish *mmp21* is KT207790.

#### Supplemental Data

Supplemental Data include a clinical note, five figures, three tables, and six movies and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.06.030>.





## Consortia

The FREX Consortium's principal investigators are Emmanuelle Génin, Dominique Champion, Jean-François Dartigues, Jean-François Deleuze, Jean-Charles Lambert, and Richard Redon. Collaborators are as follows: bioinformatics group (Thomas Ludwig, Benjamin Grenier-Boley, Sébastien Letort, Pierre Lindbaum, Vincent Meyer, Olivier Quenez), statistical genetics group (Christian Dina, Céline Bellenguez, Camille Charbonnier-Le Clézio, Joanna Gienza), data collection (Stéphanie Chatel, Claude Férec, Hervé Le Marec, Luc Letenneur, Gaël Nicolas, Karen Rouault), and sequencing (Delphine Bacq, Anne Boland, Doris Lechner).

## Acknowledgments

We thank all the families for their participation in this study. We thank INSERM and CNRS, the Région Pays de la Loire, Angers Loire-Métropole, University of Angers, and University Hospital of Angers for their financial support to the PREMMI project, the University of Montpellier for institutional support, the German Bundesministerium für Bildung und Forschung through the German Network for mitochondrial disorders (mitoNET, 01GM1113C to T.M. and H.P.), and the E-Rare project GENOMIT (01GM1207 for T.M. and H.P.). T.B.H. was supported by the BMBF through the Juniorverbund in der Systemmedizin "mitOmics" (FKZ 01ZX1405C). This work was also supported by France Génomique National infrastructure, funded as part of "Investissement d'avenir" program managed by Agence Nationale pour la Recherche. We thank the Caenorhabditis Genetics Center and the National Bioresource Project for the Experimental Animal Nematode *C. elegans* (NBRP) for providing us with knockout strains. We thank C. Klämbt, B. Risse, N. Otto, and D. Berh for the opportunity to use the FIMtrack system for chemotaxis assay on *C. elegans* and for their support in data analysis. We thank Mr. Cubedo and Dr. Rossel for hosting zebrafish (INSERM U710) and C. Conan for performing the touch-response test. A.S. is funded by the Région Languedoc-Roussillon and P.B. is supported by grants from the Avenir-Atip program from INSERM and the CNRS, the Région Languedoc-Roussillon, and the Association Française contre les Myopathies. We thank Delphine Heron for having tested *UBA5* in children affected with early encephalopathy and Joanne Walker and Kanaya Malkani for critical reading of the manuscript.

Received: January 27, 2016

Accepted: June 28, 2016

Published: August 18, 2016

## Web Resources

BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>  
dbSNP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>  
Ensembl Genome Browser, <http://www.ensembl.org/index.html>  
European Nucleotide Archive, <http://www.ebi.ac.uk/ena>  
ExAC Browser, <http://exac.broadinstitute.org/>  
France Génomique (FREX) Project, <https://www.france-genomique.org/spip/>  
GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>  
GeneCards, <http://www.genecards.org>  
Morpholinos (Gene Tools), [http://www.gene-tools.com/morpholino\\_antisense\\_oligos](http://www.gene-tools.com/morpholino_antisense_oligos)

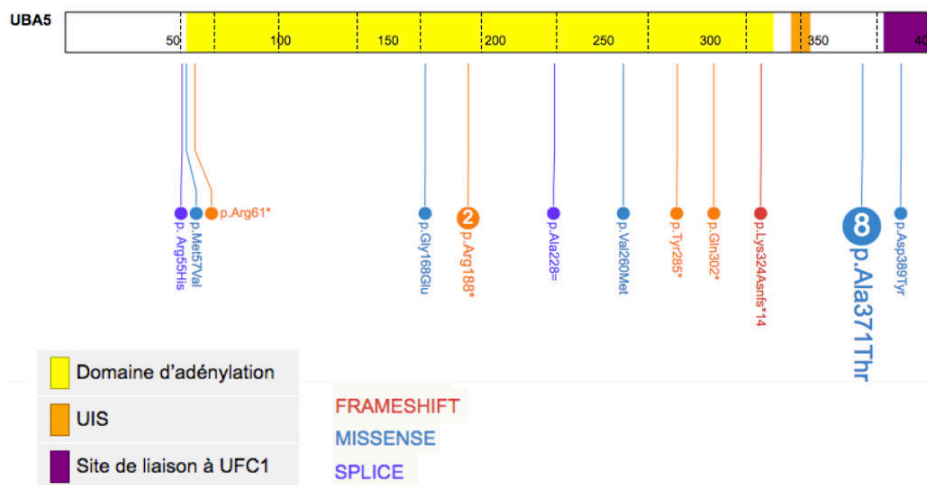
MutationTaster, <http://www.mutationtaster.org/>  
OMIM, <http://www.omim.org/>  
PolyPhen-2, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>  
Primer3, <http://bioinfo.ut.ee/primer3>  
PROVEAN, <http://provean.jcvi.org>  
RefSeq, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq>  
RRID, <https://scicrunch.org/resources>  
SIFT, <http://sift.bii.a-star.edu.sg/>  
SISu Project, <http://www.sisuproject.fi/>  
The Human Protein Atlas, <http://www.proteinatlas.org/>  
ZFIN: BLAST Query, <https://zfin.org/action/blast/blast>

## References

1. van der Veen, A.G., and Ploegh, H.L. (2012). Ubiquitin-like proteins. *Annu. Rev. Biochem.* *81*, 323–357.
2. Komatsu, M., Chiba, T., Tatsumi, K., Iemura, S., Tanida, I., Okazaki, N., Ueno, T., Kominami, E., Natsume, T., and Tanaka, K. (2004). A novel protein-conjugating system for Ufm1, a ubiquitin-fold modifier. *EMBO J.* *23*, 1977–1986.
3. Daniel, J., and Liebau, E. (2014). The ufm1 cascade. *Cells* *3*, 627–638.
4. Zhang, M., Zhu, X., Zhang, Y., Cai, Y., Chen, J., Sivaprakasam, S., Gurav, A., Pi, W., Makala, L., Wu, J., et al. (2015). RCAD/Ufl1, a Ufm1 E3 ligase, is essential for hematopoietic stem cell function and murine hematopoiesis. *Cell Death Differ.* *22*, 1922–1934.
5. Lemaire, K., Moura, R.F., Granvik, M., Igoillo-Esteve, M., Hohmeier, H.E., Hendrickx, N., Newgard, C.B., Waelkens, E., Cnop, M., and Schuit, F. (2011). Ubiquitin fold modifier 1 (UFM1) and its target UFBP1 protect pancreatic beta cells from ER stress-induced apoptosis. *PLoS ONE* *6*, e18517.
6. Wu, J., Lei, G., Mei, M., Tang, Y., and Li, H. (2010). A novel C53/LZAP-interacting protein regulates stability of C53/LZAP and DDRGK domain-containing Protein 1 (DDRGK1) and modulates NF-kappaB signaling. *J. Biol. Chem.* *285*, 15126–15136.
7. Yoo, H.M., Park, J.H., Jeon, Y.J., and Chung, C.H. (2015). Ubiquitin-fold modifier 1 acts as a positive regulator of breast cancer. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* *6*, 36.
8. Liu, H., Li, J., Tillman, B., French, B.A., and French, S.W. (2014). Ufmylation and FATylation pathways are downregulated in human alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis, and mice fed DDC, where Mallory-Denk bodies (MDBs) form. *Exp. Mol. Pathol.* *97*, 81–88.
9. Azfer, A., Niu, J., Rogers, L.M., Adamski, F.M., and Kolat-tukudy, P.E. (2006). Activation of endoplasmic reticulum stress response during the development of ischemic heart disease. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *291*, H1411–H1420.
10. Duan, R., Shi, Y., Yu, L., Zhang, G., Li, J., Lin, Y., Guo, J., Wang, J., Shen, L., Jiang, H., et al. (2016). *UBA5* mutations cause a new form of autosomal recessive cerebellar ataxia. *PLoS ONE* *11*, e0149039.
11. Tatsumi, K., Yamamoto-Mukai, H., Shimizu, R., Waguri, S., Sou, Y.-S., Sakamoto, A., Taya, C., Shitara, H., Hara, T., Chung, C.H., et al. (2011). The Ufm1-activating enzyme Uba5 is indispensable for erythroid differentiation in mice. *Nat. Commun.* *2*, 181.
12. Hertel, P., Daniel, J., Stegehake, D., Vaupel, H., Kailayangiri, S., Gruel, C., Woltersdorf, C., and Liebau, E. (2013). The



- ubiquitin-fold modifier 1 (Ufm1) cascade of *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* *288*, 10661–10671.
13. Locke, C., Berry, K., Kautu, B., Lee, K., Caldwell, K., and Caldwell, G. (2008). Paradigms for pharmacological characterization of *C. elegans* synaptic transmission mutants. *J. Vis. Exp.* *18*, e837.
  14. Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *77*, 71–94.
  15. Vashlishan, A.B., Madison, J.M., Dybbs, M., Bai, J., Sieburth, D., Ch'ng, Q., Tavazoie, M., and Kaplan, J.M. (2008). An RNAi screen identifies genes that regulate GABA synapses. *Neuron* *58*, 346–361.
  16. Martin, R.J., Robertson, A.P., Buxton, S.K., Beech, R.N., Charvet, C.L., and Neveu, C. (2012). Levamisole receptors: a second awakening. *Trends Parasitol.* *28*, 289–296.
  17. Steinlein, O.K., Mulley, J.C., Propping, P., Wallace, R.H., Phillips, H.A., Sutherland, G.R., Scheffer, I.E., and Berkovic, S.F. (1995). A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat. Genet.* *11*, 201–203.
  18. Aridon, P., Marini, C., Di Resta, C., Brilli, E., De Fusco, M., Politì, F., Parrini, E., Manfredi, I., Pisano, T., Pruna, D., et al. (2006). Increased sensitivity of the neuronal nicotinic receptor alpha 2 subunit causes familial epilepsy with nocturnal wandering and ictal fear. *Am. J. Hum. Genet.* *79*, 342–350.
  19. Dani, J.A., and Bertrand, D. (2007). Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *47*, 699–729.
  20. Hayashi, M., Nakajima, K., Miyata, R., Tanuma, N., and Kodama, T. (2012). Lesions of acetylcholine neurons in refractory epilepsy. *ISRN Neurol.* *2012*, 404263.
  21. Becchetti, A., Aracri, P., Meneghini, S., Brusco, S., and Amadeo, A. (2015). The role of nicotinic acetylcholine receptors in autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Front. Physiol.* *6*, 22.
  22. Kim, C.H., Nam, H.-S., Lee, E.H., Han, S.H., Cho, H.J., Chung, H.J., Lee, N.S., Choi, S.J., Kim, H., Ryu, J.S., et al. (2013). Overexpression of a novel regulator of p120 catenin, NLBP, promotes lung adenocarcinoma proliferation. *Cell Cycle* *12*, 2443–2453.
  23. Shiwaku, H., Yoshimura, N., Tamura, T., Sone, M., Ogishima, S., Watase, K., Tagawa, K., and Okazawa, H. (2010). Suppression of the novel ER protein Maxer by mutant ataxin-1 in Bergman glia contributes to non-cell-autonomous toxicity. *EMBO J.* *29*, 2446–2460.
  24. Cai, Y., Pi, W., Sivaprakasam, S., Zhu, X., Zhang, M., Chen, J., Makala, L., Lu, C., Wu, J., Teng, Y., et al. (2015). UFBP1, a key component of the Ufm1 conjugation system, is essential for ufmylation-mediated regulation of erythroid development. *PLoS Genet.* *11*, e1005643.
  25. Kwon, J., Cho, H.J., Han, S.H., No, J.G., Kwon, J.Y., and Kim, H. (2010). A novel LZAP-binding protein, NLBP, inhibits cell invasion. *J. Biol. Chem.* *285*, 12232–12240.
  26. Magen, D., Ofir, A., Berger, L., Goldsher, D., Eran, A., Katib, N., Nijem, Y., Vlodavsky, E., Tzur, S., Behar, D.M., et al. (2015). Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with a loss-of-function mutation in *CDKS*. *Hum. Genet.* *134*, 305–314.
  27. Risse, B., Thomas, S., Otto, N., Löpmeier, T., Valkov, D., Jiang, X., and Klämbt, C. (2013). FIM, a novel FTIR-based imaging method for high throughput locomotion analysis. *PLoS ONE* *8*, e53963.
  28. Baraban, S.C., Taylor, M.R., Castro, P.A., and Baier, H. (2005). Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience* *131*, 759–768.
  29. Stewart, A.M., Desmond, D., Kyzar, E., Gaikwad, S., Roth, A., Riehl, R., Collins, C., Monnig, L., Green, J., and Kalueff, A.V. (2012). Perspectives of zebrafish models of epilepsy: what, how and where next? *Brain Res. Bull.* *87*, 135–143.
  30. Homrich, M., Wobst, H., Laurini, C., Sabrowski, J., Schmitz, B., and Diestel, S. (2014). Cytoplasmic domain of NCAM140 interacts with ubiquitin-fold modifier-conjugating enzyme-1 (Ufc1). *Exp. Cell Res.* *324*, 192–199.
  31. Rutishauser, U. (2008). Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* *9*, 26–35.
  32. Havugimana, P.C., Hart, G.T., Nepusz, T., Yang, H., Turinsky, A.L., Li, Z., Wang, P.I., Boutz, D.R., Fong, V., Phanse, S., et al. (2012). A census of human soluble protein complexes. *Cell* *150*, 1068–1081.
  33. Homan, C.C., Kumar, R., Nguyen, L.S., Haan, E., Raymond, F.L., Abidi, F., Raynaud, M., Schwartz, C.E., Wood, S.A., Gecz, J., and Jolly, L.A. (2014). Mutations in *USP9X* are associated with X-linked intellectual disability and disrupt neuronal cell migration and growth. *Am. J. Hum. Genet.* *94*, 470–478.



**Figure 43 - Schématisation de la protéine UBA5 avec ses 3 domaines et les 12 mutations des trois publications concernant le gène UBA5.**

Les mutations non-sens sont en orange, les tronquantes en rouge, les faux-sens en bleu, et les mutations de splice en violet.

D'après le site <https://pecan.stjude.org/proteinpaint>

	Total	
	16 Individus et pourcentages	
<b>Age à la présentation</b>	<b>Naissance – 2 ans 1/2</b>	
<b>Microcéphalie</b>	<b>12/13</b>	<b>92%</b>
<b>secondaire</b>		
<b>Epilepsie</b>	<b>13/16</b>	<b>81%</b>
<b>Hypotonie axiale</b>	<b>16/16</b>	<b>100%</b>
<b>Spasticité</b>	<b>13/16</b>	<b>81%</b>
<b>Mouvements anormaux</b>	<b>13/16</b>	<b>81%</b>
<b>Troubles visuels</b>	<b>11/16</b>	<b>69%</b>
<b>Retard staturo-pondéral</b>	<b>13/16</b>	<b>81%</b>
<b>Dysmorphie</b>	<b>3/16</b>	<b>19%</b>
<b>Déficience intellectuelle</b>	<b>16/16</b>	<b>100%</b>

**Tableau 5 - Tableau récapitulatif du phénotype des individus porteurs de mutations bi-alléliques dans la littérature.**

16 patients ont été rapportés dans la littérature mais certains de leurs symptômes n'étaient pas mentionnés dans les articles. Le pourcentage est calculé à partir des cas rapportés en détail.

Table 10 plus détaillée en annexe.

### 3. Discussion

Dans cette étude, nous avons pu mettre en évidence, que des variants bi-alléliques dans le gène *UBA5* étaient responsables d'une encéphalopathie à début précoce. *UBA5* est le premier gène codant pour une protéine de la cascade d'ufmylation impliqué dans une pathologie neurologique humaine.

Notre article a été publié en « back to back » avec celui de Muona *et al.* qui rapportait des mutations dans le même gène dans des familles d'origine finlandaise (449). Plus récemment, Arnadottir *et al.* ont publié deux cas supplémentaires issus d'une même famille Islandaise (450). Au total, 16 enfants porteurs de mutations d'*UBA5* provenant de 10 familles non apparentées ont été rapportés à ce jour en relation avec 12 mutations différentes de ce gène dont quatre non-sens, une tronquante, cinq faux-sens et deux mutation d'épissage (figure 43) (449-451).

Pour les 16 enfants rapportés dans ces trois articles, le début de la maladie varie de la naissance à l'âge de deux ans et demi (table 5 et table 10 en annexe). Le phénotype neurologique semble constant et comporte une DI sévère avec une hypotonie axiale (100% des individus), une microcéphalie secondaire (92%), une spasticité et des mouvements anormaux (81%), une épilepsie (81%) avec le plus souvent des spasmes infantiles ou des myoclonies et des troubles visuels (69%). Concernant l'imagerie cérébrale, il peut exister des hypersignaux de la substance blanche ou des thalami, une atrophie cérébelleuse et/ou cérébrale, un corps calleux qui peut être fin ou des vallées sylviennes larges (figure 4 en annexe).

Concernant les mutations, nous remarquons que le variant p.Ala371Thr est très fréquent et sa fréquence allélique relativement élevée peut faire douter de son implication dans la pathologie. En effet, la fréquence allélique de ce variant est de 0.0046 dans la population finlandaise, de 0.0028 dans le reste de la population européenne et de 0.00297 dans la population française étudiée dans le cadre du projet French Exome (FREX). La prévalence calculée des individus homozygotes pour ce variant varie donc de 1/113.370 et 1/128.460 dans les populations françaises et européennes respectivement, à 1/47.260 dans la population finlandaise. Le variant p.Ala371Thr peut cependant être considéré comme un allèle hypomorphe car quatre individus homozygotes pour cet allèle ont été identifiés. Un de ces individus est finlandais, il est âgé d'une cinquantaine d'année et est exempt de tout trouble neurologique (A.-E. Lehesjoki, communication personnelle). Trois autres individus adultes homozygotes pour ce variant ont été rapportés par Arnadottir *et al.*, et aucun d'entre eux n'a de pathologie neurologique (450). Tous les individus malades porteurs de cet allèle hypomorphe ont une mutation perte de fonction sur l'allèle en trans.

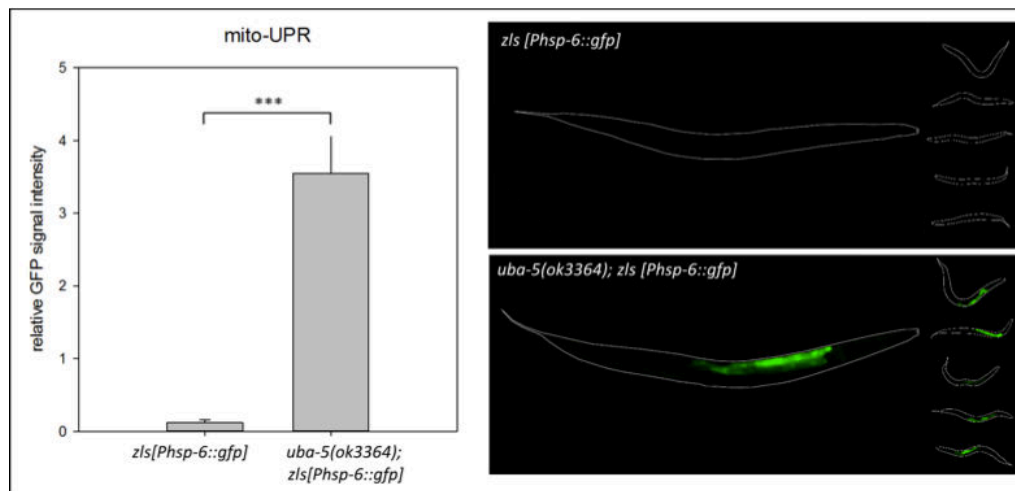


Dans notre étude, le séquençage exomique a mis en évidence sept variants différents d'*UBA5* dans les quatre familles étudiées. Par l'analyse des isoformes recombinantes de ces sept variants, nous avons montré que la sévérité clinique semblait corrélée à l'activité résiduelle de l'enzyme E1 UBA5. L'étude des fibroblastes de deux enfants atteints a permis de confirmer que le processus d'ufmylation était défectueux et qu'il en résultait un réseau du RE plus étendu. Chez *C. elegans*, il a été observé chez les souches mutantes délétées pour les gènes codant pour Uba5, Ufsp2 et pour les cibles connues de l'ufmylation Ufbp1 ou Cdkr3 : 1) une augmentation de la libération d'acétylcholine au niveau des jonctions neuromusculaires, 2) une connexion étroite entre l'ufmylation et la physiologie du RE, mais sans pointer le mécanisme d'UPR comme le principal acteur de la symptomatologie ; 3) une anomalie du système sensoriel de *C. elegans* en l'absence d'une cascade Ufm1 fonctionnelles et de ses cibles. Enfin, chez le poisson zèbre *Danio rerio*, l'haploinsuffisance d'*uba5* se traduit par un comportement analogue de l'épilepsie et des troubles de la motilité.

La sévérité du phénotype semble corrélée à l'activité résiduelle d'*UBA5*. En effet, les patients présentent tous une DI sévère mais ceux qui ont un taux résiduel plus bas présentent des signes neurologiques plus sévères, en particulier une épilepsie pharmacorésistance et une spasticité importante. Cette hypothèse est confirmée par la variabilité des phénotypes rapportés, que ce soit au niveau des modèles animaux ou chez l'homme. En effet, le modèle murin KO pour *uba5* est létal au stade embryonnaire (452,453). Dans notre article, nous rapportons une encéphalopathie sévère précoce, tandis que Duan *et al.* ont décrit en 2016 un phénotype d'ataxie cérébelleuse apparaissant pendant l'enfance (448). Enfin, l'association de deux variants hypomorphes n'entraîne aucune symptomatologie (A.-E. Lehesjoki, communication personnelle,450).

Les arguments fonctionnels en faveur de la pathogénicité des variants d'*UBA5* dans le phénotype neurologique sont tirés d'une part des résultats des études sur quatre modèles animaux différents et d'autre part des possibles interactions protéiques d'UFM1. En effet, dans notre étude, nous avons montré l'implication des mutations d'*uba5* chez *C. elegans* et chez le poisson zèbre *Danio rerio*. Muona *et al.* (449) ont utilisé un modèle murin *Ufm1<sup>ff</sup>;nestin-Cre* car, comme nous l'avons mentionné précédemment, le modèle murin *Uba5<sup>-/-</sup>* est létal, tout comme le modèle murin *Ufm1<sup>-/-</sup>*. Muona *et al.* ont montré que les souris du modèle *Ufm1<sup>ff</sup>;nestin-Cre* décèdent à un jour de vie et qu'elles présentent une micocéphalie sans anomalie de l'organisation cellulaire mais que leurs neurones ont un taux plus élevé d'apoptose. Duan *et al.* ont, quant à eux, utilisé un modèle de drosophile knock down (KD), car les drosophiles *uba5<sup>-/-</sup>* décèdent pendant la période embryonnaire. Ils ont montré que ces drosophiles présentent des défauts de locomotion, une espérance de vie plus courte et que leurs jonctions neuromusculaires sont aberrantes (448).





**Figure 44 - Activation de l'UPR mitochondrial chez *C. elegans* KO pour *uba-5*.**

*C. elegans* KO pour *uba-5(ok3364)* a été croisé avec la souche *zls [Phsp-6::gfp]*, révélant l'UPR mitochondrial. Le signal de la GFP est augmenté de façon très significative chez le mutant KO pour *uba-5(ok3364)* comparé au contrôle ( $p < 0.001$ , t-test). Images réalisées par microscopie à fluorescence (Zeiss Axiovert 200M). Quantification réalisée à l'aide du logiciel ImageJ.

*Résultats non publiés, obtenus par A Miranda-Vizueté de l'Institut de Biomédecine à Séville*

Concernant les interactions protéiques d'UFM1, il a été montré qu'UFC1 et UFM1 co-localisaient à la surface des neurones avec la protéine NCAM (454). NCAM est une protéine d'adhésion cellulaire neurale impliquée dans la croissance axonale, la différenciation neuronale et la plasticité synaptique cérébrale. De plus, il a été observé que la surexpression d'UFM1 augmente l'endocytose de NCAM. Ce processus d'endocytose doit être adapté pour que le système nerveux se développe normalement (455), or dans notre étude, nous avons montré qu'UFM1 était surexprimée dans les fibroblastes de patients. Enfin, par des études en spectrométrie de masse, des interactions protéiques ont été trouvées entre UFM1 et USP9X (456). USP9X est un composant du centrosome également impliqué dans la migration neuronale et la croissance axonale (457,458). De plus, des variants perte de fonction d'*USP9X* sont impliqués dans une DI liée à l'X (458-460).

Enfin, les résultats obtenus chez *C. elegans*, dont l'expression d'*uba5* avait été éteinte par un siRNA spécifique, montrent une activation de l'UPR mitochondrial (UPRmt) impliquant un stress mitochondrial (figure 44). Plusieurs facteurs sont connus pour déclencher l'UPRmt, tels que les dommages de l'ADN mitochondrial et la production excessive de ROS (Reactive Oxygen Species), qui déclenchent la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ , des déplétions en ADNmt ou encore des défauts de la chaîne respiratoire mitochondriale (461,462). Il a été montré que l'UPRmt interagissait avec l'UPR du réticulum endoplasmique chez *C. elegans*, notamment par la phosphorylation de la protéine eIF2 $\alpha$  (461). Uba5 est localisé dans le réticulum endoplasmique chez *C. elegans* et les mammifères mais au niveau de la mitochondrie chez *Leishmania donovani* (432). Il a été montré qu'un défaut d'ufmylation entraîne une survie réduite de *Leishmania* dans les macrophages et que la délétion d'*ufm1* entraîne une perte de la  $\beta$ -oxydation des acides gras et bloque la division cellulaire à l'étape de l'amastigote qui est le premier stade du développement du protozoaire (437,463). La mitochondrie joue un rôle essentiel dans le métabolisme énergétique cellulaire par la production d'ATP. Elle présente une double membrane : une membrane interne contenant la chaîne respiratoire, composée de cinq complexes protéiques et siège de la phosphorylation oxydative générant l'ATP, et une membrane externe, qui constitue une barrière semi-perméable aux ions et aux petites molécules, ce qui fait que l'espace inter-membranaire a une composition proche de celle du cytoplasme. Les dysfonctions de la chaîne respiratoire mitochondriale sont responsables de nombreuses maladies génétiques, dont certaines se manifestent par des encéphalopathies épileptiques sévères de début précoce (464). Nous avons donc émis l'hypothèse que la mitochondrie pourrait être un des acteurs clé de la physiopathologie de la maladie causée par les mutations d'*UBA5*. Afin d'évaluer l'implication de la mitochondrie sur les symptômes présentés par les enfants porteurs de mutations d'*UBA5*, des premières analyses vont être faites à partir des fibroblastes de patients concernant les principales fonctions mitochondriales telles que



l'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire, la respiration, la dynamique mitochondriale, la production de ROS et la quantité d'ADNmt. Puis nous essaierons d'obtenir des lignées cellulaires (HeLa et HCT116) KO par la technique CRISPR/Cas9 et nous réaliserons les mêmes tests des fonctions mitochondriales, en condition stationnaire et en condition de stress cellulaire.



## DICUSSION GENERALE

L'utilisation du séquençage exomique seul ou associé à l'homozygosity mapping a permis d'identifier deux nouveaux gènes, *WDR73* et *UBA5*, impliqués dans une DI sévère syndromique avec deux fonctions distinctes : 1) dans la neurogénèse et le réseau des microtubules pour *WDR73*, 2) dans un processus de modification post-traductionnelle des protéines cibles qui pourraient être impliquées dans la neurogénèse mais également dans les phénomènes de plasticité synaptique pour *UBA5*.

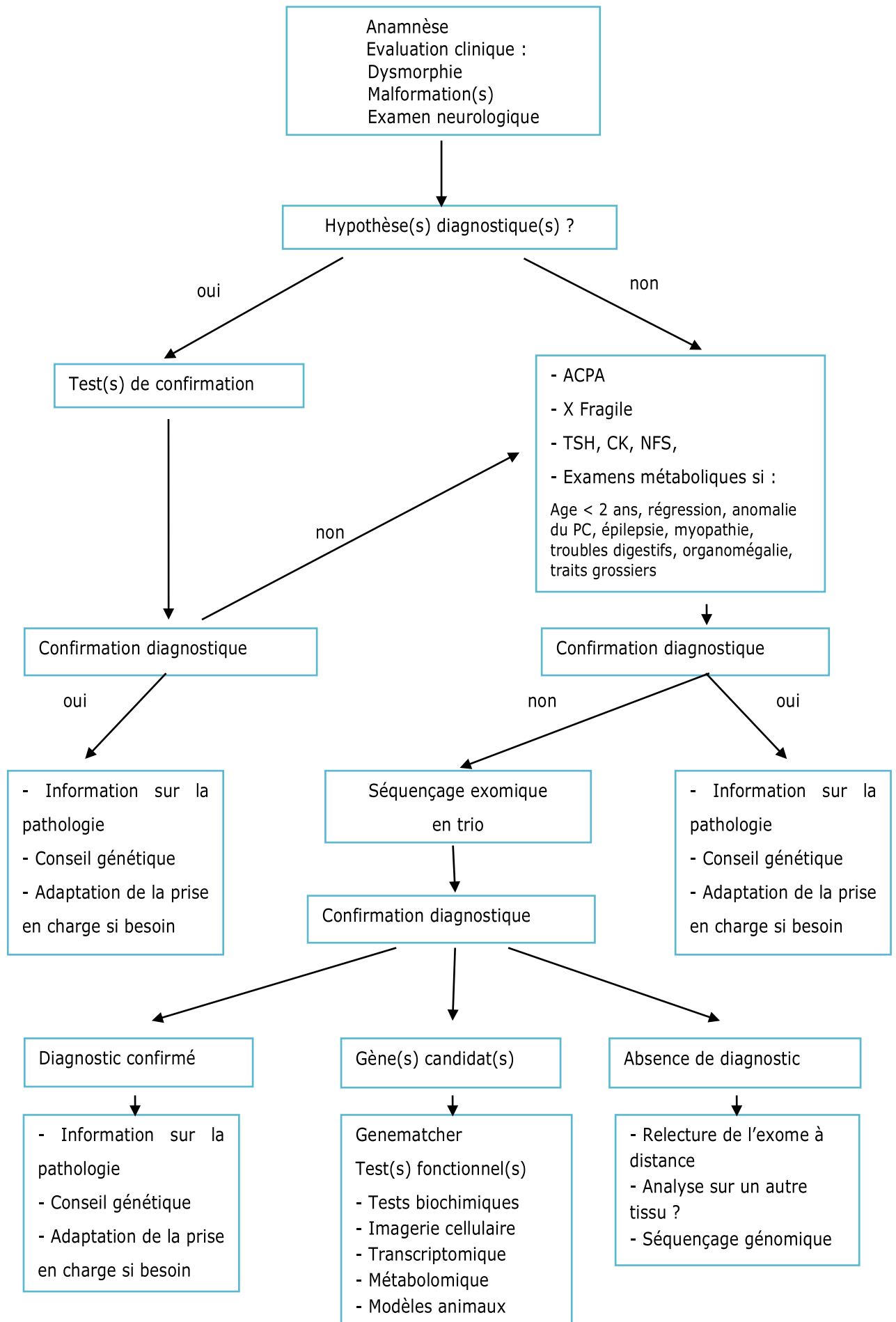
La DI recouvre un ensemble hétérogène de pathologies syndromiques et non syndromiques le plus souvent causées, surtout pour les formes sévères, par des anomalies génétiques (17,47). Cependant, malgré l'utilisation des méthodes actuelles de diagnostic moléculaire, l'étiologie de la DI reste encore indéterminée dans environ la moitié des cas (36,37).

Les avancées technologiques récentes ont permis néanmoins d'améliorer de façon spectaculaire le rendement diagnostique. Ce dernier était d'environ 10% dans les années 1990, il a atteint presque 65% en 2015 (figure 3). L'introduction des analyses chromosomiques sur puce à ADN mais surtout l'avènement des nouvelles méthodes de séquençage à haut débit de l'ADN utilisant des panels ciblés de gènes, le séquençage exomique et le séquençage génomique a permis une accélération exponentielle de la découverte de nouveaux gènes, en particulier pour les DI de transmission autosomique récessive et celles dues à des mutations *de novo* (17). Le nombre de gènes impliqués dans les DI syndromiques ou isolées s'élevait à plus de 700 en 2016, alors que Musante et Ropers avaient estimé en 2014 que le nombre de gènes de DI autosomiques devait se situer autour de 2500 (17,81).

Il apparaît que les techniques de séquençage exomique et génomique sont les plus performantes non seulement pour l'optimisation du diagnostic mais également pour la réalisation d'économies de santé (465-468). En effet, les coûts liés aux multiples examens complémentaires métaboliques et / ou génétiques prescrits à visée diagnostique sont très importants. Leur nombre et le délai d'attente des résultats donnent l'impression aux familles de vivre une véritable « odysée diagnostique ». Toutes ces raisons font discuter à l'heure actuelle la réalisation du séquençage exomique en première intention (469-471). Un diagnostic plus précoce va, en effet, permettre non seulement de confirmer le diagnostic posé cliniquement, mais également d'adapter le suivi clinique voire la thérapeutique.

Un autre avantage du séquençage à haut débit est de mettre en évidence des variants responsables de phénotypes plus subtils ou atypiques ainsi que des allèles hypomorphes ou moins pénétrants. En d'autres termes, il est possible de découvrir des variants associés à des phénotypes nouveaux pour des gènes connus comme étant

**Figure 45 – Arbre décisionnel devant une déficience intellectuelle utilisé par le service de génétique du CHU d’Angers.**



responsables de maladies mendéliennes bien repertoriées (162). En contrepartie, cela génère très souvent de grandes difficultés pour l'interprétation de la pathogénicité de ces variants, en particulier pour les variants hypomorphes, comme cela est illustré dans notre travail pour le variant p.Ala371Thr du gène *UBA5*.

Pour notre pratique quotidienne de la génétique médicale nous utilisons actuellement l'arbre décisionnel présenté sur la figure 45. En l'absence d'orientation spécifique, les examens moléculaires de première intention sont l'ACPA et la recherche du syndrome d'X Fragile. Si ce bilan initial est négatif, nous proposons de réaliser un séquençage exomique en trio. Si aucun diagnostic n'a pu être porté par l'exome en première lecture, nous faisons une relecture à neuf - douze mois de distance. Nous n'avons pas encore recours au séquençage génomique en dehors des programmes de recherche.

Comme indiqué précédemment, l'interprétation fonctionnelle des variants ou la validation de nouveaux gènes est souvent problématique. La démarche de validation d'un nouveau gène comporte deux étapes comme nous l'avons illustré dans notre travail sur *WDR73* et *UBA5*: la répllication et les tests fonctionnels.

#### 1) la répllication

Pour *WDR73*, nous avons pris directement contact avec l'unité de recherche de référence en Europe sur les pathologies rénales génétiques. Pour *UBA5*, nous avons été mis en contact avec les médecins prenant en charge d'autres enfants porteurs de mutations dans ce gène par l'intermédiaire des familles elles-mêmes. L'une d'entre elle avait contacté de sa propre initiative le laboratoire d'Eva Liebau travaillant sur le *C. elegans* ; une autre a été contactée via son propre site Facebook.

Il existe maintenant d'autres possibilités pour faciliter la répllication telles que celles offertes par la base de données GeneMatcher (<https://genematcher.org>) qui permet de mettre en contact des équipes médicales ayant observé des variants dans le même gène avec des phénotypes compatibles (472,473).

#### 2) les tests fonctionnels

Ils permettent de déterminer les conséquences pathologiques des variants du gène candidat et parfois d'améliorer les connaissances sur la physiopathologie de la maladie. Ils nécessitent très souvent d'établir des collaborations avec des unités de recherches très spécialisées et disposant d'un modèle cellulaire spécifique (lignées de cellules podocytaires rénales pour *WDR73*) ou d'un modèle animal (*C. elegans* ou poisson zèbre pour *UBA5*).





## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Grâce à l'ACPA et au séquençage à haut débit de l'ADN nous avons pu identifier deux nouveaux gènes, *WDR73* et *UBA5*, impliqués tous les deux dans des formes sévères de DI syndromiques. Actuellement, l'étude fonctionnelle de *WDR73* se poursuit dans l'Unité de recherche du Pr Corinne Antignac. Concernant *UBA5*, une recherche est menée dans notre laboratoire pour déterminer si la mitochondrie est impliquée ou non dans la physiopathologie de cette encéphalopathie.

D'une façon plus générale, l'ACPA et le séquençage à haut débit permettent d'éviter l'errance diagnostique pour les personnes avec DI et leurs familles et représentent un gain de temps et d'argent. Ces nouvelles technologies permettent également, comme nous l'avons illustré dans ce travail, d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la DI. Cependant, comme toutes techniques innovantes, elles ont leurs revers dont le principal est, dans le cas présent, la validation fonctionnelle des variants identifiés.

Nous sommes souvent confrontés à cette difficulté au sein du service de génétique où nous réalisons des séquençages exomiques à visée diagnostique. La découverte de nouveaux variants dans des gènes connus ou l'identification de nouveaux gènes impliquent souvent d'établir des contacts soit avec des laboratoires de diagnostic de référence soit avec des unités de recherche plus fondamentales en France ou à l'étranger. Cette problématique est bien illustrée par les collaborations que nous avons nouées pour mener à bien le travail sur *WDR73* et *UBA5*.

Cependant, malgré tous nos efforts, il reste des cas où aucune anomalie génétique n'est mise en évidence. Cette situation est illustrée par les résultats du projet HUGODIMS que nous avons mené avec les centres de génétique des CHU du Grand-Ouest (HUGO). Dans ce projet, 69 enfants atteints de DI et très soigneusement sélectionnés ont bénéficié d'un séquençage de l'exome en trio avec leurs deux parents. La cause génétique de la DI a pu être déterminée ou fortement suspectée pour 48 d'entre eux (69,5%) permettant l'identification de 7 nouveaux gènes. Pour 10 cas sans diagnostic à l'issue de cette étude, nous avons réalisé le séquençage du génome complet également en trio. Cette démarche a permis d'identifier la cause de la DI pour 4 cas supplémentaires mais a laissé 6 enfants sans diagnostic. Pour tenter de pallier à ceci, nous avons obtenu un financement pour faire la preuve de concept qu'une approche innovante combinant des analyses transcriptomiques, métabolomiques et morphologiques réalisées sur des progéniteurs neuronaux dérivés de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) des enfants sans diagnostic, pourrait permettre d'améliorer l'efficacité du diagnostic et la compréhension de la DI. Il s'agit du projet MIDRID (Multi-



Omics and iPSCs to Improve the Diagnosis of Rare Intellectual Disabilities) qui fera l'objet de notre travail dans les suites de cette thèse en collaboration avec les centres de génétique des CHU du Grand-Ouest (HUGO).



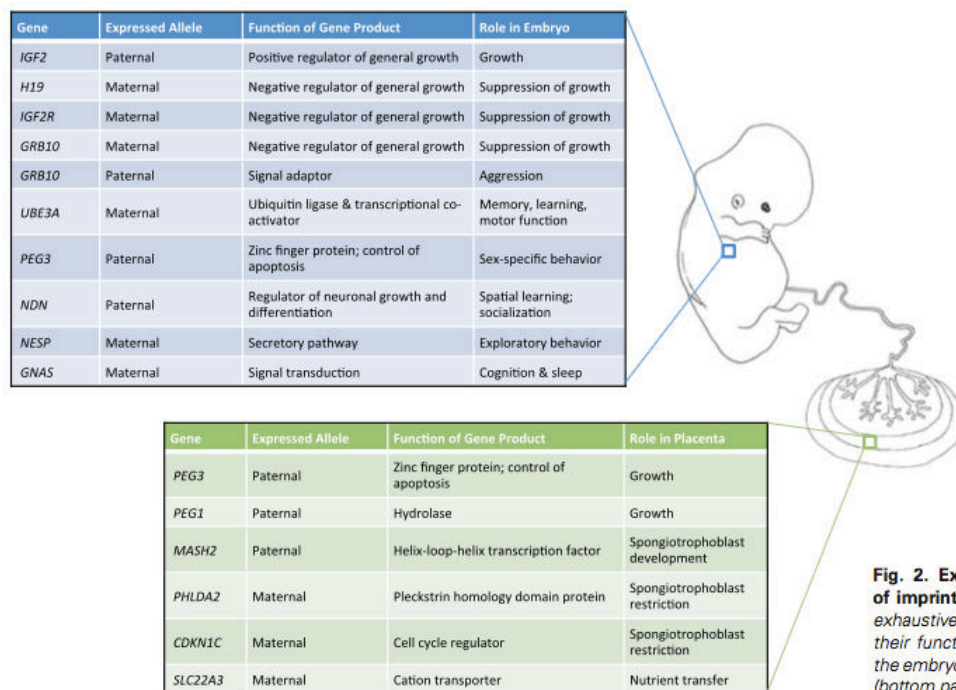
# ANNEXES

## 1. Figures et tables

Disorder	chromosome(s)	prevalence	OMIM	% genetic error (SNV/CNV)	% chromosomal error (UPD)	% imprinting error (% MLID)	references
Angelman Syndrome (AS)	15q11.2	1:15000	#105830	70% CNV (del15mat) 15% SNV ( <i>UBE3A</i> )	<5% (upd15pat)	<5% (rare)	Buiting, 2010
Prader-Willi syndrome (PWS)	15q11.2	1:15000	#176270	70% CNV (del15pat)	<30% (upd15mat)	<1% (nk)	Buiting, 2010
Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS)	11p15.5	1:10500	#130650	5% SNV ( <i>CDKN1C</i> ) <5% CNV and SNV of H19/IGF2 IG-DMR	20%	10% H19/IGF2 IG-DMR hypermethylation (rare) 60% KCNQ1OT1 TSS-DMR hypomethylation (30%)	Choufani et al., 2010
Silver-Russell syndrome (SRS)	11p15.5, chr7	1:50000?	#180860	<1%	10% (upd7mat) <1% (upd11mat) 5% (upd20mat)	40% (15–38%)	Eggermann 2010, wakeling et al., 2016
Pseudohypoparathyroidism type 1b (PHP1b)	20q13.3	nk	#603233	27% CNV (delSTX16mat) 3% SNV ( <i>GNAS</i> )	5% (upd20mat)	61% (rare)	Mantovani et al., 2016; Elli et al., 2016
Transient neonatal diabetes mellitus type 1 (TNDM)	6q24	1:300000	#601410	40% CNV (dup6pat)	40% (upd6pat)	20% (50%)	Mackay and Temple, 2010
Kagami-Ogata syndrome (KOS)	14q32	nk	#608140	15% CNV (del14mat)	65% (upd14pat)	20% (nk)	Ogata and Kagami, 2016; Ioannides et al., 2014;
Temple syndrome (TS14)	14q32	nk	#616222	10% CNV (del14pat)	78% (upd14mat)	12% (rare)	Kagami et al., 2017
Mulchandani-Bhoj-Conlin syndrome (MBCS)	chr20	nk	#617352	nk	100% (upd20mat)	nk (nk)	Mulchandani et al., 2015
Schaaf-Yang syndrome (SHFYNG)	chr15	nk	#615547	100% inactivation of <i>MAGEL2</i> (SNV/CNV)	–	–	Fountain et al., 2017
Central precocious puberty 2 (CPPB2)	chr15	nk	#615436	100% inactivation of <i>MKRN3</i> (SNV)	–	–	Abreu et al., 2013

**Tableau 1 – Pathologies dues à une anomalie de l’empreinte génomique parentale.**

*D’après DJG Mackay et IK Temple. European Journal of Medical Genetics. 2017 (474)*



**Fig. 2. Examples of the functions of imprinted genes.** Shown is a non-exhaustive list of imprinted genes and their functions during development in the embryo (top panel) and the placenta (bottom panel).

**Figure 1 - Exemples de fonctions des gènes soumis à empreinte.**

Liste non exhaustive des gènes soumis à empreinte et de leurs fonctions lors du développement dans l'embryon (tableau supérieur) et le placenta (tableau inférieur).

*D’après J.M. Kalish et al. Int. J. Dev. Biol. 2014 (475)*



Gene (MIM#)	Disease	Chromosomal location	Mutation (HGVS Nomenclature)	Mutation (traditional name)	Consequences for mRNA splicing	Reference
<i>ATM</i> (607585)	Ataxia telangiectasia	11q22-q23	NM_000051.3:c.3994-159A>G	IVS28-159A>G	Weakens 5' splice site of alternative exon 28a and activates 5' cryptic splice site 83 nt downstream	Coutinho et al. [2005]
<i>CDKN2A</i> (600160)	Melanoma, predisposition	9p21	NM_000077.3:c.458-105A>G	IVS2-105A>G	Activates cryptic splice site 105 nt 5' to exon 3 resulting in aberrant splicing	Harland et al. [2001]
<i>DMD</i> (300377)	Dystrophinopathy, asymptomatic	Xp21.2	NM_004006.2:c.93+5591T>A	IVS2+5591T>A	Activates two 5' cryptic splice sites 132 nt or 46 nt downstream	Yagi et al. [2003]
<i>FGB</i> (134830)	Alfibrinogenemia	4q28	NM_005141.3:c.115-600A>G	IVS1-600A>G	Creates consensus sequence for splicing factor SF2/ASF leading to inclusion of cryptic exon	Dear et al. [2006]
<i>FGG</i> (134850)	Alfibrinogenemia	4q28	NM_000509.4:c.667-320A>T	IVS6-320A>T	Activates cryptic splice leading to inclusion of cryptic exon carrying a premature Stop codon	Spena et al. [2007]
<i>HADHB</i> (143450)	Mitochondrial trifunctionalprotein deficiency	2p23	NM_000183.2:c.442+614A>G	IVS7+614A>G	Activates cryptic splice leading to inclusion of two cryptic exons	Puresuren et al. [2008]
<i>MTRR</i> (602568)	Homocystinuria	5p15.31	NM_002454.2:c.903+469T>C	IVS6+469T>C	Creates an SF2/ASF-binding exon splice enhancer which leads to pseudoxon activation	Homolova et al. [2010]
<i>MUT</i> (609058)	Methylmalonic aciduria	6p12.3	NM_000255.2:c.1957-892C>A	IVS11-892C>A	Activates cryptic splice site leading to the inclusion of pseudoxon	Rincón et al. [2007]
<i>NFI</i> (162200)	Neurofibromatosis type 1	17q11.2	NM_000267.3:c.288+2025T>G	IVS3+2025T>G	Activates cryptic splice site leading to inclusion of a cryptic exon	Pros et al. [2008]
<i>OTC</i> (300461)	Ornithine transcarbamylase deficiency	Xp21.1	NM_000531.5:c.540+265G>A	IVS5+265G>A	Activates cryptic splice site leading to inclusion of cryptic exon	Ogino et al. [2007]
<i>PCCA</i> (232000)	Propionic acidemia	13q32	NM_000282.2:c.1285-1416A>G	IVS14-1416A>G	Activates cryptic splice site leading to the inclusion of pseudoxon	Rincón et al. [2007]
<i>PCCB</i> (232050)	Propionic acidemia	3q21-q22	NM_000532.3:c.654+462A>G	IVS6+462A>G	Activates cryptic splice site leading to the inclusion of pseudoxon	Rincón et al. [2007]
<i>PMM2</i> (601785)	Congenital disorder of glycosylation type Ia	16p13	NM_000303.2:c.640-15479C>T	IVS7-15479C>T	Activates cryptic splice site leading to the inclusion of pseudoxons	Scholten et al. [2007]
<i>PRPF31</i> (606419)	Retinitis pigmentosa, autosomal dominant	19q13.4	NM_015629.3:c.1374+654C>G	IVS13+654C>G	Activates cryptic splice site leading to the inclusion of pseudoxons	Rio Frio et al. [2009]
<i>RB1</i> (180200)	Retinoblastoma	13q14.2	NM_000321.2:c.2490-1398A>G	IVS23-1398A>G	Activates cryptic splice site leading to inclusion of cryptic exon	Dehainault et al. [2007]
<i>SLC12A3</i> (600968)	Gitelman syndrome	16q13	NM_000339.2:c.1670-191C>T	IVS13-191C>T	Activates cryptic splice site leading to inclusion of cryptic exon	Noru et al. [2009]

IVS, intron number.

<sup>a</sup>Located within an intron at least 100 bp from the nearest splice site.

## Tableau 2 - Exemples de mutations introniques profondes identifiées comme étant responsables de pathologies.

*D'après DN Cooper et al. Hum Mutat 2010*

Gene (MIM#)	Disease	Chromosomal location	Mutation (chromosomal coordinate) <sup>c</sup>	Mutation (relative location) <sup>a</sup>	Reference
<i>SOX9</i> (608160)	Cleft palate, Pierre Robin sequence	17q24.3-q25.1	Chr17:66187898T>C	-1440858T>C	Benko et al. [2009]
<i>SHH</i> (600725)	Triphalangeal thumb-polysyndactyly syndrome	7q36.3	Chr7:156277624C>T	-979896C>T	Wang et al. [2007]
<i>SHH</i> (600725)	Preaxial polydactyly	7q36.3	Chr7:156277226C>G	-979498C>G	Lettice et al. [2003]
<i>SHH</i> (600725)	Triphalangeal thumb	7q36.3	Chr7:156277036T>C	-979308T>C	Furniss et al. [2008]
<i>SHH</i> (600725)	Preaxial polydactyly	7q36.3	Chr7:156277026A>T	-979298A>T	Lettice et al. [2003]
<i>SHH</i> (600725)	Preaxial polydactyly	7q36.3	Chr7:156277002T>C	-979274T>C	Lettice et al. [2003]
<i>SHH</i> (600725)	Preaxial polydactyly	7q36.3	Chr7:156276927G>A	-979199G>A	Lettice et al. [2003]
<i>SHH</i> (600725)	Werner mesomelic syndrome	7q36.3	Chr7:156276927G>C	-979199G>C	Wieczorek et al. [2010]
<i>SHH</i> (600725)	Triphalangeal thumb-polysyndactyly syndrome	7q36.3	Chr7:156276710C>G	-978982C>G	Gurnett et al. [2007]
<i>SHH</i> (600725)	Triphalangeal thumb-polysyndactyly syndrome	7q36.3	Chr7:156276592A>G	-978864A>G	Gurnett et al. [2007]
<i>POU6F2</i> (609062)	Wilms' tumour	7p14.1	Chr7:38984140C>G	-28793C>G	Perotti et al. [2004]
<i>EPHX1</i> (132810)	Hypercholanemia	1q42.12	Chr1:224075359T>A	-4240T>A <sup>b</sup>	Zhu et al. [2003]
<i>PSEN1</i> (104311)	Alzheimer disease, early onset	14q24.2	Chr14:72670114A>G	-2818A>G	Theuns et al. [2000]

<sup>a</sup>Location given is relative to the transcriptional initiation site of the specified gene. Only mutations >2 kb 5' to the transcriptional initiation site of the associated gene are listed.

<sup>b</sup>Mutation is located in a recognition site for hepatocyte nuclear factor 3 (HNF-3).

<sup>c</sup>Chromosomal coordinates were obtained from NCBI build 36.3.

## Tableau 3 - Exemples de mutations des régions régulatrices identifiées comme étant responsables de pathologies.

*D'après DN Cooper et al. Hum Mutat 2010*





Gene(MIM#)	Disease	Chromosomal location	Genomic rearrangement	Location (5' or 3') relative to gene	Reference
<i>BMP2</i> (112261)	Autosomal dominant brachydactyly type A2	20p12.3	Duplication (5.5 kb)	~110 kb 3' to gene	Dathe et al. [2009]
<i>DLX5</i> (600030)	Hearing loss and craniofacial defects	7q21.3	Inversion breakpoint	~65 kb 5' to gene	Brown et al. [2010]
<i>FOXC2</i> (602402)	Lymphedema-distichiasis syndrome	16q24.1	Translocation breakpoint	120 kb 3' to gene	Fang et al. [2000]
<i>FOXF1</i> (601089)	Alveolar capillary dysplasia	16q24.1	Deletions (524 kb, 145 kb)	52 kb and 259 kb 5' to gene	Stankiewicz et al. [2009]
<i>FOXL2</i> (605597)	Blepharophimosis syndrome	3q22.3	Deletion (7.4 kb)	283 kb 5' to gene	D'haene et al. [2009]
<i>GJB2</i> (121011)	Nonsyndromic sensorineural hearing loss	13q12.11	Deletion (131.4 kb)	> 100 kb 5' to gene	Wikh et al. [2010]
<i>HBA2</i> (141850)	$\alpha$ -thalassaemia	16p13.3	Deletions, various	> 20 kb 5' to gene	Hatton et al. [1990] Romao et al. [1991] Viprasit et al. [2003]
<i>HBB</i> (141900)	$\beta$ -thalassaemia	11p15.5	Deletions, various	> 50 kb 5' to gene	Driscoll et al. [1989] Harteveid et al. [2005] Koenig et al. [2009]
<i>PAX6</i> (607108)	Aniridia	11p13	Deletions (975 kb, 1105 kb)	11.6 kb and 22.1 kb 3' to gene	Lauderdale et al. [2000]
<i>PTX2</i> (601542)	Rieger syndrome	4q25	Translocation breakpoint	~90 kb 5' to gene	Flomen et al. [1998]
<i>FOU3F4</i> (300039)	X-linked deafness type 3 (DFN3)	Xq21.1	Deletions, various	~900 kb 5' to gene	de Kok et al. [1996]
<i>SHH</i> (600725)	Preaxial polydactyly	7q36	De novo reciprocal t(5;7)(q11;q36) translocation breakpoint	~1 Mb 5' to gene	Leticie et al. [2002]
<i>SOX9</i> (608160)	Acapomelic campomelic dysplasia	17q24.3	Deletion (960 kb) De novo balanced complex chromosomal rearrangement with a 17q breakpoint. Balanced translocation, t(4;17)(q28.3;q24.3) breakpoint	1.477 Mb and 517 kb 5' to gene ~1.3 Mb 3' to gene ~900 kb 5' to gene	Leccointre et al. [2009]
<i>SHOX</i> (312865)	Leri-Weill dyschondrosteosis	Xp22.33	Deletions, various	30-250 kb 3' to gene	Velagaleti et al. [2005]
<i>TRPS1</i> (604386)	Ambras syndrome	8q23.3	Inversion breakpoint	7.3 Mb 3' to gene	Benito-Sanz et al. [2005]
<i>TWIST</i> (601622)	Saethre-Chotzen syndrome	7p21.1	Inversion and translocation breakpoints	> 260 kb 3' to gene	Fantuzzo et al. [2008] Cai et al. [2003]

**Tableau 4 – Exemples de délétions ou autres réarrangements localisés à distance des gènes dont ils altèrent la fonction et identifiées comme étant la cause de pathologies.**

*D'après DN Cooper et al. Hum Mutat 2010*

Gene (MIM#)	Disease/disease association	Chromosomal location	Mutation <sup>c</sup>	Nature and relative location of mutation <sup>a</sup>	Reference
<i>MIR16-1</i> (609704)	Chronic lymphocytic leukemia, association with	13q14.3	NR_029486.1:r.89+7C>T	+96C>T <sup>b</sup>	Calin et al. [2005]
<i>MIR17</i> (609416)	Breast cancer, association with	13q31.3	NR_029487.1:r.84+9C>T	+93C>T	Shen et al. [2009]
<i>MIR30C1</i>	Breast cancer, association with	1p34.2	NR_029833.1:r.48C>T	+48C>T	Shen et al. [2009]
<i>MIR96</i> (611606)	Hearing loss, progressive	7q32.2	NR_029512.1:r.13G>A	+13G>A	Mencia et al. [2009]
<i>MIR96</i> (611606)	Hearing loss, progressive	7q32.2	NR_029512.1:r.14C>A	+14C>A	Mencia et al. [2009]
<i>MIR125A</i> (611191)	Breast cancer, association with	19q13.33	NR_029693.1:r.22G>T	+22G>T <sup>b</sup>	Li et al. [2009c]
<i>MIR146A</i> (610566)	Papillary thyroid carcinoma, association with	5q33.3	NR_029701.1:r.60G>C	+60G>C <sup>b</sup>	Jazdzewski et al. [2008]
<i>MIR191</i>	Ovarian cancer, predisposition to	3p21.31	NR_029690.1:r.15G>C	+15G>C	Shen et al. [2010]
<i>MIR196A2</i> (609687)	Nonsmall-cell lung cancer survival, associated with	12q13.13	NR_029617.1:r.78C>T	+78C>T <sup>b</sup>	Hu et al. [2008]
<i>MIR206</i> (611599)	Cancers, reduced expression in association with	6p12.2	NR_029713.1:r.86+35C>T	+121C>T	Wu et al. [2008]
<i>MIR499</i>	Breast cancer, increased risk, association with	20q11.22	NR_030223.1:r.73A>G	+73A>G <sup>b</sup>	Hu et al. [2009]
<i>MIR502</i>	Schizophrenia, association with	Xp11.23	NR_030226.1:r.13C>T	+13C>T <sup>b</sup>	Sun et al. [2009]
<i>MIR510</i>	Schizophrenia, association with	Xp27.3	NR_030237.1:r.48T>C	+48T>C <sup>b</sup>	Sun et al. [2009]
<i>Mir2861</i>	Osteoporosis, primary	2	N/A	+33C>G	Li et al. [2009d]
<i>MIRLET7E</i> (611250)	Cancers, reduced expression in association with	19q13.41	NR_029482.1:r.79+19G>A	+98G>A	Wu et al. [2008]
<i>SNORD50A</i> (613117)	Breast and prostate cancer, association with	6q14.3	NR.002743.2:r.54_55delTT	$\Delta$ TT	Dong et al. [2008]
<i>SNORD116@ gene cluster</i> (605436)	Prader-Willi syndrome	15q11.2	–	Gross deletion	Sahoo et al. [2008]

N/A, no reference sequence available.

<sup>a</sup>Location given is relative to the transcriptional initiation site of the specified gene.

<sup>b</sup>Disease-associated polymorphism.

<sup>c</sup>HGVSNomenclature was adapted for use with microRNA genes.

**Tableau 5 – Anomalies dans les micro-ARNs et sn-ARNs identifiées comme étant responsables pathologies.**

*D'après DN Cooper et al. Hum Mutat 2010*



**TABLE I. Centrosome and Spindle Microtubule Defects Underlying Severe Congenital Microcephaly**

Gene	Protein	OMIM	Clinical presentation	Localization and function
<i>MCPH1</i>	Microcephalin	251200	PM. Cells exhibit premature chromosome condensation	Centrosome-role in DNA repair and G2-M dynamics
<i>WDR62</i> ( <i>MCPH2</i> )	WD-repeat containing protein 62	604317	PM	Mitotic spindle pole formation-scaffold for JNK pathway
<i>CDK5RAP2/CEP215</i> ( <i>MCPH3</i> )	Cyclin dependent kinase 5 regulatory subunit-associated protein 2	604804	PM	Centrosome, spindle and microtubule organizing function.
<i>CASC5</i> ( <i>MCPH4</i> )	Cancer susceptibility candidate 5	604321	PM	Kinetochore [KNM] component-spindle-assembly checkpoint
<i>ASPM</i> ( <i>MCPH5</i> )	Abnormal spindle-like, microcephaly associated	608716	PM	Microtubule associated protein-spindle organization and orientation
<i>CENPJ/CPAP</i> ( <i>MCPH6</i> )	Centromeric protein J	608393	PM-MPD-Seckel syndrome	Centriole biogenesis-cilia formation
<i>STIL</i> ( <i>MCPH7</i> )	SCL/TAL1 interrupting locus	613676		
<i>CEP135</i> ( <i>MCPH8</i> )	Centrosomal protein 135 kDa	612703	PM	Centrosome-centriole biogenesis
<i>CEP152</i> ( <i>MCPH9</i> )	Centrosomal protein of 152 kDa	614673	PM	Centrosome-centriole biogenesis and genome stability
<i>CEP63</i>	Centrosomal protein of 63 kDa	614852	PM-MPD-Seckel syndrome	Centrosome-centriole biogenesis
<i>NDE1</i>	Nuclear distribution protein nudE homolog 1	613823	Microcephaly with growth retardation-Seckel syndrome [mild]	Centrosome-centriole biogenesis
<i>NIN</i>	Ninein	614019	Microcephaly with growth retardation-microhydranencephaly	Centrosome-mitotic spindle
<i>PCNT</i>	Pericentrin	614851	MPD-Seckel syndrome	Centrosome function-microtubule organization
<i>BUB1B</i>	BUB1 Mitotic Checkpoint Serine/Threonine Kinase B1 (BUBR1)	210720	Microcephalic Osteodysplastic Primordial Dwarfism (MOPD) II	Component of pericentriolar material-scaffold for signaling molecules?
<i>CENPE</i>	Centromere protein E (CENP-E)	257300	Growth retardation-microcephaly-cancer-Mosaic Variegated Aneuploidy [MVA]	Kinetochore kinase-role in spindle checkpoint
<i>KIF5C</i>	Kinesin family member 5C	117143 <sup>a</sup>	MPD	Microtubule capture and stabilization
<i>KIF2A</i>	Kinesin family member 2A	615282	Microcephaly and cortical malformations	Microtubule motor protein
<i>KIF11</i>	Kinesin family member 11	615411	Severe microcephaly-cortical malformations-early-onset epilepsy	Microtubule motor protein
<i>TUBG1</i>	Tubulin-gamma complex associated protein 1	152950	Microcephaly with or without chorioretinopathy, lymphoedema and mental retardation	Microtubule motor protein-role in microtubule crosslinking and bipolar spindle formation
<i>TUBB2B</i>	Tubulin, beta 2B class IIb	615412	complex cortical malformations-microcephaly (not all reported cases)	Structural component of the centrosome-role in microtubule nucleation
<i>TUBA1A</i>	Tubulin, alpha 1A	610031	Microcephaly-spastic tetraparesis-severe intellectual disability-scoliosis	Microtubule component-binds to GTP
<i>POC1A</i>	Proteome of the centriole 1A	611603	Microcephaly-severe intellectual disability	Microtubule component
		614783	MPD	Centriolar protein required for cilia formation

PM, primary microcephaly; MPD, microcephalic primordial dwarfism.

<sup>a</sup>Denotes the gene entry in OMIM.

**Tableau 6 - Les défauts des microtubules du centrosome et du fuseau responsables de microcéphalies congénitales sévères.**

*D'après D Alcantara et M O'Driscoll. Am J Med Genet C Semin Med Genet.2014*





**TABLE III. Defects in DNA Damage Response and DNA Repair Proteins Associated With Congenital Microcephaly**

Gene	Protein	OMIM	Clinical presentation	Localization & function
<i>ATR</i>	Ataxia telangiectasia and rad3-related	210600	MPD-Seckel syndrome	Protein kinase-apical DDR regulator-cell cycle checkpoint activation-role in DNA replication
<i>ATRIP</i>	ATR-interacting protein	606605 <sup>a</sup>	MPD-Seckel syndrome	Essential ATR partner-binds to RPA-coated ssDNA-DDR-role in DNA replication
<i>RBBP8/CTIP</i>	Retinoblastoma-binding protein 8/CTBP-interacting protein (CtIP)	606744	MPD-Seckel syndrome	DNA DSB resection-role in ATR recruitment to DSBs-associates with BRCA1 in regulation of cell cycle checkpoints
<i>NBS1/NBN</i>	Nijmegen breakage syndrome 1 /nibrin	251260	Nijmegen breakage syndrome (NBS): microcephaly-immunodeficiency-cancer predisposition	Component of M-R-N complex with central role in DNA DSB repair
<i>RAD50</i>	DNA repair protein RAD50	613078	NBS-like disorder: microcephaly-intellectual disability-"bird-like" face-short stature	Component of M-R-N complex with central role in DNA DSB repair
<i>MRE11A</i>	Double-strand break repair protein MRE11A	600814 <sup>a</sup>	NBS-like severe microcephaly	Component of M-R-N complex with central role in DNA DSB repair
<i>PNKP</i>	Bifunctional polynucleotide phosphatase and kinase	613402	Microcephaly-seizures-developmental delay	Role in DNA repair pathways (NHEJ, BER)
<i>CDK6</i>	Cyclin-dependent kinase 6	603368 <sup>a</sup>	PM	Control of cell cycle and differentiation-centrosomal association in mitosis
<i>BRCA1</i>	Breast cancer type 1 susceptibility protein	113705 <sup>a</sup>	Microcephaly-short stature-developmental delay-cancer predisposition	DNA repair-cell cycle checkpoint control-maintenance of genomic stability (HRR)
<i>BRCA2</i>	Breast cancer type 2 susceptibility protein	600185 <sup>a</sup>	MPD	DNA repair-cell cycle checkpoint control-maintenance of genomic stability (HRR)
<i>LIG4</i>	DNA ligase 4	606593	Ligase IV syndrome: microcephaly-dysmorphic facial features-growth retardation-skin anomalies-pancytopenia.	DNA DSB repair (NHEJ) and V(D)J recombination
<i>NHEJ1</i>	Non-homologous end-joining factor 1	611291	Growth retardation-microcephaly-immunodeficiency	DNA DSB repair (NHEJ) and V(D)J recombination
<i>CHLR1/DDX11</i>	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/H) box helicase 11	601150 <sup>a</sup>	Warsaw breakage syndrome [WABS]: microcephaly-pre- and postnatal growth retardation-abnormal skin pigmentation	DNA helicase-genome stability
<i>PHC1 (MCPH1)</i>	Polyhomeotic-like protein 1	615414	PM-short stature	Component of polycomb group (PcG) multiprotein PRC1-like complex/ repression of transcription/role in chromatin remodelling and histone modification
<i>DNA2</i>	DNA replication helicase 2	601810 <sup>a</sup>	MPD	Helicase-DNA repair-genome stability
<i>XRCC2</i>	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2	600375 <sup>a</sup>	Microcephaly-growth deficiency-facial nerve palsy-skeletal abnormalities	DNA DSB repair (HR)-genome stability
<i>XRCC4</i>	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4	194363 <sup>a</sup>	MPD	DNA DSB repair (NHEJ)-genome stability
<i>NHEJ1</i>	Nonhomologous end-joining factor 1. Also called XLF/ Cernunnos.	611291	Severe combined immunodeficiency (SCID)-microcephaly-growth retardation-IR sensitivity	DNA DSB repair [NHEJ]-genome stability
<i>RECQL3</i>	Bloom syndrome helicase (BLM)	210900	Bloom syndrome-microcephaly-growth delay-immune deficiency-cancer	HRR pathway HJ resolving helicase

PM, primary microcephaly; IR, ionizing radiation.

<sup>a</sup>Denotes the gene entry in OMIM. MPD: microcephalic primordial dwarfism. HRR: homologous recombination repair. NHEJ: non-homologous DNA end-joining. M-R-N: MRE11-RAD50-NBS1 complex.

### Tableau 7 - Défauts de la réponse aux dommages de l'ADN et altération des protéines de réparation de l'ADN associées à la microcéphalie congénitale.

D'après D Alcantara et M O'Driscoll. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.*2014



Gene symbol	OMIM gene	Phenotype	OMIM Morbid	Function (chromatin)	Inheritance
<b>1. Writers</b>					
<i>DNA methylation</i>					
DNMT1	126375	Hereditary sensory neuropathy type IE (HSN1E) Cerebellar ataxia, deafness, and narcolepsy,	614116 604121	DNA methylation	AD AD
DNMT3B	602900	ICF syndrome	242860	DNA methylation	AR
FTO	610966	Growth retardation, developmental delay, coarse facies, and early death	612938	RNA demethylation	AR
<i>Histone modification</i>					
CREBBP	600140	Rubinstein–Taybi syndrome 1 (RSTS1)	180849	Histone acetyltransferase (HAT)	AD, de novo
CUL4B	300304	Mental retardation, X-linked, syndromic 15 (Cabezas type)	300354	Histone ubiquitination (H2AK119Ub1)	XL
EHMT1	607001	Kleefstra syndrome	610253	Histone methyltransferase (KMT1D; H3K9me1/2)	AD, de novo
EP300	602700	Rubinstein–Taybi syndrome 2 (RSTS2)	613684	Histone acetyltransferase (HAT)	AD, de novo
EZH2	601573	Weaver syndrome	277500	Lysine N-methyltransferase 6 (KMT6A; H3K27me3)	AD, de novo
HLC5	609018	Holocarboxylase synthetase deficiency	253270	Histone biotinylation (H4K16bio)	AR
HUWE1	300697	Mental retardation, X-linked syndromic, Turner type	300706	Histone ubiquitination	XL
KAT5B	605880	Ohdo syndrome, SIBYS variant Genitopatellar syndrome	603736 606170	Histone acetyltransferase (MYST4)	AD, de novo AD, de novo
KMT2A	159555	Wiedemann–Steiner syndrome	605130	Histone methylation (MLL)	AD, de novo
KMT2D	602113	Kabuki syndrome	147920	Histone methylation (MLL2)	AD, de novo
KMT2C	607001	Kleefstra Syndrome spectrum	610253	Histone methylation (MLL3)	AD, de novo
NSD1	606681	Sotos syndrome	117550	Histone methylation (KMT3B)	AD, mostly de novo
		Beckwith–Wiedemann syndrome	130650		AD, de novo
WDR57	602952	Wolf–Hirschhorn syndrome	194190	Histone methyltransferase (NSD2) (H3K36me3, H4K20me2)	AD, deletions
UBE2A	312180	X-linked ID, Nascimento type	300860	Histone ubiquitination	XL
<b>2. Erasers</b>					
HDAC4	605314	Brachydactyly-mental retardation syndrome	600430	Histone deacetylase	AD, de novo
HDAC8	300269	Wilson–Turner syndrome Cornelia de Lange syndrome 5	309585 300882	Histone deacetylase	XL XL
KDM5C	314690	X-linked syndromic mental retardation; Claes–Jensen type	300534	Histone demethylase (H3K4 tridemethylase)	XL
KDM6A	300128	Kabuki syndrome 2	300867	Histone demethylase (H3K27me3/2)	XL
PHF8	300560	Siderius X-Linked Mental Retardation Syndrome	300263	Histone demethylase (H4K20me1, H3K9me1/me2)	XL
<b>3. Chromatin remodelers (DEAD/H ATPase family)</b>					
ACTB	102630	Baraitser–Winter syndrome Dystonia, juvenile onset	243310 607371	SWI/SNF, INO80 and ISWI complex	AD, de novo AD* (single family, caution)
ARID1A	603024	Mental retardation, Autosomal dominant 14	614607	DEAD/H ATPase helicase family, SWI/SNF subfamily	AD, de novo
		Coffin–Siris syndrome	135900		AD, de novo
ARID1B	614556	Mental retardation, Autosomal dominant 12	614562	DEAD/H ATPase helicase family, SWI/SNF subfamily	AD, de novo
		Coffin–Siris syndrome	135900		AD, de novo
ATRX	300032	Alpha thalassemia mental retardation syndrome, X-linked (ATRX)	301040	DEAD/H ATPase helicase family	XL
		Mental retardation-hypotonic facies syndrome	309580		XL
CHD2	602119	Epileptic encephalopathy, childhood-onset	615369	DEAD/H ATPase helicase family, CHD subfamily	AD, de novo
CHD7	608802	CHARGE syndrome	214800	DEAD/H ATPase helicase family, CHD subfamily	AD, de novo
CHD8	610528	Autism, susceptibility to, AUTS18	615032	DEAD/H ATPase helicase family, CHD subfamily	AD, de novo
SMARCA2	600014	Nicolaides–Baraitser syndrome	601358	DEAD/H ATPase helicase family, SWI/SNF subfamily	AD, de novo
		Coffin–Siris syndrome	135900		AD, de novo
SMARCA4	603254	Mental retardation, Autosomal dominant 16	614609	DEAD/H ATPase helicase family, SWI/SNF subfamily	AD, de novo
		Coffin–Siris	135900		AD, de novo
SMARCB1	601607	Mental retardation, Autosomal dominant 15	614608	DEAD/H ATPase helicase family, SWI/SNF subfamily	AD
		Coffin–Siris syndrome	135900		AD, de novo
SMARCE1	603111	Coffin–Siris syndrome			AD, de novo

**Tableau 8 - Gènes ayant des fonctions épigénétiques impliquées dans les troubles cognitifs.**

*D'après T. Kleefstra et al. Neuropharmacology. 2014*





Gene symbol	OMIM gene	Phenotype	OMIM Morbid	Function (chromatin)	Inheritance
SRCAP	611421	Floating-Harbor syndrome	136140	DEAD/H ATPase helicase family, SWI/SNF subfamily	AD, de novo
SS18L1	606472	Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)		DEAD/H ATPase helicase family, INO80/SWR subfamily	AD, de novo
<b>4. Other readers and chromatin remodelers</b>					
ASXL1	612990	Bohring–Opitz syndrome	605039	PR-DUB complex, histone H2A deubiquitination	AD, de novo
BCOR	300485	Microphthalmia, syndromic	300166	Polycomb complexes containing Ring1B	XL
CHMP1	164010	pontocerebellar hypoplasia 8	614961	Targets polycomb protein BMI to condensed chromatin	AR
CTCF	604167	ID, microcephaly and growth retardation		Chromatin binding factor, insulator	AD, de novo
GATAD2B	614998	Mental retardation, autosomal dominant 18	615074	NuRD complex	AD, de novo
HCFC1	300019	Mental retardation, X-linked; MRX3/	309541	Found in repressor and activator complexes	XL
		Methylmalonic acidemia and homocysteinemia (Cobalamin disorder)			XL
KANSL1	612452	Koolen–De Vries syndrome	610443	NSL1 histone acetyltransferase complex	AD, de novo
MBD5	611472	Mental retardation, autosomal dominant 1 (2q deletion syndrome)	156200	Associated with heterochromatin	AD, de novo
		Kleefstra Syndrome spectrum	610253		AD, de novo
MECP2	300005	RETT syndrome; RTT	312750	Binds to methylated DNA	XL, mainly females
		RETT syndrome, atypical; Angelman syndrome-like	105830		XL
		Autism, susceptibility to, X-linked 3; AUTSX3	300496		XL
		Encephalopathy, neonatal severe	300673		XL
		Mental retardation, X-linked, syndromic 13; MRXS13	300055		XL
		Duplication MECP2; Lubs X-linked mental retardation syndrome	300260		XL
PHF6	300414	Borjeson–Forsman–Lehmann syndrome	301900	NuRD complex	XL
		Coffin–Siris-like	135900		XL
POGZ	614787	Autism spectrum disorder		Pogo transposable element with ZNF domain	AD, de novo
SKI	164780	Shprintzen–Goldberg syndrome	182212	HDAC recruiting complexes	AD
MED12	300188	Lujan–Fryns syndrome	309520	Mediator complex	XL
		Opitz–Kaveggia syndrome	305450	Mediator complex	XL
		OHDO syndrome Maat–Kievit–Brunner	300895	Mediator complex	XL
MED17	603810	Microcephaly, postnatal progressive, with seizures and brain atrophy	613668	Mediator complex	AR
MED23	605042	Mental retardation, autosomal recessive 18	614249	Mediator complex	AR
NIPBL	608667	Cornelia de Lange syndrome 1; CDLS1	122470	Cohesin complex	AD
RAD21	606462	Cornelia de Lange syndrome 4; CDLS4	614701	Cohesin complex	AD, de novo
SALL1	602218	Townes–Brocks syndrome	107480	Member of NuRD histone deacetylase complex	AD
SMC1A	300040	Cornelia de Lange syndrome 2; CDLS2	300590	Cohesin complex	XL
SMC3	606062	Cornelia de Lange syndrome 3; CDLS3	610759	Cohesin complex	AD, de novo

**Tableau 8 - Gènes ayant des fonctions épigénétiques impliquées dans les troubles cognitifs.**

*D'après T. Kleefstra et al. Neuropharmacology. 2014*



Sexe	Colin et al. 2014		Colin et al. 2014		Ben-Omran et al. 2015		Ben-Omran et al. 2015		Vodopliutz et al. 2015		Vodopliutz et al. 2015		Vodopliutz et al. 2015		Vodopliutz et al. 2015	
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
<b>Origine</b>	Maroc	Maroc	Turquie	Egypte	Autriche	Liban	Autriche	Liban	Liban	Liban	Liban	Inde	Turquie	Turquie	Somalie	
<b>Cnsanguinité</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Type de mutation</b>	Non-sens	Non-sens	Tronquante	Non-sens	Tronquante	Faux-sens	Tronquante	Faux-sens	Faux-sens	Faux-sens	Faux-sens	Faux-sens	Faux-sens	Faux-sens	Faux-sens	Faux-sens
<b>Age (années) au dernier examen</b>	5	7	13	11	6	27	26	31	30	25	25	Décès à 2,5 (IRT)	Décès à 17 (IRT)	Décès à 17 (IRT)	NR	NR
<b>Microcéphalie</b>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	-3DS	-2,5DS	-3DS	-1,8DS	-1,15DS											
<b>Epilepsie</b>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<b>Spasticité</b>	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
<b>Mouvements anormaux</b>	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
<b>Atrophie cérébelleuse</b>	+	+	+	+	+	+	NR	+	NR	+	NR	NR	+	NR	+	+
<b>Corps calleux fin</b>	+	-	+	+	NR	NR	NR	NE	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
<b>Atrophie cérébrale</b>	-	+	+	+	+	-	NR	-	NR	-	NR	NR	+	NR	+	+
<b>Faciès grossier</b>	-	-	-	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
<b>Atrophie optique</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NR	+	NR	+	-
<b>Hernie hiatale</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Déficience intellectuelle</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	sevère	sevère	sevère	sevère	profonde	profonde	profonde	profonde	profonde	profonde	profonde	sevère	profonde	profonde	modéré	modéré
<b>Protéinurie</b>	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Histologie rénale</b>	GSSF avec collapsing	NR	GSSF	NR	GSSF	NR	NR	NR	NR	NR	GSSF	GSSF	GSSF	GSSF	NR	NR

**Tableau 9 - Caractéristiques cliniques et en neuro-imagerie des 55 individus rapportés dans la littérature comme porteurs de mutations bi-alléliques dans le gène WDR73.**

M : masculin, F : féminin, DS/ Déviation standard, IRT : insuffisance rénale terminale, GSSF : glomérulo-sclérose segmentaire et focale, NR : non rapporté

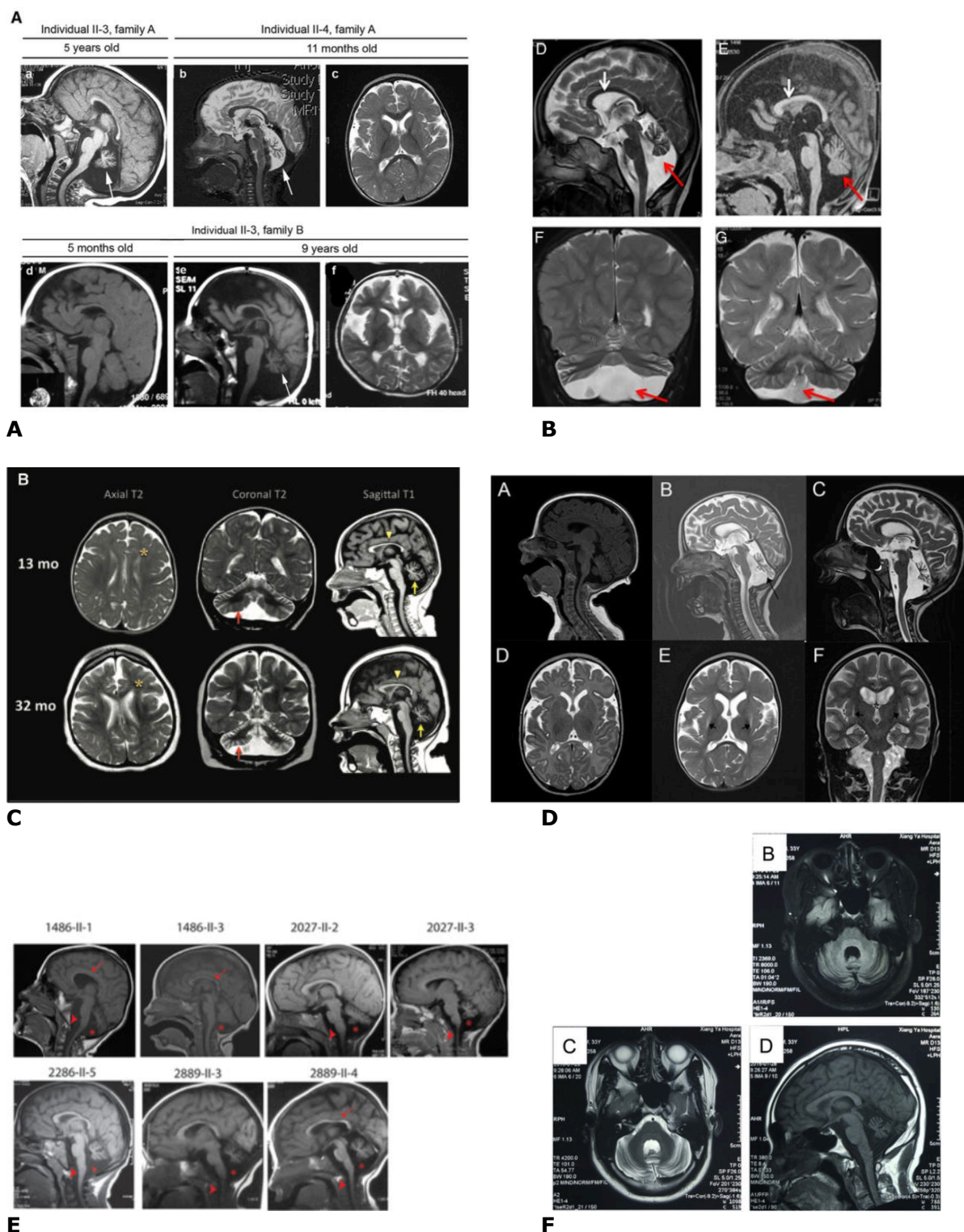


	Jinks et al. 2015	Rosti et al. 2016	Rosti et al. 2016	Rosti et al. 2016	Rosti et al. 2016	Rosti et al. 2016	Rosti et al. 2016	Rosti et al. 2016	Rosti et al. 2016	Rosti et al. 2016	Jiang et al. 2017	Jiang et al. 2017	Total
<b>Sexe</b>	30 individus	F	F	F	M	M	F	F	F	F	F	G	55 Individus
<b>Origine</b>	Américains Amish	Palestine	Palestine	Egypte	Egypte	Syrie	Egypte	Egypte	Egypte	Egypte	Chine, peuple Han	Chine, peuple Han	
<b>Consanguinité</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	52/54 96%
<b>Type de mutation</b>	Tronquante	Faux-sens	Faux-sens	Faux-sens	Faux-sens	Faux-sens	Faux-sens	Faux-sens	Faux-sens	Faux-sens	Faux-sens	Faux-sens	
<b>Age</b>	1,4 - 28	5	1,5	3	2	11	8	2	35	33	33	33	1,4-35
<b>Microcéphalie</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	43/54 80%
<b>Epilepsie</b>	+	+	-5,5DS	-5,5DS	-3,5DS	-5DS	-6,5DS	-5,5DS	10-50th	10-50th	10-50th	10-50th	21/54 39%
<b>Spasticité</b>	12 individus	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	42/54 78%
<b>Mouvements anormaux</b>	27 individus	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	40/54 74%
<b>Atrophie cérébelleuse</b>	2 individus	+	+	+	+	+	+	+	NR	NR	NR	NR	23/23 100%
<b>Corps calleux fin</b>	2 individus	+	+	-	-	-	-	+	NR	NR	NR	NR	9/14 64%
<b>Atrophie cérébrale</b>	2 individus	+	-	+	+	+	+	+	NR	NR	NR	NR	17/22 77%
<b>Facès grossier</b>	NR	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	7/14 50%
<b>Atrophie optique</b>	28 individus	+	-	-	-	-	-	-	NR	NR	NR	NR	43/50 86%
<b>Hernie hiatale</b>	NR	-	-	-	-	-	-	-	NR	NR	NR	NR	1/22 4%
<b>Déficience intellectuelle</b>	30 individus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	55/55 100%
<b>Protéinurie</b>	17 individus	+	-	-	-	+	+	+	NR	NR	NR	NR	28/54 52%
<b>Histologie rénale</b>	GSSF 3 individus	GSSF avec collapsing	NR	NR	NR	Sclérose mésangiale diffuse	NR	NR	NR	NR	NR	NR	

**Tableau 9 - Caractéristiques cliniques et en neuro-imagerie des 55 individus rapportés dans la littérature comme porteurs de mutations de mutations bi-alléliques dans le gène WDR73.**

M : masculin, F : féminin, DS/ Déviation standard, IRT : insuffisance rénale terminale, GSSF : glomérulo-sclérose segmentaire et focale, NR : non rapporté





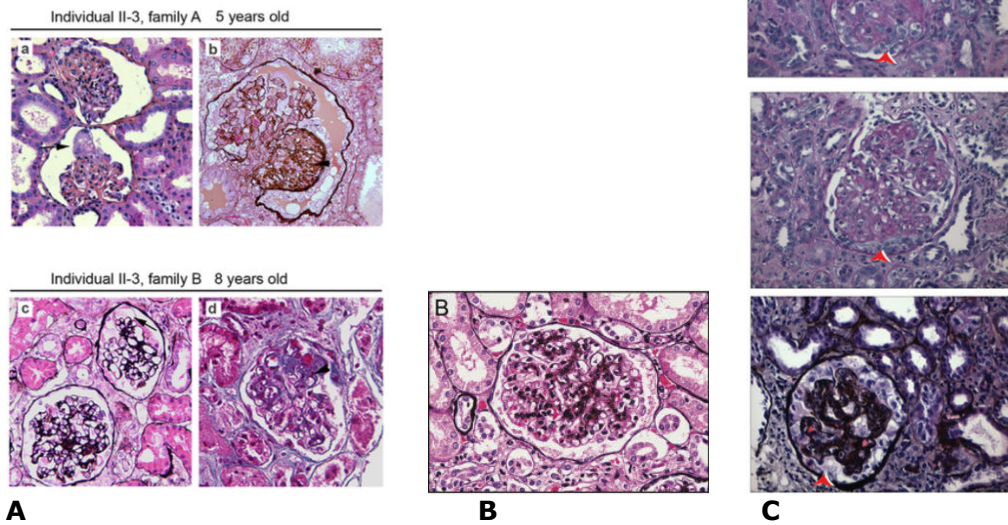
**Figure 2 – Images IRM issues des 6 publications concernant les mutations bi-alléliques du gène *WDR73*.**

Les IRM montrent toutes une hypoplasie cérébelleuse avec dans certains cas un corps calleux fin ou une atrophie cérébrale.

- A – D'après Colin et al. *Am J Hum Genet.* 2014
- B – D'après Ben-Omran et al. *J Med Genet.* 2015
- C – D'après Jinks et al. *Brain.* 2015
- D – D'après Vodopituz et al. *Hum Mutat.* 2015
- E – D'après Rosti et al. *Am J Med Genet A.* 2016
- F – D'après Jiang et al. *Clin Chim Acta.* 2017







**Figure 3 – Histologies rénales rapportées dans 6 publications concernant les mutations bi-alléliques du gène *WDR73*.**

Coupes histologiques de biopsies rénales mettant en évidence une glomérulo-sclérose segmentaire et focale en A, B et C ; avec collapsing en A et C.

A - D'après Colin et al. *Am J Hum Genet.* 2014

B - D'après Jinks et al. *Brain.* 2015

C - D'après Rosti et al. *Am J Med Genet A.* 2016



Sexe	Colin et al. 2016		Colin et al. 2016		Colin et al. 2016		Muona et al. 2016		Muona et al. 2016		Muona et al. 2016		Muona et al. 2016	
	M	F	M	F	F	F	G	F	G	F	G	G	G	G
<b>Origine</b>	France	USA	France	Allemagne	Koweït	Finlande	Finlande	Finlande	Finlande	Finlande	Finlande	Finlande	Finlande	Angleterre
<b>Type de mutation</b>	p.Ala371Thr p.Gln302*	p.Ala371Thr p.Lys324Asnfs*14	p.Ala371Thr p.Gln302*	p.Val260Met p.Asp389Tyr	p.Met57Val p.Gly168Glu	p.Ala371Thr p.Arg55His	p.Ala371Thr p.Arg55His	p.Ala371Thr p.Tyr285*	p.Ala371Thr p.Tyr285*	p.Ala371Thr p.Tyr285*	p.Ala371Thr p.Tyr285*	p.Ala371Thr p.Tyr285*	p.Ala371Thr p.Tyr285*	p.Ala371Thr p.Arg188 *
<b>Age à la présentation</b>	3 mois	2 mois	3 mois	2 ans 6 mois	6 mois	2 mois	1 semaine	2-3 mois	1 semaine	1 semaine	Naissance	1 semaine	2 semaines	
<b>Microcéphalie secondaire</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NR	+	+	
<b>Epilepsie</b>	+	+	+	-	-	spasmes myoclonie	spasmes et myoclonie	myoclonie	myoclonie	spasmes	spasmes	spasmes	spasmes	spasmes
<b>Hypotonie axiale</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Spasticité</b>	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<b>Mouvements anormaux</b>	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<b>Anomalies Cérébrales à l'IRM</b>	Corps calleux fin, hypersignaux de la SB de l'insula, vallées sylviennes larges	Retard de myélinisation, corps calleux fin	Vallées sylviennes larges	Hypoplasie cérébelleuse modérée, hypersignaux périvertriculaires	Atrophie corticale majeure, atrophie cérébelleuse, corps calleux fin	Retard de myélinisation, atrophie modérée des thalami et du cervelet, hypersignaux périvertriculaires	Retard de myélinisation, atrophie modérée de la SB, hypersignaux des thalami	Atrophie corticale modérée	NR	NR	Atrophie corticale modérée, hypersignaux périvertriculaires	Atrophie corticale modérée, hypersignaux périvertriculaires	Atrophie cérébrale	
<b>Dysmorphie</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<b>Troubles visuels</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<b>Retard statur pondéral</b>	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
<b>Déficience intellectuelle</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	severe	severe	severe	severe	severe	severe	severe	severe	severe	severe	severe	severe	severe	severe

**Tableau 10 - Caractéristiques cliniques et en neuro-imagerie des 15 individus rapportés dans la littérature comme porteurs de mutations bi-alléliques dans le gène UBA5.**

M : masculin, F : féminin, DS/ Déviation standard, NR : non rapporté, SB : substance blanche

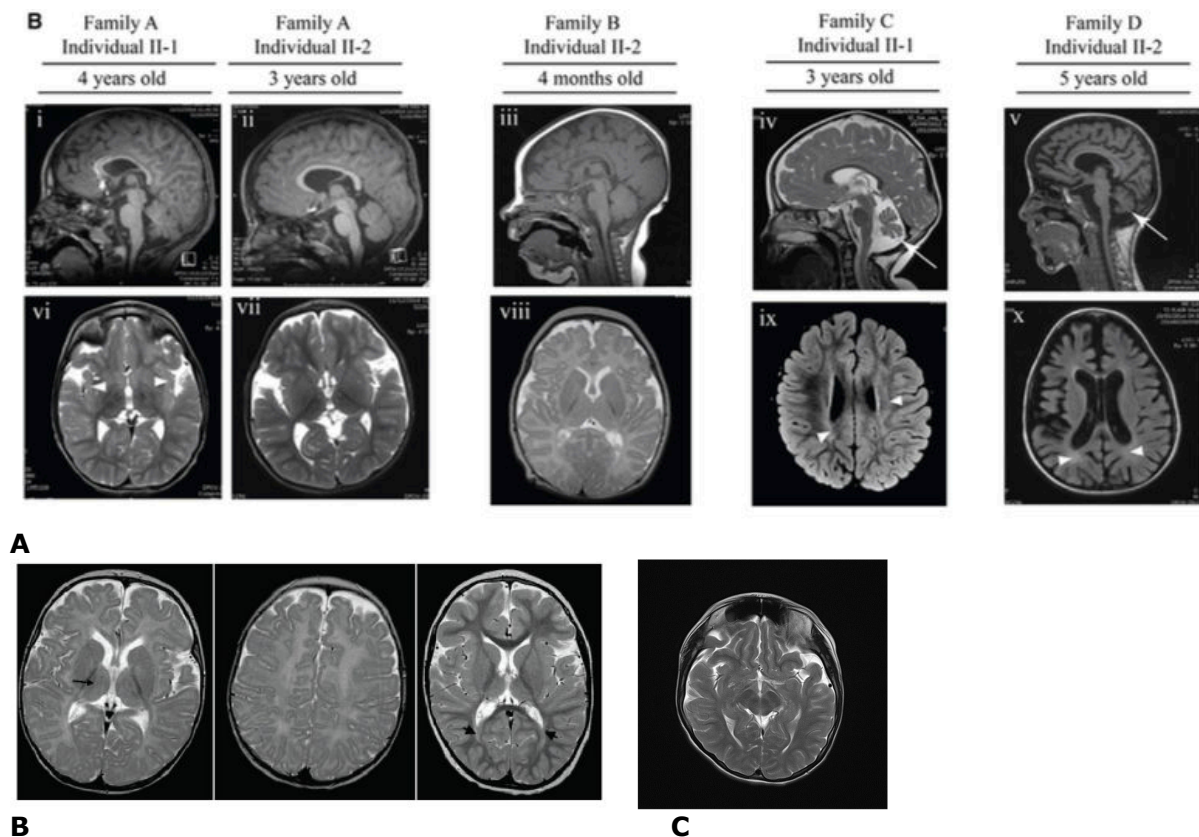


	Muona et al. 2016	Muona et al. 2016	Arnadottir et al. 2017	Arnadottir et al. 2017	Total 16 Individus et pourcentages
Sexe	F	G	F	F	
Origine	Père : Irlande du Nord, Mère : Roumanie	Père : Finlande	Père : USA, Islande	Père : USA, Islande	
Type de mutation	p.Ala371Thr p.Arg61 *	p.Ala371Thr p.Arg188 *	p.Ala371Thr p.Ala228=	p.Ala371Thr p.Ala228=	
Age à la présentation	3 semaines	3-4 mois	3 mois	3 mois	Naissance - 2 ans 1/2
Microcéphalie secondaire	+	-	NR	NR	12/13 92%
Epilepsie	-	+	+	+	13/16 81%
Hypotonie axiale	+	+	+	+	16/16 100%
Spasticité	+	+	+	+	13/16 81%
Mouvements anormaux	+	+	+	+	13/16 81%
Anomalies Cérébrales à l'IRM	Hypoplasie du cervelet	Retard de myélinisation et hypersignaux frontaux gauche	Sillons larges et légère atrophie cérébrale	Sillons larges et légère atrophie cérébrale	
Troubles visuels	-	+	+	+	11/16 69%
Retard staturo-pondéral	+	+	+	+	13/16 81%
Dysmorphie	-	-	+	+	3/16 19%
Déficience intellectuelle sévère	+	+	+	+	16/16 100%

**Tableau 10 - Caractéristiques cliniques et en neuro-imagerie des 16 individus rapportés dans la littérature comme porteurs de mutations bi-alléliques dans le gène UBA5.**

M : masculin, F : féminin, DS/ Déviation standard, NR : non rapporté, SB : substance blanche





**Figure 4 – Images IRM issues des 2 publications concernant les mutations bi-alléliques du gène *UBA5*.**

A - Les images Sagittales T1 (i, ii, iii et v) et sagittales T2 (iv) sont visualisées. Un corps calleux fin est observé chez les individus II-1 de la famille A, II-2 de la famille B et II-2 de la famille D (i, iii, v), une atrophie corticale chez l'individu II-2 de la famille D (v) et une atrophie cérébelleuse (flèches) sans anomalies du tronc cérébral chez les individus II-1 de la famille C et II-2 de la famille D (iv, v) sont observés. Les images Axiales T2 (vi, vii et viii) et T2 Flair (ix, x) sont visualisées. On observe une hyperintensité de la substance blanche (flèche) au niveau sous-cortical isolé (II-1 individuel dans la famille A [vi]), au niveau de la région périventriculaire (individu II-1 dans la famille C et II-2 dans la famille D [ix, x]), un retard de myélination (individu II-2 dans la famille B) (viii), un élargissement des vallées sylviennes (individu II-1 et II-2 dans la famille A [vi, vii]) et une atrophie corticale globale avec dilatation ventriculaire (II-2 individuel dans la famille D [x]).

*D'après Colin et al. Am J Hum Genet. 2016*

B - A gauche et au milieu, images pondérées en T2 de l'individu A-6 à l'âge de 6 mois. La myélinisation est retardée et il y a un léger hypersignal dans le thalami (flèche). A droite, image pondérée en T2 de l'individu A-4 à l'âge de 5 ans. Il y a un hypersignal périventriculaire periventriculaire (flèches) et le thalami est légèrement atrophique. La myélinisation est adaptée à l'âge.

*D'après Muona et al. Am J Hum Genet. 2016*

C -IRM cérébrale de la sœur aînée. L'image Axial T2 de la sœur aînée (II-2) montre des sillons relativement larges et une légère atrophie cérébrale

*D'après Arnadottir et al. BMC Med Genet. 2017*





## **2. Données supplémentaires aux articles**



The American Journal of Human Genetics, Volume 95

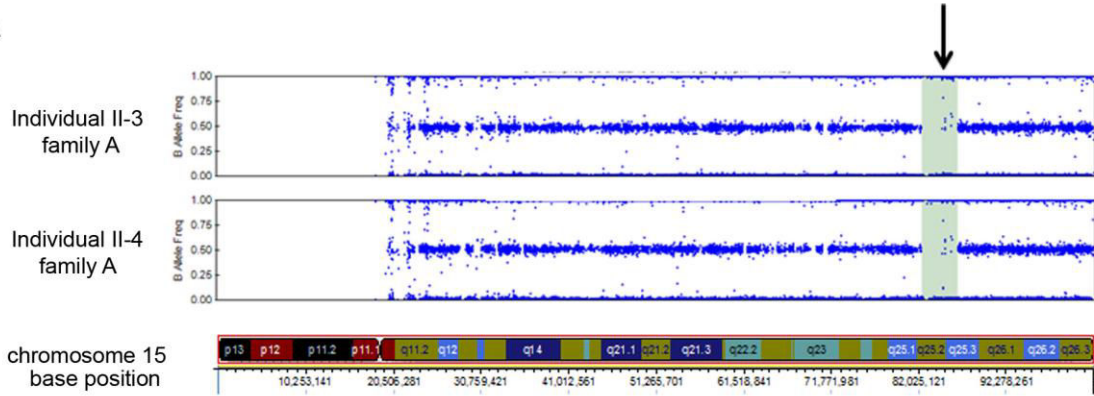
Supplemental Data

**Loss-of-Function Mutations in *WDR73* Are  
Responsible for Microcephaly and Steroid-Resistant  
Nephrotic Syndrome: Galloway-Mowat Syndrome**

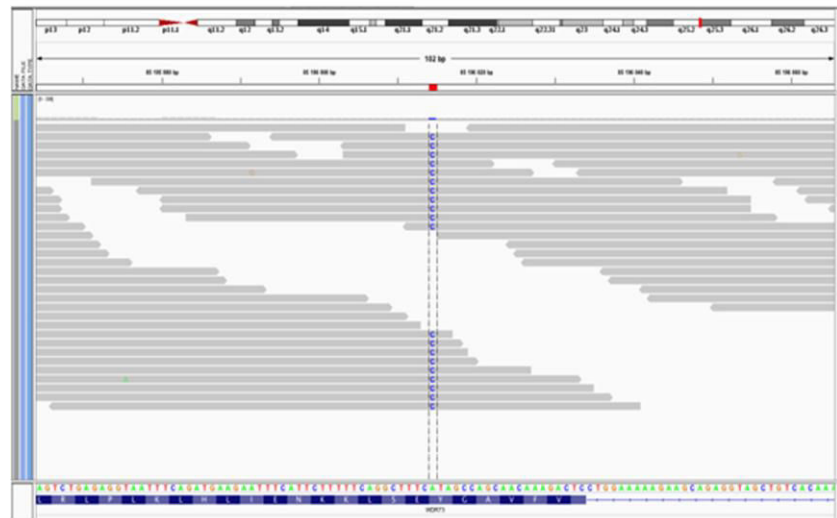
Estelle Colin, Evelyne Huynh Cong, Géraldine Mollet, Agnès Guichet, Olivier Gribouval, Christelle Arrondel, Olivia Boyer, Laurent Daniel, Marie-Claire Gubler, Zelal Ekinci, Michel Tsimaratos, Brigitte Chabrol, Nathalie Boddaert, Alain Verloes, Arnaud Chevrollier, Naig Gueguen, Valérie Desquirit-Dumas, Marc Ferré, Vincent Procaccio, Laurence Richard, Benoit Funalot, Anne Moncla, Dominique Bonneau, and Corinne Antignac



**A**



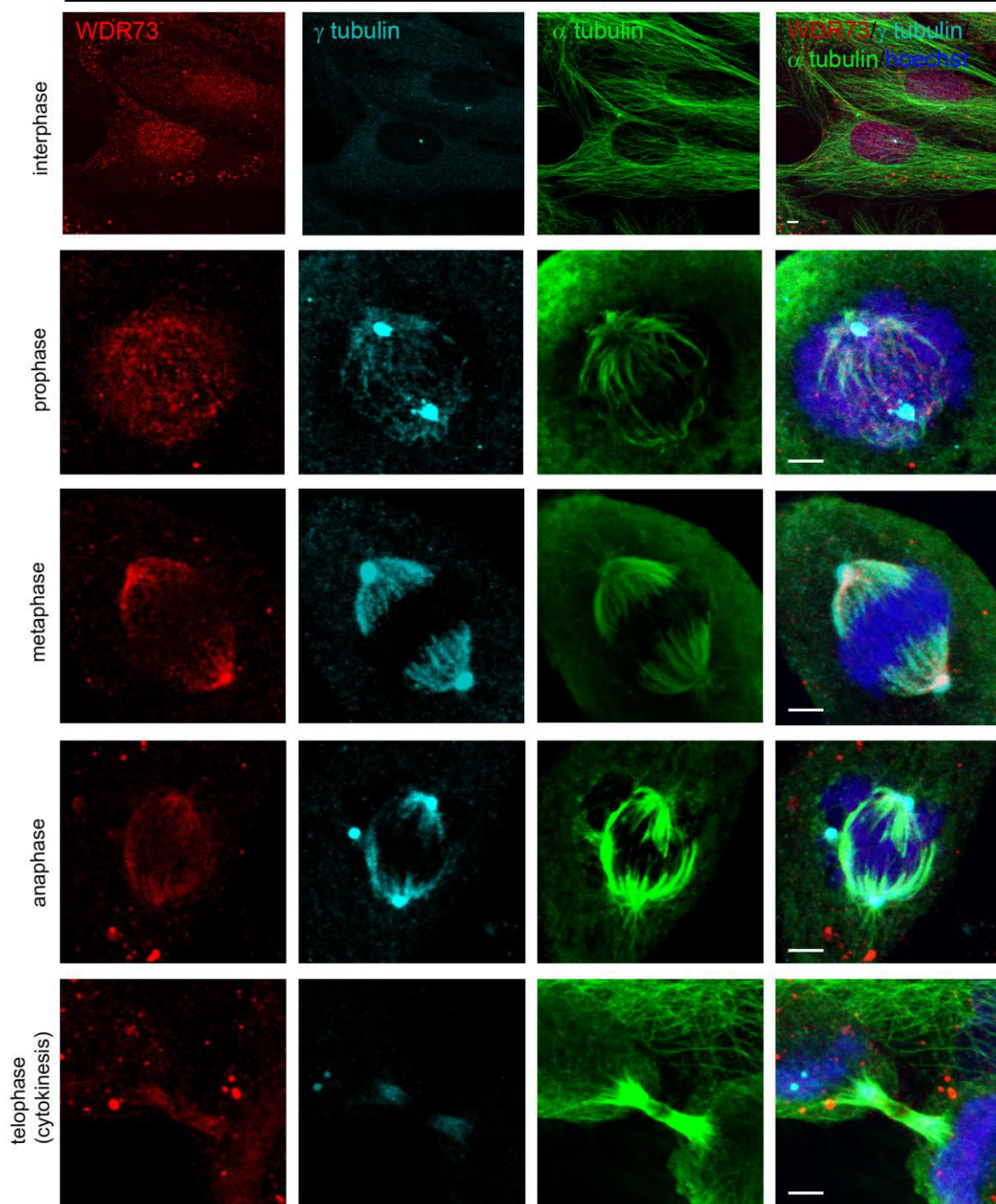
**B**



**Figure S1. Autozygosity mapping and WES** (A) SNP micro-array imaging results for chromosome 15 indicating the single ROH (arrow) of 4,3 Mb ( 84,511,365 - 88,787,278) shared by the two affected siblings (II-3 and II-4, both from family A). (B) Exome capture and sequence alignment data of individual II-3 from family A showing the sequencing reads spanning the homozygous mutation identified and highlighted by base in blue.



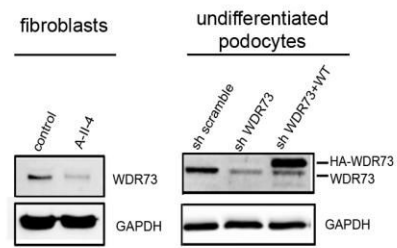
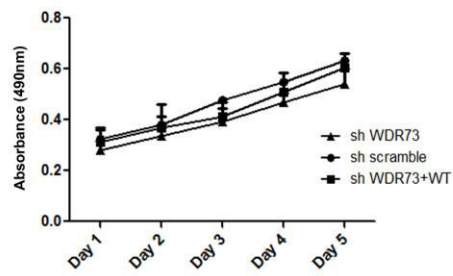
undifferentiated podocytes



**Figure S2: WDR73 localization during the cell cycle in podocytes.** Immunolabeling in control podocytes showing the subcellular localization of WDR73 (in red),  $\alpha$ -tubulin (in green), and  $\gamma$ -tubulin (in cyan). Similar to fibroblasts, WDR73 immunolabeling shows a diffuse cytoplasmic localization of the protein in podocytes. However, during mitosis (from prophase to anaphase), WDR73 relocalizes to the asters of microtubules and the cleavage furrow (scale bars=10  $\mu$ m).

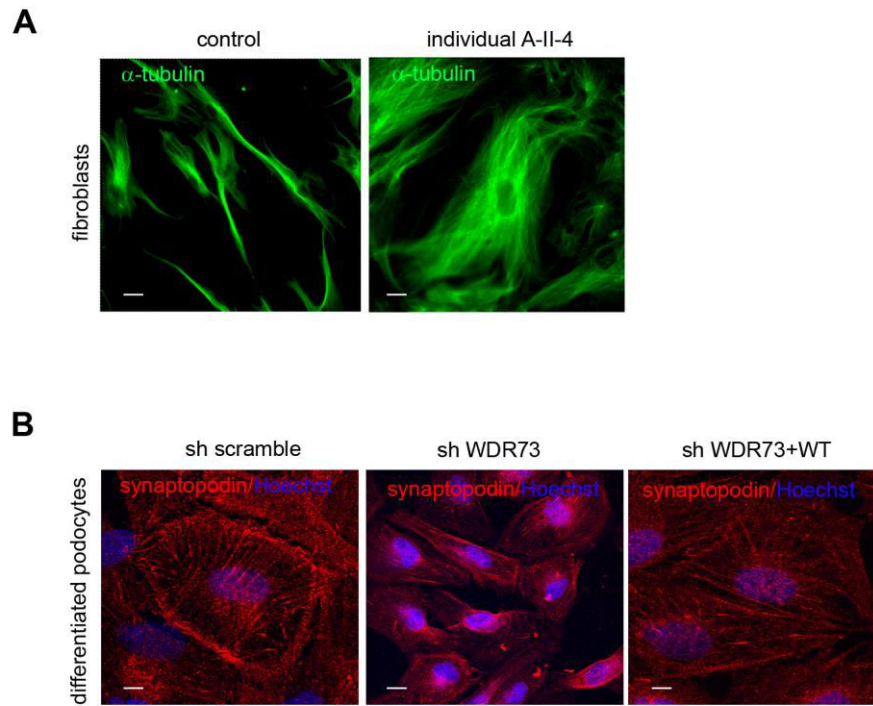




**A****B**

**Figure S3: Protein level of WDR3 in fibroblasts and podocytes.** (A) Western blot showing WDR3 protein level in A-II-4 fibroblasts and in undifferentiated podocytes. WDR3 protein level is decreased in A-II-4 fibroblasts and in WDR3-depleted podocytes compared to controls. (B) Graph showing the results of the colorimetric cell viability assay (MTT) in undifferentiated podocytes. ANOVA test was used to compare differences between WDR3-depleted, control and WDR3-rescued podocytes. The mean  $\pm$  SEM is shown. No differences in cell survival were found.





**Figure S4: Phenotype of fibroblasts and differentiated podocytes.** (A) Immunolabeling of  $\alpha$ -tubulin in fibroblasts. Alterations in the morphology of A-II-4 fibroblasts are observed. (B) Immunolocalization of synaptopodin in differentiated podocytes. No alterations in podocyte differentiation were observed. Nuclei in WDR73-depleted podocytes are abnormal.



WDR73 – Ex 1 F	5'-GTTAACCCCGCCCCTAAC-3'
WDR73 – Ex 1 R	5'-GATCCCCAACGTGCCTC-3'
WDR73 – Ex 2 F	5'-CTGCCATCTTGAGTTCTTTG-3'
WDR73 – Ex 2 R	5'-AGGCTTAGCTCCTGAAACCC-3'
WDR73 – Ex 3 F	5'-TGCATGGTCTGCAATCTTTC-3'
WDR73 – Ex 3 R	5'-GATAACAGGAGCTCCACAAATG-3'
WDR73 – Ex 4 F	5'-GCCAGGCTAGGACCTGACTC-3'
WDR73 – Ex 4 R	5'-GTGGGAATGGAGATGAGGAG-3'
WDR73 – Ex 5 F	5'-AGGGACCTGTGTGGATAAGC-3'
WDR73 – Ex 5 R	5'-TTAGGGGACAGGGGTGTATG-3'
WDR73 – Ex 6 F	5'-CTGGCAGCCTGTCATGTTTC-3'
WDR73 – Ex 6 R	5'-ATAGTGGCTGAGTTGGGCTG-3'
WDR73 – Ex 7 F	5'-AATTGCCAGACCCATCTGC-3'
WDR73 – Ex 7 R	5'-ACCCAACAGTCTCCTGGAAG-3'
WDR73 – Ex 8 F	5'-TCGCTTGAGGCTAGGAGTTC-3'
WDR73 – Ex 8 R	5'-CAGCTGGTAACAGGGACTGG-3'

**Table S1. Primer pairs used for mutation screening in *WDR73* gene.**



## Supplemental Data

### **Biallelic Variants in *UBA5* Reveal that Disruption of the UFM1 Cascade Can Result in Early-Onset Encephalopathy**

Estelle Colin, Jens Daniel, Alban Ziegler, Jamal Wakim, Aurora Scrivo, Tobias B. Haack, Salim Khiati, Anne-Sophie Denommé, Patrizia Amati-Bonneau, Majida Charif, Vincent Procaccio, Pascal Reynier, Kyrieckos A. Aleck, Lorenzo D. Botto, Claudia Lena Herper, Charlotte Sophia Kaiser, Rima Nabbout, Sylvie N'Guyen, José Antonio Mora-Lorca, Birgit Assmann, Stine Christ, Thomas Meitinger, Tim M. Strom, Holger Prokisch, The FREX Consortium, Antonio Miranda-Vizueté, Georg F. Hoffmann, Guy Lenaers, Pascale Bomont, Eva Liebau, and Dominique Bonneau





## Supplemental Note 1: Case reports

### Case 1 (Family A, Individual II-1)

Individual 1 is a boy born to healthy non-consanguineous French parents. After a normal pregnancy, delivery was vaginal at 40 weeks of gestation. Growth characteristics at birth were normal: weight 3.48 kg, length 51cm, and occipitofrontal circumference (OFC) 36cm. Until 3 months of age, the child's development was considered normal. At age 3 months, he presented infantile spasms with a hypsarrhythmic EEG pattern, i.e. the West syndrome, associated with signs of failure to thrive. Seizures were refractory to polytherapy including vigabatrin, sodium valproate, clobazam, and corticosteroid. A ketogenic diet, started at age 20 months, initially decreased the frequency of seizures with an improved EEG pattern, but within a few months the seizures worsened, requiring further changes in treatment. On examination, at age 5 years, he had familial (non-dysmorphic) facial features, and still manifested significant failure to thrive despite gastric tube feeding. His length was then 91 cm (-4 SD), weight 10 kg (-4SD) and OFC 47cm (-3.5sd). He was minimally responsive to his environment, had no head control, no language skills, and could not sit up unaided. Axial hypotonia was associated with peripheral hypertonia. Visual pursuit was inconstantly present. Generalized tonic-clonic seizures occurred several times a day despite anticonvulsant polytherapy. Normal testing included plasma and cerebrospinal fluid (CSF) lactate, plasma and CSF amino acids, CSF glucose, neurotransmitters and interferon, urine organic acids, plasma and urine creatine and guanidinoacetate, plasma purines and pyrimidines, biotinidase, very long chain fatty acids, plasma phytanic and pristanic acid, plasma copper and ceruloplasmin. Screening for congenital disorders of glycosylation was done *via* plasmatic glycoprotein analyses. Sanger sequencing of *MECP2*, *STXBPI*, *CDKL5*, *FOXG1* and *ARX* showed no mutation. Brain CT-scan and MRI at the age of 3 months were normal. However,



subsequent brain MRIs at 15 months and 4.5 years showed a thin corpus callosum and hyperintensities in insula subcortical white matter (Figure 1B, a,f).

### **Case 2 (Family A, Individual II-2)**

Individual 2 is brother to Individual 1. Pregnancy and delivery (vaginal, at 40 weeks of gestation) were uneventful. The growth characteristics at birth were normal: weight 3.3 kg, length 50cm, and OFC 35cm. Head control was acquired at age 2 months, but at age 4 months he had infantile spasms and showed signs of failure to thrive. Treatment with clobazam and corticotherapy, together with a ketogenic diet at age 5 months, initially resulted in a moderate reduction of seizures. Blinking reflexes and pupillary light reflexes were decreased but fundus examination and electroretinograms were normal. Corticotherapy was tapered down and stopped at age 7 months. Because of subsequent worsening of the EEG pattern at age 15 months, clobazam was discontinued and clonazepam was added. At age 27 months, he was presenting daily seizures with a prolonged postictal state. The ketogenic diet was stopped and sodium valproate was introduced. However, there was no improvement in seizure control. At age 4 years, he showed familial (non-dysmorphic) features, with severe developmental delay, with no head control, inability to sit up unaided, and no language skills. He presented axial hypotonia with peripheral hypertonia. Despite anticonvulsant polytherapy, generalized myoclonic seizures occurred several times a day. Visual pursuit was inconstantly present. Like his brother, he showed signs of failure to thrive, with length 89 cm (-2SD), weight 9.6kg (-3.5SD) and OFC 47cm (-2SD), leading to the insertion of a gastrostomy feeding tube. Extensive metabolic screening in blood, urine, and CSF was negative. Brain MRI at age 4 months was normal. However, a subsequent MRI at age 3 years showed widening of sylvian fissures (Figure 1B, b,g).



### **Case 3 (Family B, Individual II-2)**

Individual 3 was a girl, the second child of healthy non-consanguineous American parents without a family history. Delivery was vaginal at 35 weeks of gestation after a pregnancy complicated by hyperemesis gravidarum. At birth, her weight was 2.8 kg and the OFC was 33 cm (4th centile); the perinatal evaluation was normal. The seizures, associated with feeding difficulties, began at the age of 2 months. She developed infantile spasms with hypsarrhythmia at the age of 5 months. These spasms proved refractory to drugs. A gastrostomy was placed at the age of 1 year. She acquired the ability to smile at age 13 months, but then lost it. Iterative brain MRI evidenced delayed myelination (Figure 1B, c,h). Normal results were found with assays of urine amino and organic acids, plasma amino acids, urine oligosaccharide and mucopolysaccharides, lysosomal enzymes, plasma VLCFA, and CDG screening. SNP-array and Sanger sequencing of *FOXG1* and of the genes responsible for neuronal ceroid lipofuscinose (*PPT1* and *TTPI*) also showed normal results.

The last physical examination at age 33 months revealed significant developmental delay: incapacity of sitting up unaided, failure to acquire language skills, and inability to smile. She still had seizures despite the ketogenic diet and the multiple seizure medications administered. A lack of visual pursuit associated with a vertical nystagmus was noted. Despite tube feeding, her height remained at the 14<sup>th</sup> centile, and her weight at the 3<sup>rd</sup> centile. She had microcephaly (OFC at the 4<sup>th</sup> centile) but no dysmorphic features. Despite intensive care, her medical condition deteriorated and she died at age 34 months.

### **Case 4 (Individual II-1, family C)**

Individual 4 is a girl, the first-born child of non-consanguineous German parents. She was born by caesarean section at 38 weeks of gestation after a normal pregnancy. The growth characteristics at birth were: weight 3.2 kg (M), length 53 cm (M) and OFC 34.5 cm (M). She



presented with congenital strabismus, which improved spontaneously at age 2 years. The electroretinogram was normal. She underwent bilateral hip dislocation surgery at age 11 months. At age 2 years and 6 months, she started having hypnagogic leg jerks. At age 4 years, another kind of abnormal movement appeared, consisting of involuntary head deviation with arm and leg extension. These movements, lasting less than 10 seconds, occurred only during sleep with a frequency of two or three times a night. They were absent when the child was awake and were efficiently controlled with clobazam. Waking EEG monitoring results were normal but spikes and sharp waves were present on awakening. Brain MRI, performed at age 3 years, showed a mild cerebellar hypoplasia without brainstem anomalies, white matter hyperintensities periventricular region (Figure 1B, d,i). Physical examination at age 6 years showed significant developmental delay: incapacity to sit up without help, and failure to acquire language skills. Axial hypotonia was associated with peripheral hypertonia. She also had severe growth retardation: length 98cm (-4SD), weight 12kgs (-5 D) and microcephaly OFC: 47.5cm (-2.5SD), despite adequate caloric intake. She had no dysmorphic features.

#### **Case 5 (Individual II-2, family D)**

Individual 5 is a girl, the fifth child born to non-consanguineous parents originating from Kuwait. She was born at 32 weeks of gestation after a normal pregnancy. Her birth weight was 2.6 kg. She had congenital stridor and required treatment for hyperbilirubinemia. Developmental delay became obvious from the age of 6 months. She was able to maintain mutual gaze but has never been able to sit up unaided or to develop language skills. At age 2 years, her neurological condition suddenly worsened during an acute infectious disease that required intubation and ventilation. At that time, she developed a severe dystonia, which did not improve with baclofen, clonazepam, L-DOPA and valproic acid. Dystonic movements gradually disappeared but, at age 5 years, another acute neurological deterioration occurred,





including spastic/dystonic movements, stridor, and dysphagia. Neurological examination at age 6 years was significant for severe spasticity with dystonia, repetitive and prolonged episodes of opisthotonus, dysphagia and poor visual pursuit. The EEGs were difficult to interpret because of continuous muscle artifacts even when using sedative drugs. However, severe slowing down of the background activity was observed, with some epileptiform discharges over the central and frontal areas. Nevertheless, the movement disorders such as opisthotonus and limb spasms were not caused by epileptic seizures.

In addition, she was microcephalic (OFC -2.4 SD) and showed signs of failure to thrive (length -4.7 SD, weight -4.8 SD) despite adequate caloric intake by enteral tube feeding. At that time, a percutaneous endoscopic gastrostomy was placed because of swallowing difficulties and poor nutritional status. Normal testing included plasma lactate, urine lactate/creatinine ration, urine amino and organic acids, plasma amino acids, plasma biotinidase activity, CDG screening, lysosomal disorder screening, karyotype, and a search for mutations in *SLC19A3*, the gene encoding for the thiamine transporter. Fortuitously, plasma levels of thyroid hormones were increased in the blood because of the existence of familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia.

Brain MRI performed at age 9 months showed mild brain atrophy with normal myelination. Subsequent brain MRI at age 5 years showed a severe cortical atrophy with a thin corpus callosum and a cerebellar atrophy without brainstem anomalies (Figure 1B, e,j).



## Figure S1. Sequence Alignment of *UBA5*

### p.Met57Val

HUMAN	RIEKMSSEVVDSNPYSRL <b>M</b> ALKRMGIVSDYEKIRTF
ORANGUTANG	RIEKMSSEVVDSNPYSRL <b>M</b> ALKRMGIVSDYEKIRTF
MOUSE	RIQEMSDEVLDSDNPYSRL <b>M</b> ALKRMGIVSDYKKIRTYA
CHICKEN	RIETMSPEVTDSDNPYSRL <b>M</b> ALKRMGIVKDYEKIRTF
ZEBRAFISH	KIEQMSAEVVDSNPYSRL <b>M</b> ALKRMGIVQDYEKIRSFA
C-ELEGANS	KIEKLSAEVVDSNPYSRL <b>M</b> ALQRMGIVNEYERIREKT

### p.Gly168Glu

HUMAN	NITTVENFQHFMDRIS- <b>N</b> GGLEEGKPVLDLVLSCVDNF
ORANGUTANG	NITTVENFQHFMDRIS- <b>N</b> GGLEEGKPVLDLVLSCVDNF
MOUSE	NITTVHEHFEHFMDRIS- <b>N</b> GGLEEGQPVLDLVLSCVDNF
CHICKEN	NITTLDNFEHFMDRIS- <b>N</b> GALEEGKPVLDLVLSCVDNF
ZEBRAFISH	NITTMDFNFTHFMDRVRYH <b>G</b> GGLEEGKPVLDLILSCVDNF
C-ELEGANS	NITTMDFNFDTFVNRIR- <b>K</b> GSLTDG-KIDLVLSCVDNF

### p.Val126Met

HUMAN	KTLKREGVCAASLPTTM <b>G</b> VVAGILVQNVLKFLNFGT
ORANGUTANG	KSLKREGVCAASLPTTM <b>G</b> VVAGILVQNVLKFLNFGT
MOUSE	KTLKREGVCAASLPTTM <b>G</b> VVAGILVQNVLKFLKFGT
CHICKEN	KTLKREGVCAASLPTTM <b>G</b> VVAGILVQNVLYFLLNFGT
ZEBRAFISH	KTLKRDGVCAASLPTTM <b>G</b> VVAGLLVQNVLYFLLGFGT
C-ELEGANS	RTLKRDGVCAASLPTTMA <b>V</b> VAGFLVMNVLYFLLNFGT

### p.Ala371Thr

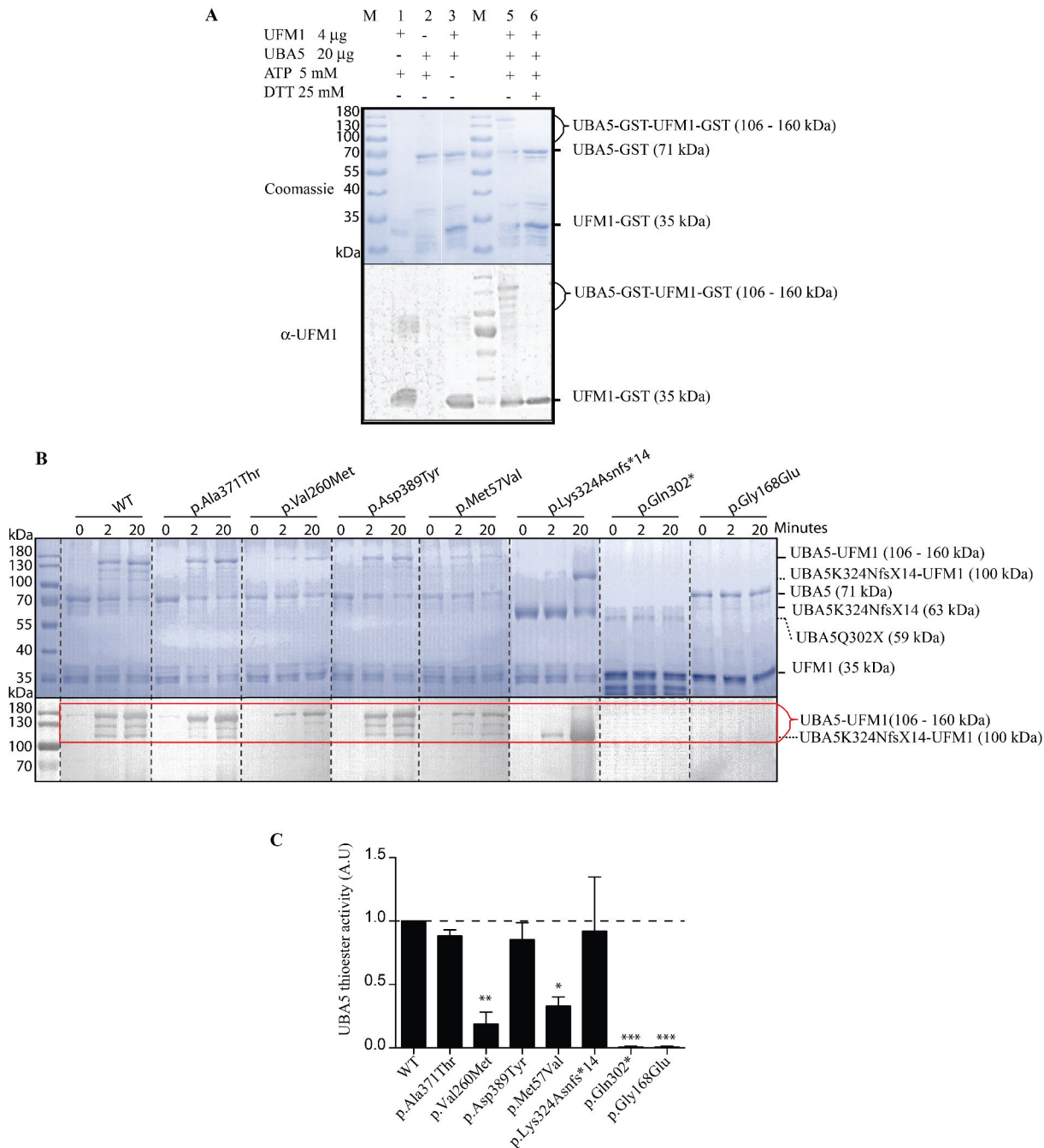
HUMAN	ELKNFSGPVPDLPEGITV <b>A</b> YTI PKKQEDSVTELTVED
ORANGUTANG	ELKNSSGPVPDLPEGITV <b>A</b> YTI PKKQEDSVTEVTVED
MOUSE	ELKNSSGPVPTLPEGITV <b>A</b> YTVPKKTEDSASEVTVED
CHICKEN	ELKAASGPVPDLVPGITV <b>A</b> YTI PNKEENLTAETVAE
ZEBRAFISH	ELQDASGPI PDLPEGITV <b>A</b> YTI PEKDGG--GETVEE
C-ELEGANS	AEQSSS---LNAGTGLKF <b>A</b> YEPIKRDAQT--EL--SP

### p.Asp389Tyr

HUMAN	ITVAYTI PKKQEDSVTELTVEDSGESLE <b>D</b> LMAKMKNM
ORANGUTANG	ITVAYTI PKKQEDSVTEVTVEDSGESLE <b>D</b> LMAKMKNM
MOUSE	ITVAYTVPKKTEDSASEVTVEDSGESLE <b>D</b> LMARMKNM
CHICKEN	ITVAYTI PNKEENLTAETVAESEESLE <b>D</b> LMAKMRNL
ZEBRAFISH	ITVAYTI PEKDGG--GETVEETE <b>S</b> LE <b>E</b> LMQMCKM
C-ELEGANS	LKFAYEPIKRDAQT--EL--SPAQAATH <b>D</b> FMKSIKDK



**Figure S2: Biochemical Characterization of the Disease-Causing Mutations in UBA5 Protein using the Thioester Assay**



(A) **The thioester formation assay** was performed as described<sup>1</sup>. In the presence of ATP three bands containing UFM1-GST / UBA5-GST conjugates (range 106-160 kDa) were visible. They were excised and verified using MALDI/TOF mass spectrometry. The addition of DTT in the sample buffer led to the disappearance of these bands, confirming a thioester bond between the proteins. (B) **Time-dependent UFM1 activation assay**. UBA5-GST fusion proteins, each carrying one of the mutations of the affected families, were analyzed in a time-

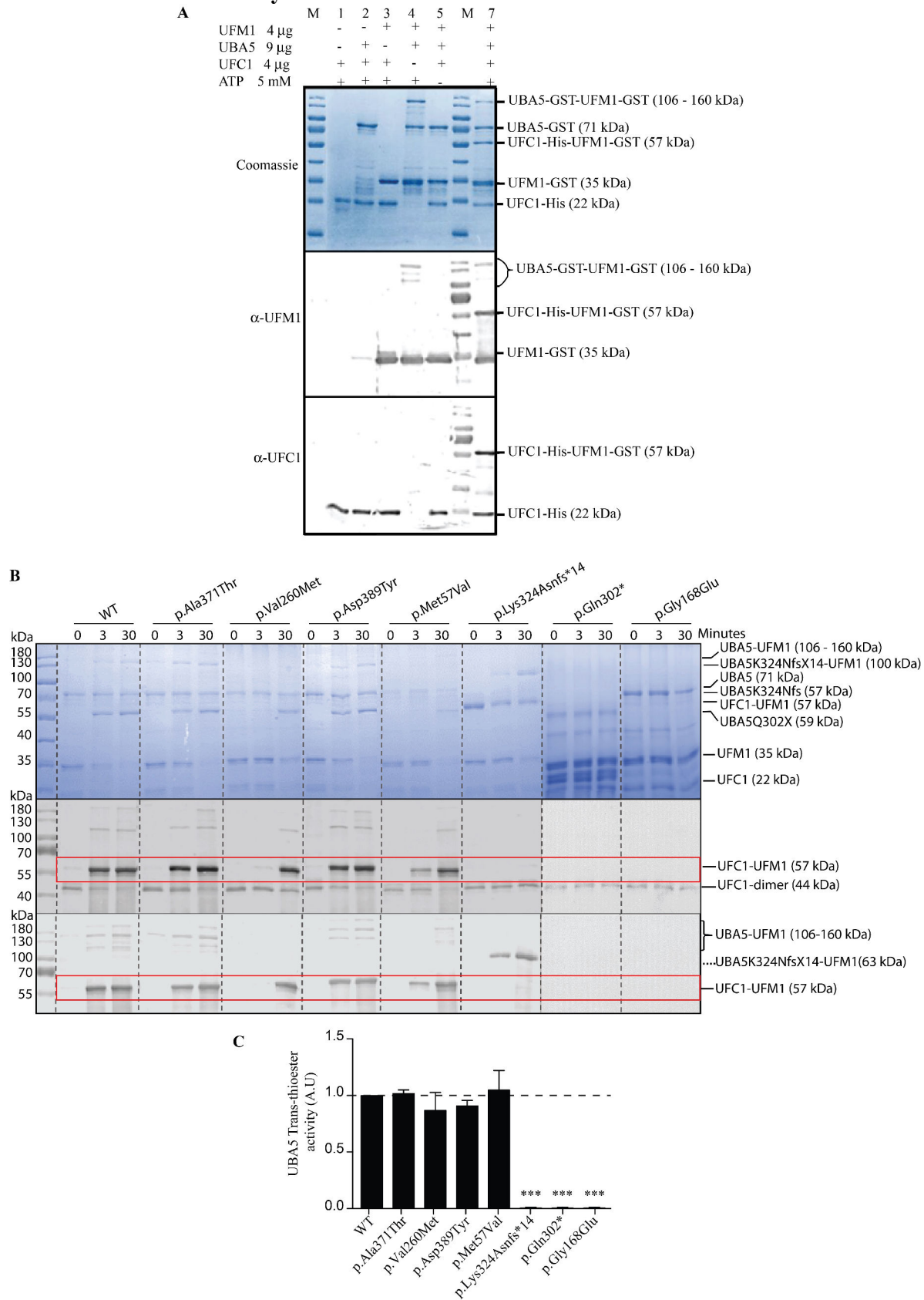


dependent (0, 2 and 20 min) *in vitro* thioester formation assay. Sample reactions were subjected to SDS-PAGE and analyzed by coomassie staining (top) and immunoblotting using anti-UFM1 (1:2000) (bottom). Singular UFM1-GST and UBA5-GST proteins and the formed intermediates are indicated on the right. Three bands appeared (range 106-130 kDa) as a result of the thioester formation, representing UBA5-UFM1 intermediates highlighted by the red box. While the assay with wildtype (WT) UBA5 protein resulted in one band during the first seconds (130 kDa, time 0) and three strong bands (range 106-130 kDa) after 2 minutes (no increase after 20 min), the p.Val260Met and the p.Met57Val proteins displayed a highly significant reduction of UFM1-UBA5 conjugates ( $p < 0.001$ ) after 2 and 20 min. The p.Ala371Thr and the p.Asp389Tyr protein did not display significant differences in the UFM1 activation compared to the wildtype protein. The frameshift mutation p.Lys324Asnfs\*14 showed a delayed activity ( $p < 0.001$ , t-test), but was comparable to the wildtype after 20 min. The p.Gln302\* and p.Gly168Glu proteins had no detectable thioester activity. (C) The thioester formation are observed after 20 minutes of incubation. Three independent experiments were used for quantification and statistical analyzes using One way ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison test, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .





**Figure S3: Biochemical Characterization of the Disease-Causing Mutations in UBA5 Protein using the Trans-Thioester Assay**

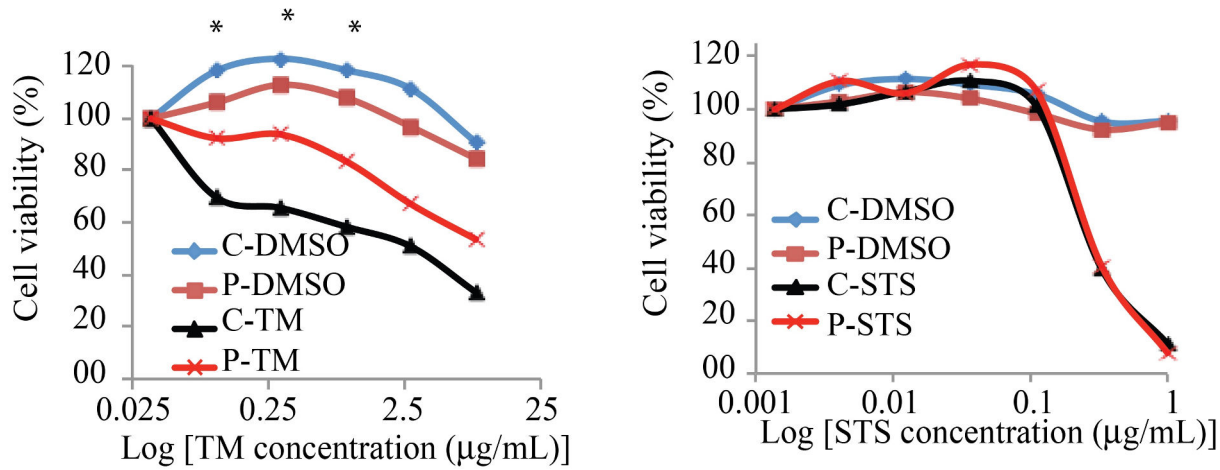




**(A) The trans-thioester assay** was performed as described<sup>1</sup>. In the presence of ATP, UFM1, UBA5 and UFC1, a band at 57 kDa containing UFM1-GST and UBA5-GST was observed additionally to the UFM1-GST / UBA5-GST conjugates at 106-160 kDa, therefore demonstrating trans-thioester activity of UBA5. **(B) Time-dependent UFM1 conjugation assay.** The UBA5-GST fusion proteins were analyzed in a time-dependent (0, 3 and 30 min) *in vitro* trans-thioester formation assay with UFC1. Sample reactions were subjected to SDS-PAGE and analyzed by coomassie staining (top) and immunoblotting using anti-UFM1 (1:2000) (middle), anti-UFC1 (1:10000) (bottom). Bands corresponding to singular UFM-GST, UBA5-GST and UFC-His as well as the intermediates are indicated on the right. Wildtype UBA5 was able to conjugate UFM1 to UFC1 within the first three minutes and the amount of conjugates did not increase significantly after 30 min. The p.Asp389Tyr, the p.Val260Met and the p.Met57Val proteins displayed a significantly reduced density of UFM1/UFC1 conjugate bands after 3 min ( $p < 0.05$ ), while no differences could be observed after 30 min. The conjugation activity of p.Asp389Tyr was not discernable from the wildtype protein. No conjugation activity was observed for the p.Gln302\*, p.Gly168Glu and the p.Lys324Asnfs\*14 proteins. **(C)** The trans-thioester formation are observed after 30 minutes of incubation. Three independent experiments were used for quantification and statistical analyzes using One way ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparaison test, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



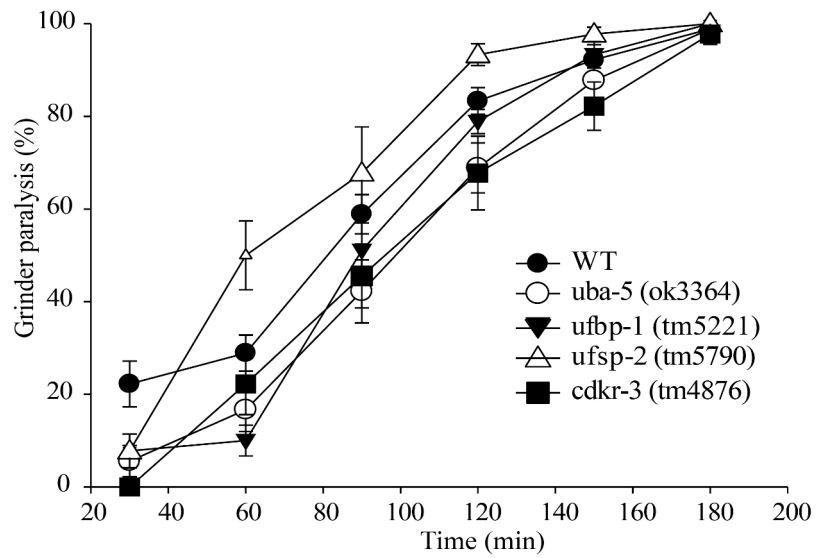
**Figure S4: UBA5 Mutant Fibroblasts Are Resistant to Tunicamycin**



Cell viability assay after treatment with tunicamycin (TM, left) and staurosporine (STS, right). At day 3, cell viability was determined using Prestoblu<sup>e</sup> Cell Viability reagent. DMSO was used as control in both TM and STS treatment. Abbreviations are as follow: C, wild type fibroblasts; P, *UBA5* mutant fibroblasts. Statistical analyzes: student t-test,  $p < 0.05$ .



**Figure S5: Neurological Characterization of *C. elegans* Strains Deleted for Genes Involved in Ufmylation**



Levamisole exposure motility assay (0.4 mM levamisole, 3 h) revealed no significant difference using ANOVA test in the forward movement ability between the UFM-1 cascade deletion mutants and the WT.





### 3. Autres publications en collaboration concernant la DI

#### ***De novo missense mutations in DHX30 impair global translation and cause a neurodevelopmental disorder.***

Davor Lessel, Claudia Schob, Sébastien Küry, Margot R.F. Reinders, Tamar Harel, Mohammad K. Eldomery, Zeynep Coban-Akdemir, Jonas Denecke, Shimon Edvardson, **Estelle Colin**, Alexander P.A. Stegmann, Erica H. Gerkes, Marine Tessarech, Dominique Bonneau, Magalie Barth, Thomas Besnard, Benjamin Cogné, Anya Revah-Politi, Tim M. Strom, Jill A. Rosenfeld, Yaping Yang, Jennifer E. Posey, LaDonna Immken, Nelly Oundjian, Katherine L. Helbig, Naomi Meeks, Kelsey Zegar, Jenny Morton, the DDD study, Jolanda H. Schieving, Ana Claasen, Matthew Huentelman, Vinodh Narayanan, Keri Ramsey, C4RCD Research Group, Han G. Brunner, Orly Elpeleg, Sandra Mercier, Stéphane Bézieau, Christian Kubisch, Tjitske Kleefstra, Stefan Kindler, James R. Lupski, Hans-Jürgen Kreienkamp.

#### ***Am J Hum Genet. Sous presse***

DHX30 is a member of the family of DExH-box helicases, which use ATP hydrolysis to unwind RNA secondary structures. Here we identified six different *de novo* missense mutations in DHX30 in twelve unrelated individuals affected by global developmental delay (GDD), intellectual disability (ID), severe speech impairment and gait abnormalities. While four mutations are recurrent, two are unique with one affecting the codon of one recurrent mutation. All amino acid changes are located within highly conserved helicase motifs, and were found to either impair ATPase activity or RNA recognition in different *in vitro* assays. Moreover, protein variants exhibit an increased propensity to trigger stress granule (SG) formation resulting in global translation inhibition. Thus, our findings highlight the prominent role of translation control in development and function of the central nervous system, and also provide molecular insight into how DHX30 dysfunction may cause a neurodevelopmental disorder.



## **De Novo Truncating Mutations in the kinetochore-Microtubules Attachment Gene CHAMP1 Cause Syndromic Intellectual Disability.**

Isidor B, Küry S, Rosenfeld JA, Besnard T, Schmitt S, Joss S, Davies SJ, Lebel RR, Henderson A, Schaaf CP, Streff HE, Yang Y, Jain V, Chida N, Latypova X, Le Caignec C, Cogné B, Mercier S, Vincent M, **Colin E**, Bonneau D, Denommé AS, Parent P<sup>10</sup>, Gilbert-Dussardier B, Odent S, Toutain A, Piton A, Dina C, Donnart A, Lindenbaum P, Charpentier E, Redon R, Iemura K, Ikeda M, Tanaka K, Bézieau S.

***Hum Mutat.* 2016 Apr;37(4):354-8.**

A rare syndromic form of intellectual disability with impaired speech was recently found associated with mutations in CHAMP1 (chromosome alignment-maintaining phosphoprotein 1), the protein product of which is directly involved in microtubule-kinetochore attachment. Through whole-exome sequencing in six unrelated nonconsanguineous families having a sporadic case of intellectual disability, we identified six novel de novo truncating mutations in CHAMP1: c.1880C>G p.(Ser627\*), c.1489C>T; p.(Arg497\*), c.1876\_1877delAG; p.(Ser626Leufs\*4), c.1043G>A; p.(Trp348\*), c.1002G>A; p.(Trp334\*), and c.958\_959delCC; p.(Pro320\*). Our clinical observations confirm the phenotypic homogeneity of the syndrome, which represents therefore a distinct clinical entity. Besides, our functional studies show that CHAMP1 protein variants are delocalized from chromatin and are unable to bind to two of its direct partners, POGZ and HP1. These data suggest a pathogenic mechanism of the CHAMP1-associated intellectual disability syndrome mediated by direct interacting partners of CHAMP1, several of which are involved in chromo/kinetochore-related disorders.



## **Karyotype is not dead (yet)!**

Pasquier L, Fradin M, Chérot E, Martin-Coignard D, **Colin E**, Journel H, Demurger F, Akloul L, Quélin C, Jauffret V, Lucas J, Belaud-Rotureau MA, Odent S, Jaillard S.

***Eur J Med Genet. 2016 Jan;59(1):11-5.***

**BACKGROUND:** While array-comparative genomic hybridization (a-CGH) and next-generation sequencing (NGS or exome) technologies have swiftly spread throughout the medical field, karyotype has gradually lost its leading role among genetic tests. Several international guidelines recommend starting with a-CGH screening then going on with exome analysis when investigating a patient with intellectual disability (ID) and no precise clinical diagnosis. A-CGH and whole exome sequencing increase etiologic diagnoses rate up to 30% in case of ID. However, physicians have to deal with the lack of qualitative information of the genome. Especially, exome and a-CGH analysis fail to detect chromosomal rearrangements because breakpoints are either located in introns or not associated with a gain or loss of genetic material. If these technologies cannot easily identify chromosomal translocations or inversions which sometimes split a gene, karyotype can.

**DISCUSSION:** For the 5 cases described, karyotype provided the right diagnosis for a Mendelian disease while molecular analysis remained unsuccessful. We conclude that when a Mendelian disease is strongly suggested clinically, if molecular analysis is normal, it could be very useful to carry out a karyotype in order to demonstrate a chromosomal rearrangement involving the targeted gene. If this gene is disrupted, the physician can confirm the suspected disease and give appropriate genetic counseling.

**SUMMARY:** This article aims at keeping in mind that karyotype, this old-fashioned genetic tool, can still remain powerful and useful within some genetic issues. Even in this modern period of whole exome sequencing, young geneticists should know that karyotype remains a powerful and cheap technology, available throughout the world and can still do a lot for families.



**A recurrent KCNQ2 pore mutation causing early onset epileptic encephalopathy has a moderate effect on M current but alters subcellular localization of Kv7 channels.**

Abidi A, Devaux JJ, Molinari F, Alcaraz G, Michon FX, Sutera-Sardo J, Becq H, Lacoste C, Altuzarra C, Afenjar A, Mignot C, Doummar D, Isidor B, Guyen SN, **Colin E**, De La Vaissière S, Haye D, Trauffler A, Badens C, Prieur F, Lesca G, Villard L, Milh M, Aniksztejn L.

**Neurobiol Dis. 2015 Aug;80:80-92.**

Mutations in the KCNQ2 gene encoding the voltage-dependent potassium M channel Kv7.2 subunit cause either benign epilepsy or early onset epileptic encephalopathy (EOEE). It has been proposed that the disease severity rests on the inhibitory impact of mutations on M current density. Here, we have analyzed the phenotype of 7 patients carrying the p.A294V mutation located on the S6 segment of the Kv7.2 pore domain (Kv7.2(A294V)). We investigated the functional and subcellular consequences of this mutation and compared it to another mutation (Kv7.2(A294G)) associated with a benign epilepsy and affecting the same residue. We report that all the patients carrying the p.A294V mutation presented the clinical and EEG characteristics of EOEE. In CHO cells, the total expression of Kv7.2(A294V) alone, assessed by western blotting, was only 20% compared to wild-type. No measurable current was recorded in CHO cells expressing Kv7.2(A294V) channel alone. Although the total Kv7.2(A294V) expression was rescued to wild-type levels in cells co-expressing the Kv7.3 subunit, the global current density was still reduced by 83% compared to wild-type heteromeric channel. In a configuration mimicking the patients' heterozygous genotype i.e., Kv7.2(A294V)/Kv7.2/Kv7.3, the global current density was reduced by 30%. In contrast to Kv7.2(A294V), the current density of homomeric Kv7.2(A294G) was not significantly changed compared to wild-type Kv7.2. However, the current density of Kv7.2(A294G)/Kv7.2/Kv7.3 and Kv7.2(A294G)/Kv7.3 channels were reduced by 30% and 50% respectively, compared to wild-type Kv7.2/Kv7.3. In neurons, the p.A294V mutation induced a mislocalization of heteromeric mutant channels to the somato-dendritic compartment, while the p.A294G mutation did not affect the localization of the heteromeric channels to the axon initial segment. We conclude that this position is a hotspot of mutation that can give rise to a severe or a benign epilepsy. The p.A294V mutation does not exert a dominant-negative effect on wild-type subunits but alters the preferential axonal targeting of heteromeric Kv7 channels. Our data suggest that the disease severity is not necessarily a consequence of a strong inhibition of M current and that additional mechanisms such as abnormal subcellular distribution of Kv7 channels could be determinant.





**Variable clinical expression in patients with mosaicism for KCNQ2 mutations.**

Milh M, Lacoste C, Cacciagli P, Abidi A, Sutera-Sardo J, Tzelepis I, **Colin E**, Badens C, Afenjar A, Coeslier AD, Dailland T, Lesca G, Philip N, Villard L.

***Am J Med Genet A. 2015 Oct;167A(10):2314-8.***

Mutations in the KCNQ2 gene, encoding a potassium channel subunit, were reported in patients presenting epileptic phenotypes of varying severity. Patients affected by benign familial neonatal epilepsy (BFNE) are at the milder end of the spectrum, they are affected by early onset epilepsy but their subsequent neurological development is usually normal. Mutations causing BFNE are often inherited from affected parents. Early infantile epileptic encephalopathy type 7 (EIEE7) is at the other end of the severity spectrum and, although EIEE7 patients have early onset epilepsy too, their neurological development is impaired and they will present motor and intellectual deficiency. EIEE7 mutations occur de novo. Electrophysiological experiments suggested a correlation between the type of mutation and the severity of the disease but intra and interfamilial heterogeneity exist. Here, we describe the identification of KCNQ2 mutation carriers who had children affected with a severe epileptic phenotype, and found that these individuals were mosaic for the KCNQ2 mutation. These findings have important consequences for genetic counseling and indicate that neurological development can be normal in the presence of somatic mosaicism for a KCNQ2 mutation.



## **Efficient strategy for the molecular diagnosis of intellectual disability using targeted high-throughput sequencing.**

Redin C, Gérard B, Lauer J, Herenger Y, Muller J, Quartier A, Masurel-Paulet A, Willems M, Lesca G, El-Chehadeh S, Le Gras S, Vicaire S, Philipps M, Dumas M, Geoffroy V, Feger C, Haumesser N, Alembik Y, Barth M, Bonneau D, **Colin E**, Dollfus H, Doray B, Delrue MA, Drouin-Garraud V, Flori E, Fradin M, Francannet C, Goldenberg A, Lumbroso S, Mathieu-Dramard M, Martin-Coignard D, Lacombe D, Morin G, Polge A, Sukno S, Thauvin-Robinet C, Thevenon J, Doco-Fenzy M, Genevieve D, Sarda P, Edery P, Isidor B, Jost B, Olivier-Faivre L, Mandel JL, Piton A.

***J Med Genet.* 2014 Nov;*51(11):724-36.***

**BACKGROUND:** Intellectual disability (ID) is characterised by an extreme genetic heterogeneity. Several hundred genes have been associated to monogenic forms of ID, considerably complicating molecular diagnostics. Trio-exome sequencing was recently proposed as a diagnostic approach, yet remains costly for a general implementation.

**METHODS:** We report the alternative strategy of targeted high-throughput sequencing of 217 genes in which mutations had been reported in patients with ID or autism as the major clinical concern. We analysed 106 patients with ID of unknown aetiology following array-CGH analysis and other genetic investigations. Ninety per cent of these patients were males, and 75% sporadic cases.

**RESULTS:** We identified 26 causative mutations: 16 in X-linked genes (ATRX, CUL4B, DMD, FMR1, HCFC1, IL1RAPL1, IQSEC2, KDM5C, MAOA, MECP2, SLC9A6, SLC16A2, PHF8) and 10 de novo in autosomal-dominant genes (DYRK1A, GRIN1, MED13L, TCF4, RAI1, SHANK3, SLC2A1, SYNGAP1). We also detected four possibly causative mutations (eg, in NLGN3) requiring further investigations. We present detailed reasoning for assigning causality for each mutation, and associated patients' clinical information. Some genes were hit more than once in our cohort, suggesting they correspond to more frequent ID-associated conditions (KDM5C, MECP2, DYRK1A, TCF4). We highlight some unexpected genotype to phenotype correlations, with causative mutations being identified in genes associated to defined syndromes in patients deviating from the classic phenotype (DMD, TCF4, MECP2). We also bring additional supportive (HCFC1, MED13L) or unsupportive (SHROOM4, SRPX2) evidences for the implication of previous candidate genes or mutations in cognitive disorders.

**CONCLUSIONS:** With a diagnostic yield of 25% targeted sequencing appears relevant as a first intention test for the diagnosis of ID, but importantly will also contribute to a better understanding regarding the specific contribution of the many genes implicated in ID and autism.



**Early-onset Behr syndrome due to compound heterozygous mutations in OPA1.**

Bonneau D, **Colin E**, Oca F, Ferré M, Chevrollier A, Guéguen N, Desquirit-Dumas V, N'Guyen S, Barth M, Zanlonghi X, Rio M, Desguerre I, Barnerias C, Momtchilova M, Rodriguez D, Slama A, Lenaers G, Procaccio V, Amati-Bonneau P, Reynier P.

**Brain. 2014 Oct;137(Pt 10):e301.**

**Early-onset Behr syndrome due to compound heterozygous mutations in OPA1.**

**Systematic molecular and cytogenetic screening of 100 patients with marfanoid syndromes and intellectual disability.**

Callier P, Aral B, Hanna N, Lambert S, Dindy H, Ragon C, Payet M, Collod-Beroud G, Carmignac V, Delrue MA, Goizet C, Philip N, Busa T, Dulac Y, Missotte I, Sznajer Y, Toutain A, Francannet C, Megarbane A, Julia S, Edouard T, Sarda P, Amiel J, Lyonnet S, Cormier-Daire V, Gilbert B, Jacqueline A, Heron D, Collignon P, Lacombe D, Morice-Picard F, Jouk PS, Cusin V, Willems M, Sarrazin E, Amarof K, Coubes C, Addor MC, Journal H, **Colin E**, Khau Van Kien P, Baumann C, Leheup B, Martin-Coignard D, Doco-Fenzy M, Goldenberg A, Plessis G, Thevenon J, Pasquier L, Odent S, Vabres P, Huet F, Marle N, Mosca-Boidron AL, Mugneret F, Gauthier S, Binquet C, Thauvin-Robinet C, Jondeau G, Boileau C, Faivre L.

**Clin Genet. 2013 Dec;84(6):507-21.**

The association of marfanoid habitus (MH) and intellectual disability (ID) has been reported in the literature, with overlapping presentations and genetic heterogeneity. A hundred patients (71 males and 29 females) with a MH and ID were recruited. Custom-designed 244K array-CGH (Agilent®; Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) and MED12, ZDHHC9, UPF3B, FBN1, TGFBR1 and TGFBR2 sequencing analyses were performed. Eighty patients could be classified as isolated MH and ID: 12 chromosomal imbalances, 1 FBN1 mutation and 1 possibly pathogenic MED12 mutation were found (17%). Twenty patients could be classified as ID with other extra-skeletal features of the Marfan syndrome (MFS) spectrum: 4 pathogenic FBN1 mutations and 4 chromosomal imbalances were found (2 patients with both FBN1 mutation and chromosomal rearrangement) (29%). These results suggest either that there are more loci with genes yet to be discovered or that MH can also be a relatively non-specific feature of patients with ID. The search for aortic complications is mandatory even if MH is associated with ID since FBN1 mutations or rearrangements were found in some patients. The excess of males is in favour of the involvement of other X-linked genes. Although it was impossible to make a diagnosis in 80% of patients, these results will improve genetic counselling in families.



### **KIF7 mutations cause fetal hydrolethalus and acrocallosal syndromes.**

Putoux A, Thomas S, Coene KL, Davis EE, Alanay Y, Ogur G, Uz E, Buzas D, Gomes C, Patrier S, Bennett CL, Elkhartoufi N, Frison MH, Rigonnot L, Joyé N, Pruvost S, Utine GE, Boduroglu K, Nitschke P, Fertitta L, Thauvin-Robinet C, Munnich A, Cormier-Daire V, Hennekam R, **Colin E**, Akarsu NA, Bole-Feysot C, Cagnard N, Schmitt A, Goudin N, Lyonnet S, Encha-Razavi F, Siffroi JP, Winey M, Katsanis N, Gonzales M, Vekemans M, Beales PL, Attié-Bitach T.

***Nat Genet. 2011 Jun;43(6):601-6.***

KIF7, the human ortholog of *Drosophila* Costal2, is a key component of the Hedgehog signaling pathway. Here we report mutations in KIF7 in individuals with hydrolethalus and acrocallosal syndromes, two multiple malformation disorders with overlapping features that include polydactyly, brain abnormalities and cleft palate. Consistent with a role of KIF7 in Hedgehog signaling, we show deregulation of most GLI transcription factor targets and impaired GLI3 processing in tissues from individuals with KIF7 mutations. KIF7 is also a likely contributor of alleles across the ciliopathy spectrum, as sequencing of a diverse cohort identified several missense mutations detrimental to protein function. In addition, *in vivo* genetic interaction studies indicated that knockdown of KIF7 could exacerbate the phenotype induced by knockdown of other ciliopathy transcripts. Our data show the role of KIF7 in human primary cilia, especially in the Hedgehog pathway through the regulation of GLI targets, and expand the clinical spectrum of ciliopathies.





# Bibliographie

1. World Health Organization. The International Classification of Diseases – Tenth revision (ICD10). Geneva: World Health Organization. 1992.
2. World Health Organization. The International classification of functioning, disability and health (ICF). Geneva: World Health Organization. 2001.
3. Schalock, R. L., Borthwick-Duffy, S., Bradley, V. 1., Buntinx, W. E. M., Coulter, D. L., Craig, E. M., Gomez, S.C., Lachapelle, Y., Luckasson, R., Reeve, A, Shogren, K. A, Snell, M. E., Spreat, S., Tassé, M. 1., Thompson, 1. R., Verdugo-Alonso, M. A , Wehmeyer, M. L., Yeager, M. H. Intellectual Disability: Definition, Classification, and Systems of Supports [Internet]. American Association on Intellectual and Developmental Disabilities; 2010. Disponible sur: [http://www.aamr.org/content\\_100.cfm%3FnavID=21](http://www.aamr.org/content_100.cfm%3FnavID=21)
4. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5). Washington, DC: American Psychiatric Publishing.; 2013.
5. Kaufman, A. S., & Lichtenberger, E. O. Essentials of WISC-III and WPPSI-R assessment. New York, NY: Wiley; 2000.
6. Wechsler, D. Wechsler intelligence scale for children-fourth edition. San Antonio, TX: Psychological Corporation; 2003.
7. Benson N, Hulac DM, Kranzler JH. Independent examination of the Wechsler Adult Intelligence Scale-Fourth Edition (WAIS-IV): what does the WAIS-IV measure? *Psychol Assess.* 2010;22(1):121-30.
8. Sparrow S. S., Cicchetti D. V. & Balla D. A. Vineland-II: Vineland Adaptive Behavior Scales, 2nd edn. Pearson Assessments, Minneapolis, MN; 2005.
9. Harrison, P.; Oakland, T. Adaptive Behavior Assessment System—Second edition (ABAS-II). The Psychological Corporation. San Antonio, TX; 2003.
10. Kaufman L, Ayub M, Vincent JB. The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review. *J Neurodev Disord.* 2010;2(4):182-209.
11. Koskentausta T, Iivanainen M, Almqvist F. Psychiatric disorders in children with intellectual disability. *Nord J Psychiatry.* 2002;56(2):126-31.
12. Dekker MC, Koot HM. DSM-IV disorders in children with borderline to moderate intellectual disability. I: prevalence and impact. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2003;42(8):915-22.
13. Robertson J, Hatton C, Emerson E, Baines S. Prevalence of epilepsy among people with intellectual disabilities: A systematic review. *Seizure.* 2015;29:46-62.
14. Hormozdiari F, Penn O, Borenstein E, Eichler EE. The discovery of integrated gene networks for autism and related disorders. *Genome Res.* 2015;25(1):142-54.
15. Novarino G, Baek ST, Gleeson JG. The sacred disease: the puzzling genetics of epileptic disorders. *Neuron.* 2013;80(1):9-11.
16. Cristino AS, Williams SM, Hawi Z, An J-Y, Bellgrove MA, Schwartz CE, et al. Neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders represent an interconnected molecular system. *Mol Psychiatry.* 2014;19(3):294-301.



17. Vissers LELM, Gilissen C, Veltman JA. Genetic studies in intellectual disability and related disorders. *Nat Rev Genet.* 2016;17(1):9-18.
18. Harris, J. C. *Intellectual disability: Understanding its development, causes, classification, evaluation, and treatment.* Oxford University Press. New York; 2006. 42-98 p.
19. King, B. H., Toth, K. E., Hodapp, R. M., & Dykens, E. M. Intellectual disability. B. J. Sadock, V. A. Sadock, P. Ruiz (Eds.). Vol. *Comprehensive textbook of psychiatry.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009. 9th ed., p. 3444–3474.
20. Maulik PK, Mascarenhas MN, Mathers CD, Dua T, Saxena S. Prevalence of intellectual disability: a meta-analysis of population-based studies. *Res Dev Disabil.* 2011;32(2):419-36.
21. Drews CD, Yeargin-Allsopp M, Decouflé P, Murphy CC. Variation in the influence of selected sociodemographic risk factors for mental retardation. *Am J Public Health.* 1995;85(3):329-34.
22. Gustavson K-H. Prevalence and aetiology of congenital birth defects, infant mortality and mental retardation in Lahore, Pakistan: a prospective cohort study. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992. 2005;94(6):769-74.
23. Dave U, Shetty N, Mehta L. A community genetics approach to population screening in India for mental retardation--a model for developing countries. *Ann Hum Biol.* 2005;32(2):195-203.
24. Sheridan E, Wright J, Small N, Corry PC, Oddie S, Whibley C, et al. Risk factors for congenital anomaly in a multiethnic birth cohort: an analysis of the Born in Bradford study. *Lancet Lond Engl.* 2013;382(9901):1350-9.
25. Leonard H, Wen X. The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2002;8(3):117-34.
26. Katusic SK, Colligan RC, Beard CM, O'Fallon WM, Bergstralh EJ, Jacobsen SJ, et al. Mental retardation in a birth cohort, 1976-1980, Rochester, Minnesota. *Am J Ment Retard AJMR.* 1996;100(4):335-44.
27. Bradley EA, Thompson A, Bryson SE. Mental retardation in teenagers: prevalence data from the Niagara region, Ontario. *Can J Psychiatry Rev Can Psychiatr.* 2002;47(7):652-9.
28. Harripaul R, Vasli N, Mikhailov A, Rafiq MA, Mittal K, Windpassinger C, et al. Mapping autosomal recessive intellectual disability: combined microarray and exome sequencing identifies 26 novel candidate genes in 192 consanguineous families. *Mol Psychiatry.* 2017; [Epub ahead of print].
29. *Déficiences intellectuelles : Expertise collective – Synthèse et recommandations.* Expertise collective. Éditions EDP Sciences; 2016. 140 p.
30. McLaren J, Bryson SE. Review of recent epidemiological studies of mental retardation: prevalence, associated disorders, and etiology. *Am J Ment Retard AJMR.* 1987;92(3):243-54.
31. Bahi-Buisson N, Chelly J, des Portes V. [Update on the genetics of X-linked mental retardation]. *Rev Neurol (Paris).* 2006;162(10):952-63.



32. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, Text Revision. 4th ed. Washington: American Psychiatric Association; 2000.
33. Polder JJ, Meering WJ, Bonneux L, van der Maas PJ. Healthcare costs of intellectual disability in the Netherlands: a cost-of-illness perspective. *J Intellect Disabil Res JIDR*. 2002;46(Pt 2):168-78.
34. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Economic costs associated with mental retardation, cerebral palsy, hearing loss, and vision impairment--United States, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2004;53(3):57-9.
35. Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C, et al. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet A*. 2006;140(19):2063-74.
36. Faurisson E, Kole A, François. The voice of 12,000 patients. Experiences and expectations of rare disease patients on diagnosis and care in Europe. *EURORDIS – Rare Diseases Europe*. Christel Nourissier and Flaminia Macchia<sup>1</sup>; 2009.
37. Willemsen MH, Kleefstra T. Making headway with genetic diagnostics of intellectual disabilities. *Clin Genet*. 2014;85(2):101-10.
38. May PA, Gossage JP. Estimating the prevalence of fetal alcohol syndrome. A summary. *Alcohol Res Health J Natl Inst Alcohol Abuse Alcohol*. 2001;25(3):159-67.
39. Meador KJ, Baker G, Cohen MJ, Gaily E, Westerveld M. Cognitive/behavioral teratogenic effects of antiepileptic drugs. *Epilepsy Behav EB*. 2007;11(3):292-302.
40. Li ASW, Marikawa Y. Adverse effect of valproic acid on an in vitro gastrulation model entails activation of retinoic acid signaling. *Reprod Toxicol Elmsford N*. 2016;66:68-83.
41. Chiriboga CA, Brust JC, Bateman D, Hauser WA. Dose-response effect of fetal cocaine exposure on newborn neurologic function. *Pediatrics*. 1999;103(1):79-85.
42. Levy HL, Ghavami M. Maternal phenylketonuria: a metabolic teratogen. *Teratology*. 1996;53(3):176-84.
43. Salbaum JM, Kappen C. Neural tube defect genes and maternal diabetes during pregnancy. *Birt Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2010;88(8):601-11.
44. Boulet SL, Schieve LA, Boyle CA. Birth weight and health and developmental outcomes in US children, 1997-2005. *Matern Child Health J*. 2011;15(7):836-44.
45. Serenius F, Ewald U, Farooqi A, Fellman V, Hafström M, Hellgren K, et al. Neurodevelopmental Outcomes Among Extremely Preterm Infants 6.5 Years After Active Perinatal Care in Sweden. *JAMA Pediatr*. 2016;170(10):954-63.
46. Patel DR, Greydanus DE, Calles JL, Pratt HD. Developmental disabilities across the lifespan. *Dis--Mon DM*. 2010;56(6):304-97.
47. Ropers HH. Genetics of early onset cognitive impairment. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2010;11:161-87.
48. van Bokhoven H. Genetic and epigenetic networks in intellectual disabilities. *Annu Rev Genet*. 2011;45:81-104.



49. Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Thung DT, van de Vorst M, van Bon BWM, Willemsen MH, et al. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature*. 2014;511(7509):344-7.
50. van Karnebeek CDM, Jansweijer MCE, Leenders AGE, Offringa M, Hennekam RCM. Diagnostic investigations in individuals with mental retardation: a systematic literature review of their usefulness. *Eur J Hum Genet EJHG*. 2005;13(1):6-25.
51. Roizen NJ, Patterson D. Down's syndrome. *Lancet Lond Engl*. 2003;361(9365):1281-9.
52. Lejeune J, Turpin R, Gautier M. [Chromosomal diagnosis of mongolism]. *Arch Fr Pediatr*. 1959;16:962-3.
53. Hochstenbach R, van Binsbergen E, Engelen J, Nieuwint A, Polstra A, Poddighe P, et al. Array analysis and karyotyping: workflow consequences based on a retrospective study of 36,325 patients with idiopathic developmental delay in the Netherlands. *Eur J Med Genet*. 2009;52(4):161-9.
54. Flint J, Knight S. The use of telomere probes to investigate submicroscopic rearrangements associated with mental retardation. *Curr Opin Genet Dev*. 2003;13(3):310-6.
55. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet*. 1998;20(2):207-11.
56. Vissers LELM, de Vries BBA, Osoegawa K, Janssen IM, Feuth T, Choy CO, et al. Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum Genet*. 2003;73(6):1261-70.
57. Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, Rio M, Willatt L, Fiegler H, et al. Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J Med Genet*. 2004;41(4):241-8.
58. Schoumans J, Ruivenkamp C, Holmberg E, Kyllerman M, Anderlid B-M, Nordenskjöld M. Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic mental retardation by array based comparative genomic hybridisation (array-CGH). *J Med Genet*. 2005;42(9):699-705.
59. Rosenberg C, Knijnenburg J, Bakker E, Vianna-Morgante AM, Sloos W, Otto PA, et al. Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. *J Med Genet*. 2006;43(2):180-6.
60. Aradhya S, Manning MA, Splendore A, Cherry AM. Whole-genome array-CGH identifies novel contiguous gene deletions and duplications associated with developmental delay, mental retardation, and dysmorphic features. *Am J Med Genet A*. 2007;143A(13):1431-41.
61. Baross A, Delaney AD, Li HI, Nayar T, Flibotte S, Qian H, et al. Assessment of algorithms for high throughput detection of genomic copy number variation in oligonucleotide microarray data. *BMC Bioinformatics*. 2007;8:368.
62. Fan Y-S, Jayakar P, Zhu H, Barbouth D, Sacharow S, Morales A, et al. Detection of pathogenic gene copy number variations in patients with mental retardation by





- genomewide oligonucleotide array comparative genomic hybridization. *Hum Mutat.* 2007;28(11):1124-32.
63. Shen Y, Irons M, Miller DT, Cheung SW, Lip V, Sheng X, et al. Development of a focused oligonucleotide-array comparative genomic hybridization chip for clinical diagnosis of genomic imbalance. *Clin Chem.* 2007;53(12):2051-9.
  64. Wagenstaller J, Spranger S, Lorenz-Depiereux B, Kazmierczak B, Nathrath M, Wahl D, et al. Copy-number variations measured by single-nucleotide-polymorphism oligonucleotide arrays in patients with mental retardation. *Am J Hum Genet.* 2007;81(4):768-79.
  65. Zhang F, Gu W, Hurles ME, Lupski JR. Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2009;10:451-81.
  66. Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, Rosenfeld JA, Vu TH, Baker C, et al. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet.* 2011;43(9):838-46.
  67. Coe BP, Witherspoon K, Rosenfeld JA, van Bon BWM, Vulto-van Silfhout AT, Bosco P, et al. Refining analyses of copy number variation identifies specific genes associated with developmental delay. *Nat Genet.* 2014;46(10):1063-71.
  68. Girirajan S, Rosenfeld JA, Coe BP, Parikh S, Friedman N, Goldstein A, et al. Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants. *N Engl J Med.* 2012;367(14):1321-31.
  69. 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;86(5):749-64.
  70. J. Andrieux, M. Beri, M. Doco-Fenzy, J.M. Dupont, A. Labalme, C. Metay, C. Rooryck-Thambo, D. Sanlaville. Analyse Chromosomique sur puce à ADN (ACPA): GUIDE DES BONNES PRATIQUES [Internet]. ACLF; 2010. Disponible sur: [http://www.eaclf.org/docs/ACPA/GBP\\_ACPA-v10.pdf](http://www.eaclf.org/docs/ACPA/GBP_ACPA-v10.pdf)
  71. Tommerup N. Mendelian cytogenetics. Chromosome rearrangements associated with mendelian disorders. *J Med Genet.* 1993;30(9):713-27.
  72. Wirth J, Nothwang HG, van der Maarel S, Menzel C, Borck G, Lopez-Pajares I, et al. Systematic characterisation of disease associated balanced chromosome rearrangements by FISH: cytogenetically and genetically anchored YACs identify microdeletions and candidate regions for mental retardation genes. *J Med Genet.* 1999;36(4):271-8.
  73. Bugge M, Bruun-Petersen G, Brøndum-Nielsen K, Friedrich U, Hansen J, Jensen G, et al. Disease associated balanced chromosome rearrangements: a resource for large scale genotype-phenotype delineation in man. *J Med Genet.* 2000;37(11):858-65.
  74. Vissers LELM, van Ravenswaaij CMA, Admiraal R, Hurst JA, de Vries BBA, Janssen IM, et al. Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nat Genet.* 2004;36(9):955-7.
  75. Vissers LELM, Veltman JA, van Kessel AG, Brunner HG. Identification of disease genes by whole genome CGH arrays. *Hum Mol Genet.* 2005;14 Spec No. 2:R215-223.



76. Emanuel BS, Zackai EH, Tucker SH. Further evidence for Xp21 location of Duchenne muscular dystrophy (DMD) locus: X;9 translocation in a female with DMD. *J Med Genet.* 1983;20(6):461-3.
77. Ray PN, Belfall B, Duff C, Logan C, Kean V, Thompson MW, et al. Cloning of the breakpoint of an X;21 translocation associated with Duchenne muscular dystrophy. *Nature.* 1985;318(6047):672-5.
78. Amiel J, Rio M, de Pontual L, Redon R, Malan V, Boddaert N, et al. Mutations in TCF4, encoding a class I basic helix-loop-helix transcription factor, are responsible for Pitt-Hopkins syndrome, a severe epileptic encephalopathy associated with autonomic dysfunction. *Am J Hum Genet.* 2007;80(5):988-93.
79. Zweier C, Peippo MM, Hoyer J, Sousa S, Bottani A, Clayton-Smith J, et al. Haploinsufficiency of TCF4 causes syndromal mental retardation with intermittent hyperventilation (Pitt-Hopkins syndrome). *Am J Hum Genet.* 2007;80(5):994-1001.
80. Harripaul R, Noor A, Ayub M, Vincent JB. The Use of Next-Generation Sequencing for Research and Diagnostics for Intellectual Disability. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017;7(3).
81. Musante L, Ropers HH. Genetics of recessive cognitive disorders. *Trends Genet TIG.* 2014;30(1):32-9.
82. Coffee B, Keith K, Albizua I, Malone T, Mowrey J, Sherman SL, et al. Incidence of fragile X syndrome by newborn screening for methylated FMR1 DNA. *Am J Hum Genet.* 2009;85(4):503-14.
83. Lubs, H. A. A marker X chromosome. *Am J Hum Genet.* 1969;231-244.
84. Lubs HA, Stevenson RE, Schwartz CE. Fragile X and X-linked intellectual disability: four decades of discovery. *Am J Hum Genet.* 2012;90(4):579-90.
85. Ropers H-H, Hamel BCJ. X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet.* 2005;6(1):46-57.
86. Tarpey PS, Smith R, Pleasance E, Whibley A, Edkins S, Hardy C, et al. A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. *Nat Genet.* 2009;41(5):535-43.
87. Molinari F, Rio M, Meskenaitė V, Encha-Razavi F, Augé J, Bacq D, et al. Truncating neurotrophin mutation in autosomal recessive nonsyndromic mental retardation. *Science.* 2002;298(5599):1779-81.
88. Higgins JJ, Pucilowska J, Lombardi RQ, Rooney JP. A mutation in a novel ATP-dependent Lon protease gene in a kindred with mild mental retardation. *Neurology.* 2004;63(10):1927-31.
89. Basel-Vanagaite L, Attia R, Yahav M, Ferland RJ, Anteki L, Walsh CA, et al. The CC2D1A, a member of a new gene family with C2 domains, is involved in autosomal recessive non-syndromic mental retardation. *J Med Genet.* 2006;43(3):203-10.
90. Hamamy H. Consanguineous marriages: Preconception consultation in primary health care settings. *J Community Genet.* 2012;3(3):185-92.
91. Saadat M. Association between healthy life expectancy at birth and consanguineous marriages in 63 countries. *J Biosoc Sci.* 2011;43(4):475-80.



92. Hussain R, Bittles AH. The prevalence and demographic characteristics of consanguineous marriages in Pakistan. *J Biosoc Sci.* 1998;30(2):261-75.
93. Najmabadi H, Motazacker MM, Garshasbi M, Kahrizi K, Tzschach A, Chen W, et al. Homozygosity mapping in consanguineous families reveals extreme heterogeneity of non-syndromic autosomal recessive mental retardation and identifies 8 novel gene loci. *Hum Genet.* 2007;121(1):43-8.
94. Modell B, Darr A. Science and society: genetic counselling and customary consanguineous marriage. *Nat Rev Genet.* 2002;3(3):225-9.
95. Kuss AW, Garshasbi M, Kahrizi K, Tzschach A, Behjati F, Darvish H, et al. Autosomal recessive mental retardation: homozygosity mapping identifies 27 single linkage intervals, at least 14 novel loci and several mutation hotspots. *Hum Genet.* 2011;129(2):141-8.
96. Abou Jamra R, Wohlfart S, Zweier M, Uebe S, Priebe L, Ekici A, et al. Homozygosity mapping in 64 Syrian consanguineous families with non-specific intellectual disability reveals 11 novel loci and high heterogeneity. *Eur J Hum Genet EJHG.* 2011;19(11):1161-6.
97. Schuurs-Hoeijmakers JHM, Hehir-Kwa JY, Pfundt R, van Bon BWM, de Leeuw N, Kleefstra T, et al. Homozygosity mapping in outbred families with mental retardation. *Eur J Hum Genet EJHG.* 2011;19(5):597-601.
98. Najmabadi H, Hu H, Garshasbi M, Zemojtel T, Abedini SS, Chen W, et al. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature.* 2011;478(7367):57-63.
99. Çalışkan M, Chong JX, Uricchio L, Anderson R, Chen P, Sougnez C, et al. Exome sequencing reveals a novel mutation for autosomal recessive non-syndromic mental retardation in the *TECR* gene on chromosome 19p13. *Hum Mol Genet.* 2011;20(7):1285-9.
100. Kahrizi K, Hu CH, Garshasbi M, Abedini SS, Ghadami S, Kariminejad R, et al. Next generation sequencing in a family with autosomal recessive Kahrizi syndrome (OMIM 612713) reveals a homozygous frameshift mutation in *SRD5A3*. *Eur J Hum Genet EJHG.* 2011;19(1):115-7.
101. Hussain MS, Baig SM, Neumann S, Nürnberg G, Farooq M, Ahmad I, et al. A truncating mutation of *CEP135* causes primary microcephaly and disturbed centrosomal function. *Am J Hum Genet.* 2012;90(5):871-8.
102. Hansen L, Tawamie H, Murakami Y, Mang Y, ur Rehman S, Buchert R, et al. Hypomorphic mutations in *PGAP2*, encoding a GPI-anchor-remodeling protein, cause autosomal-recessive intellectual disability. *Am J Hum Genet.* 2013;92(4):575-83.
103. Saar K, Al-Gazali L, Sztriha L, Rueschendorf F, Nur-E-Kamal M, Reis A, et al. Homozygosity mapping in families with Joubert syndrome identifies a locus on chromosome 9q34.3 and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet.* 1999;65(6):1666-71.
104. Iqbal Z, Shahzad M, Vissers LELM, van Scherpenzeel M, Gilissen C, Razzaq A, et al. A compound heterozygous mutation in *DPAGT1* results in a congenital disorder of glycosylation with a relatively mild phenotype. *Eur J Hum Genet EJHG.* 2013;21(8):844-9.



105. de Ligt J, Willemsen MH, van Bon BWM, Kleefstra T, Yntema HG, Kroes T, et al. Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N Engl J Med.* 2012;367(20):1921-9.
106. Rauch A, Wieczorek D, Graf E, Wieland T, Ende S, Schwarzmayr T, et al. Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. *Lancet Lond Engl.* 2012;380(9854):1674-82.
107. Hildebrandt F, Heeringa SF, Rüschenhoff F, Attanasio M, Nürnberg G, Becker C, et al. A systematic approach to mapping recessive disease genes in individuals from outbred populations. *PLoS Genet.* 2009;5(1):e1000353.
108. Hildebrandt F, Attanasio M, Otto E. Nephronophthisis: disease mechanisms of a ciliopathy. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2009;20(1):23-35.
109. Abd El-Aziz MM, Barragan I, O'Driscoll CA, Goodstadt L, Prigmore E, Borrego S, et al. EYS, encoding an ortholog of *Drosophila* spacemaker, is mutated in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat Genet.* 2008;40(11):1285-7.
110. Collin RWJ, Littink KW, Klevering BJ, van den Born LI, Koenekoop RK, Zonneveld MN, et al. Identification of a 2 Mb human ortholog of *Drosophila* eyes shut/spacemaker that is mutated in patients with retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet.* 2008;83(5):594-603.
111. Ten Kate LP, Teeuw M, Henneman L, Cornel MC. Autosomal recessive disease in children of consanguineous parents: inferences from the proportion of compound heterozygotes. *J Community Genet.* 2010;1(1):37-40.
112. Vissers LELM, de Ligt J, Gilissen C, Janssen I, Steehouwer M, de Vries P, et al. A de novo paradigm for mental retardation. *Nat Genet.* 2010;42(12):1109-12.
113. Hamdan FF, Srour M, Capo-Chichi J-M, Daoud H, Nassif C, Patry L, et al. De novo mutations in moderate or severe intellectual disability. *PLoS Genet.* 2014;10(10):e1004772.
114. Deciphering Developmental Disorders Study. Prevalence and architecture of de novo mutations in developmental disorders. *Nature.* 23 2017;542(7642):433-8.
115. Lynch M. Rate, molecular spectrum, and consequences of human mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(3):961-8.
116. Roach JC, Glusman G, Smit AFA, Huff CD, Hubble R, Shannon PT, et al. Analysis of genetic inheritance in a family quartet by whole-genome sequencing. *Science.* 2010;328(5978):636-9.
117. Acuna-Hidalgo R, Veltman JA, Hoischen A. New insights into the generation and role of de novo mutations in health and disease. *Genome Biol.* 2016;17(1):241.
118. Kong A, Frigge ML, Masson G, Besenbacher S, Sulem P, Magnusson G, et al. Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature.* 2012;488(7412):471-5.
119. Francioli LC, Polak PP, Koren A, Menelaou A, Chun S, Renkens I, et al. Genome-wide patterns and properties of de novo mutations in humans. *Nat Genet.* 2015;47(7):822-6.
120. Goldmann JM, Wong WSW, Pinelli M, Farrah T, Bodian D, Stittrich AB, et al. Parent-of-origin-specific signatures of de novo mutations. *Nat Genet.* 2016;48(8):935-9.





121. Hurst LD. Fundamental concepts in genetics: genetics and the understanding of selection. *Nat Rev Genet.* 2009;10(2):83-93.
122. Carvill GL, Mefford HC. Next-Generation Sequencing in Intellectual Disability. *J Pediatr Genet.* 2015;4(3):128-35.
123. Deciphering Developmental Disorders Study. Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders. *Nature.* 2015;519(7542):223-8.
124. Nelson B. Mental retardation and intellectual disability. In Vogul and Motulsky's *Human Genetics.* 4th ed. New York: ed. MR Speicher, SE Antonarakis, AG Motulsky, Springer; 2009.
125. Hamdan FF, Gauthier J, Spiegelman D, Noreau A, Yang Y, Pellerin S, et al. Mutations in SYNGAP1 in autosomal nonsyndromic mental retardation. *N Engl J Med.* 2009;360(6):599-605.
126. Hamdan FF, Piton A, Gauthier J, Lortie A, Dubeau F, Dobrzeniecka S, et al. De novo STXBP1 mutations in mental retardation and nonsyndromic epilepsy. *Ann Neurol.* 2009;65(6):748-53.
127. Hamdan FF, Gauthier J, Araki Y, Lin D-T, Yoshizawa Y, Higashi K, et al. Excess of de novo deleterious mutations in genes associated with glutamatergic systems in nonsyndromic intellectual disability. *Am J Hum Genet.* 2011;88(3):306-16.
128. Soellner L, Begemann M, Mackay DJG, Grønskov K, Tümer Z, Maher ER, et al. Recent Advances in Imprinting Disorders. *Clin Genet.* 2017;91(1):3-13.
129. Irizarry KA, Miller M, Freemark M, Haqq AM. Prader Willi Syndrome: Genetics, Metabolomics, Hormonal Function, and New Approaches to Therapy. *Adv Pediatr.* 2016;63(1):47-77.
130. Eggermann T, Perez de Nanclares G, Maher ER, Temple IK, Tümer Z, Monk D, et al. Imprinting disorders: a group of congenital disorders with overlapping patterns of molecular changes affecting imprinted loci. *Clin Epigenetics.* 2015;7:123.
131. Buiting K, Williams C, Horsthemke B. Angelman syndrome - insights into a rare neurogenetic disorder. *Nat Rev Neurol.* 2016;12(10):584-93.
132. Cooper DN, Chen J-M, Ball EV, Howells K, Mort M, Phillips AD, et al. Genes, mutations, and human inherited disease at the dawn of the age of personalized genomics. *Hum Mutat.* 2010;31(6):631-55.
133. Mundade R, Ozer HG, Wei H, Prabhu L, Lu T. Role of ChIP-seq in the discovery of transcription factor binding sites, differential gene regulation mechanism, epigenetic marks and beyond. *Cell Cycle Georget Tex.* 2014;13(18):2847-52.
134. Lupiáñez DG, Kraft K, Heinrich V, Krawitz P, Brancati F, Klopocki E, et al. Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell.* 2015;161(5):1012-25.
135. Perez-Pinera P, Kocak DD, Vockley CM, Adler AF, Kabadi AM, Polstein LR, et al. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat Methods.* 2013;10(10):973-6.
136. Furey TS. ChIP-seq and beyond: new and improved methodologies to detect and characterize protein-DNA interactions. *Nat Rev Genet.* 2012;13(12):840-52.



137. ENCODE Project Consortium. The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project. *Science*. 2004;306(5696):636-40.
138. ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. 2012;489(7414):57-74.
139. Ritchie GR, Flicek P. Computational approaches to interpreting genomic sequence variation. *Genome Med*. 2014;6(10):87.
140. Umlauf D. [The intimate genome... in three dimensions]. *Med Sci MS*. 2015;31(3):304-11.
141. Spielmann M, Mundlos S. Looking beyond the genes: the role of non-coding variants in human disease. *Hum Mol Genet*. 2016;25(R2):R157-65.
142. Krawczak M, Thomas NST, Hundrieser B, Mort M, Wittig M, Hampe J, et al. Single base-pair substitutions in exon-intron junctions of human genes: nature, distribution, and consequences for mRNA splicing. *Hum Mutat*. 2007;28(2):150-8.
143. Coulombe-Huntington J, Lam KCL, Dias C, Majewski J. Fine-scale variation and genetic determinants of alternative splicing across individuals. *PLoS Genet*. 2009;5(12):e1000766.
144. Ogino W, Takeshima Y, Nishiyama A, Okizuka Y, Yagi M, Tsuneishi S, et al. Mutation analysis of the ornithine transcarbamylase (OTC) gene in five Japanese OTC deficiency patients revealed two known and three novel mutations including a deep intronic mutation. *Kobe J Med Sci*. 2007;53(5):229-40.
145. Pros E, Gómez C, Martín T, Fábregas P, Serra E, Lázaro C. Nature and mRNA effect of 282 different NF1 point mutations: focus on splicing alterations. *Hum Mutat*. 2008;29(9):E173-193.
146. Dixon JR, Selvaraj S, Yue F, Kim A, Li Y, Shen Y, et al. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*. 2012;485(7398):376-80.
147. Rao SSP, Huntley MH, Durand NC, Stamenova EK, Bochkov ID, Robinson JT, et al. A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell*. 2014;159(7):1665-80.
148. Brussino A, Vaula G, Cagnoli C, Panza E, Seri M, Di Gregorio E, et al. A family with autosomal dominant leukodystrophy linked to 5q23.2-q23.3 without lamin B1 mutations. *Eur J Neurol*. 2010;17(4):541-9.
149. Giorgio E, Robyr D, Spielmann M, Ferrero E, Di Gregorio E, Imperiale D, et al. A large genomic deletion leads to enhancer adoption by the lamin B1 gene: a second path to autosomal dominant adult-onset demyelinating leukodystrophy (ADLD). *Hum Mol Genet*. 2015;24(11):3143-54.
150. van de Vondervoort IIGM, Gordebeke PM, Khoshab N, Tiesinga PHE, Buitelaar JK, Kozicz T, et al. Long non-coding RNAs in neurodevelopmental disorders. *Front Mol Neurosci*. 2013;6:53.
151. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-54.
152. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993;75(5):855-62.



153. Rajman M, Schratt G. MicroRNAs in neural development: from master regulators to fine-tuners. *Dev Camb Engl*. 2017;144(13):2310-22.
154. Sahoo T, del Gaudio D, German JR, Shinawi M, Peters SU, Person RE, et al. Prader-Willi phenotype caused by paternal deficiency for the HBII-85 C/D box small nucleolar RNA cluster. *Nat Genet*. 2008;40(6):719-21.
155. Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*. 1999;283(5407):1482-8.
156. A.W. El-Hattab, F. Scaglia. Mitochondrial disorders. In: *Inborn Errors of Metabolism: From Neonatal Screening to Metabolic Pathways*. oxford university press. new york: b. lee, f. scaglia; 2015. p. 180-202.
157. Poduri A, Evrony GD, Cai X, Walsh CA. Somatic mutation, genomic variation, and neurological disease. *Science*. 2013;341(6141):1237758.
158. McConnell MJ, Lindberg MR, Brennand KJ, Piper JC, Voet T, Cowing-Zitron C, et al. Mosaic copy number variation in human neurons. *Science*. 2013;342(6158):632-7.
159. Cai X, Evrony GD, Lehmann HS, Elhosary PC, Mehta BK, Poduri A, et al. Single-cell, genome-wide sequencing identifies clonal somatic copy-number variation in the human brain. *Cell Rep*. 2014;8(5):1280-9.
160. Gleeson JG, Minnerath S, Kuzniecky RI, Dobyns WB, Young ID, Ross ME, et al. Somatic and germline mosaic mutations in the doublecortin gene are associated with variable phenotypes. *Am J Hum Genet*. 2000;67(3):574-81.
161. Sicca F, Kelemen A, Genton P, Das S, Mei D, Moro F, et al. Mosaic mutations of the LIS1 gene cause subcortical band heterotopia. *Neurology*. 2003;61(8):1042-6.
162. Hu WF, Chahrour MH, Walsh CA. The diverse genetic landscape of neurodevelopmental disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2014;15:195-213.
163. Lee JH, Huynh M, Silhavy JL, Kim S, Dixon-Salazar T, Heiberg A, et al. De novo somatic mutations in components of the PI3K-AKT3-mTOR pathway cause hemimegalencephaly. *Nat Genet*. 2012;44(8):941-5.
164. Poduri A, Evrony GD, Cai X, Elhosary PC, Beroukheim R, Lehtinen MK, et al. Somatic activation of AKT3 causes hemispheric developmental brain malformations. *Neuron*. 2012;74(1):41-8.
165. Rivière J-B, Mirzaa GM, O'Roak BJ, Beddaoui M, Alcantara D, Conway RL, et al. De novo germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. *Nat Genet*. 2012;44(8):934-40.
166. Lim JS, Kim W, Kang H-C, Kim SH, Park AH, Park EK, et al. Brain somatic mutations in MTOR cause focal cortical dysplasia type II leading to intractable epilepsy. *Nat Med*. 2015;21(4):395-400.
167. Lim JS, Lee JH. Brain somatic mutations in MTOR leading to focal cortical dysplasia. *BMB Rep*. 2016;49(2):71-2.
168. Møller RS, Weckhuysen S, Chipaux M, Marsan E, Taly V, Bebin EM, et al. Germline and somatic mutations in the MTOR gene in focal cortical dysplasia and epilepsy. *Neurol Genet*. 2016;2(6):e118.
169. Crino PB. The mTOR signalling cascade: paving new roads to cure neurological disease. *Nat Rev Neurol*. 2016;12(7):379-92.



170. Gordo G, Tenorio J, Arias P, Santos-Simarro F, García-Miñaur S, Moreno JC, et al. mTOR mutations in Smith-Kingsmore syndrome: four additional patients and a review. *Clin Genet*. 2017; [Epub ahead of print].
171. Flores-Sarnat L, Sarnat HB, Dávila-Gutiérrez G, Alvarez A. Hemimegalencephaly: part 2. Neuropathology suggests a disorder of cellular lineage. *J Child Neurol*. 2003;18(11):776-85.
172. Gowda S, Salazar F, Bingaman WE, Kotagal P, Lachhwani DL, Gupta A, et al. Surgery for catastrophic epilepsy in infants 6 months of age and younger. *J Neurosurg Pediatr*. 2010;5(6):603-7.
173. Girirajan S, Rosenfeld JA, Cooper GM, Antonacci F, Siswara P, Itsara A, et al. A recurrent 16p12.1 microdeletion supports a two-hit model for severe developmental delay. *Nat Genet*. 2010;42(3):203-9.
174. Mefford HC, Sharp AJ, Baker C, Itsara A, Jiang Z, Buysse K, et al. Recurrent rearrangements of chromosome 1q21.1 and variable pediatric phenotypes. *N Engl J Med*. 2008;359(16):1685-99.
175. Sharp AJ, Mefford HC, Li K, Baker C, Skinner C, Stevenson RE, et al. A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures. *Nat Genet*. 2008;40(3):322-8.
176. Rice D, Barone S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect*. 2000;108 Suppl 3:511-33.
177. Lui JH, Hansen DV, Kriegstein AR. Development and evolution of the human neocortex. *Cell*. 2011;146(1):18-36.
178. Alcantara D, O'Driscoll M. Congenital microcephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2014;166C(2):124-39.
179. Nigg EA, Raff JW. Centrioles, centrosomes, and cilia in health and disease. *Cell*. 2009;139(4):663-78.
180. Bornens M. The centrosome in cells and organisms. *Science*. 2012;335(6067):422-6.
181. Mahmood S, Ahmad W, Hassan MJ. Autosomal Recessive Primary Microcephaly (MCPH): clinical manifestations, genetic heterogeneity and mutation continuum. *Orphanet J Rare Dis*. 2011;6:39.
182. O'Driscoll M, Jackson AP, Jeggo PA. Microcephalin: a causal link between impaired damage response signalling and microcephaly. *Cell Cycle Georget Tex*. 2006;5(20):2339-44.
183. Bilgüvar K, Oztürk AK, Louvi A, Kwan KY, Choi M, Tatli B, et al. Whole-exome sequencing identifies recessive WDR62 mutations in severe brain malformations. *Nature*. 2010;467(7312):207-10.
184. Nicholas AK, Khurshid M, Désir J, Carvalho OP, Cox JJ, Thornton G, et al. WDR62 is associated with the spindle pole and is mutated in human microcephaly. *Nat Genet*. 2010;42(11):1010-4.
185. Yu TW, Mochida GH, Tischfield DJ, Sgaier SK, Flores-Sarnat L, Sergi CM, et al. Mutations in WDR62, encoding a centrosome-associated protein, cause





- microcephaly with simplified gyri and abnormal cortical architecture. *Nat Genet.* 2010;42(11):1015-20.
186. Bond J, Roberts E, Mochida GH, Hampshire DJ, Scott S, Askham JM, et al. ASPM is a major determinant of cerebral cortical size. *Nat Genet.* 2002;32(2):316-20.
  187. Shen J, Eyaid W, Mochida GH, Al-Moayyad F, Bodell A, Woods CG, et al. ASPM mutations identified in patients with primary microcephaly and seizures. *J Med Genet.* 2005;42(9):725-9.
  188. Bond J, Roberts E, Springell K, Lizarraga SB, Lizarraga S, Scott S, et al. A centrosomal mechanism involving CDK5RAP2 and CENPJ controls brain size. *Nat Genet.* 2005;37(4):353-5.
  189. Kumar A, Girimaji SC, Duvvari MR, Blanton SH. Mutations in STIL, encoding a pericentriolar and centrosomal protein, cause primary microcephaly. *Am J Hum Genet.* 2009;84(2):286-90.
  190. Chen J-F, Zhang Y, Wilde J, Hansen KC, Lai F, Niswander L. Microcephaly disease gene Wdr62 regulates mitotic progression of embryonic neural stem cells and brain size. *Nat Commun.* 2014;5:3885.
  191. Jayaraman D, Kodani A, Gonzalez DM, Mancias JD, Mochida GH, Vagnoni C, et al. Microcephaly Proteins Wdr62 and Aspm Define a Mother Centriole Complex Regulating Centriole Biogenesis, Apical Complex, and Cell Fate. *Neuron.* 2016;92(4):813-28.
  192. Moon HM, Wynshaw-Boris A. Cytoskeleton in action: lissencephaly, a neuronal migration disorder. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2013;2(2):229-45.
  193. Wynshaw-Boris A, Pramparo T, Youn YH, Hirotsume S. Lissencephaly: mechanistic insights from animal models and potential therapeutic strategies. *Semin Cell Dev Biol.* oct 2010;21(8):823-30.
  194. Stouffer MA, Golden JA, Francis F. Neuronal migration disorders: Focus on the cytoskeleton and epilepsy. *Neurobiol Dis.* août 2016;92(Pt A):18-45.
  195. Fry AE, Cushion TD, Pilz DT. The genetics of lissencephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2014;166C(2):198-210.
  196. Johnston MV, Nishimura A, Harum K, Pekar J, Blue ME. Sculpting the developing brain. *Adv Pediatr.* 2001;48:1-38.
  197. Huttenlocher PR. Morphometric study of human cerebral cortex development. *Neuropsychologia.* 1990;28(6):517-27.
  198. Johnston MV. Clinical disorders of brain plasticity. *Brain Dev.* 2004;26(2):73-80.
  199. Li Z, Sheng M. Some assembly required: the development of neuronal synapses. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(11):833-41.
  200. Vaillend C, Poirier R, Laroche S. Genes, plasticity and mental retardation. *Behav Brain Res.* 2008;192(1):88-105.
  201. Kandel ER. Genes, synapses, and long-term memory. *J Cell Physiol.* 1997;173(2):124-5.



202. Citri A, Malenka RC. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol*. 2008;33(1):18-41.
203. Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*. 1973;232(2):331-56.
204. Malenka RC, Bear MF. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron*. 2004;44(1):5-21.
205. Turrigiano GG, Leslie KR, Desai NS, Rutherford LC, Nelson SB. Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature*. 1998;391(6670):892-6.
206. Huttenlocher PR. Dendritic development in neocortex of children with mental defect and infantile spasms. *Neurology*. 1974;24(3):203-10.
207. Purpura DP. Dendritic spine « dysgenesis » and mental retardation. *Science*. 1974;186(4169):1126-8.
208. Fiala JC, Spacek J, Harris KM. Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Res Brain Res Rev*. 2002;39(1):29-54.
209. Fromer M, Pocklington AJ, Kavanagh DH, Williams HJ, Dwyer S, Gormley P, et al. De novo mutations in schizophrenia implicate synaptic networks. *Nature*. 2014;506(7487):179-84.
210. De Rubeis S, He X, Goldberg AP, Poultney CS, Samocha K, Cicek AE, et al. Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature*. 2014;515(7526):209-15.
211. Grant SGN. Synaptopathies: diseases of the synaptome. *Curr Opin Neurobiol*. 2012;22(3):522-9.
212. Saheki Y, De Camilli P. Synaptic vesicle endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(9):a005645.
213. Mignogna ML, D'Adamo P. Critical importance of RAB proteins for synaptic function. *Small GTPases*. 2017;1-13.
214. Khan AR. Oligomerization of rab/effector complexes in the regulation of vesicle trafficking. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2013;117:579-614.
215. Bhui T, Roy JK. Rab proteins: the key regulators of intracellular vesicle transport. *Exp Cell Res*. 2014;328(1):1-19.
216. D'Adamo P, Masetti M, Bianchi V, Morè L, Mignogna ML, Giannandrea M, et al. RAB GTPases and RAB-interacting proteins and their role in the control of cognitive functions. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014;46 Pt 2:302-14.
217. D'Adamo P, Menegon A, Lo Nigro C, Grasso M, Gulisano M, Tamanini F, et al. Mutations in GDI1 are responsible for X-linked non-specific mental retardation. *Nat Genet*. 1998;19(2):134-9.
218. Bianchi V, Farisello P, Baldelli P, Meskenaite V, Milanese M, Vecellio M, et al. Cognitive impairment in Gdi1-deficient mice is associated with altered synaptic vesicle pools and short-term synaptic plasticity, and can be corrected by appropriate learning training. *Hum Mol Genet*. 2009;18(1):105-17.



219. Potokar M, Jorgačevski J, Lacovich V, Kreft M, Vardjan N, Bianchi V, et al. Impaired αGDI Function in the X-Linked Intellectual Disability: The Impact on Astroglia Vesicle Dynamics. *Mol Neurobiol*. 2017;54(4):2458-68.
220. Morris-Rosendahl DJ, Segel R, Born AP, Conrad C, Loeys B, Brooks SS, et al. New RAB3GAP1 mutations in patients with Warburg Micro Syndrome from different ethnic backgrounds and a possible founder effect in the Danish. *Eur J Hum Genet EJHG*. 2010;18(10):1100-6.
221. Handley MT, Morris-Rosendahl DJ, Brown S, Macdonald F, Hardy C, Bem D, et al. Mutation spectrum in RAB3GAP1, RAB3GAP2, and RAB18 and genotype-phenotype correlations in warburg micro syndrome and Martsolf syndrome. *Hum Mutat*. 2013;34(5):686-96.
222. Asahina M, Endoh Y, Matsubayashi T, Fukuda T, Ogata T. Novel RAB3GAP1 compound heterozygous mutations in Japanese siblings with Warburg Micro syndrome. *Brain Dev*. 2016;38(3):337-40.
223. Hughson FM. Neuroscience. Chaperones that SNARE neurotransmitter release. *Science*. 2013;339(6118):406-7.
224. Ma C, Su L, Seven AB, Xu Y, Rizo J. Reconstitution of the vital functions of Munc18 and Munc13 in neurotransmitter release. *Science*. 25 janv 2013;339(6118):421-5.
225. Saitsu H, Kato M, Mizuguchi T, Hamada K, Osaka H, Tohyama J, et al. De novo mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nat Genet*. 2008;40(6):782-8.
226. Di Meglio C, Lesca G, Villeneuve N, Lacoste C, Abidi A, Cacciagli P, et al. Epileptic patients with de novo STXBP1 mutations: Key clinical features based on 24 cases. *Epilepsia*. 2015;56(12):1931-40.
227. Gburek-Augustat J, Beck-Woedl S, Tzschach A, Bauer P, Schoening M, Riess A. Epilepsy is not a mandatory feature of STXBP1 associated ataxia-tremor-retardation syndrome. *Eur J Paediatr Neurol EJPN Off J Eur Paediatr Neurol Soc*. 2016;20(4):661-5.
228. Suri M, Evers JMG, Laskowski RA, O'Brien S, Baker K, Clayton-Smith J, et al. Protein structure and phenotypic analysis of pathogenic and population missense variants in STXBP1. *Mol Genet Genomic Med*. 2017;5(5):495-507.
229. Patzke C, Han Y, Covy J, Yi F, Maxeiner S, Wernig M, et al. Analysis of conditional heterozygous STXBP1 mutations in human neurons. *J Clin Invest*. 2015;125(9):3560-71.
230. Najm J, Horn D, Wimplinger I, Golden JA, Chizhikov VV, Sudi J, et al. Mutations of CASK cause an X-linked brain malformation phenotype with microcephaly and hypoplasia of the brainstem and cerebellum. *Nat Genet*. 2008;40(9):1065-7.
231. Hackett A, Tarpey PS, Licata A, Cox J, Whibley A, Boyle J, et al. CASK mutations are frequent in males and cause X-linked nystagmus and variable XLMR phenotypes. *Eur J Hum Genet EJHG*. 2010;18(5):544-52.
232. Bergmann C, Zerres K, Senderek J, Rudnik-Schoneborn S, Eggermann T, Häusler M, et al. Oligophrenin 1 (OPHN1) gene mutation causes syndromic X-linked mental retardation with epilepsy, rostral ventricular enlargement and cerebellar hypoplasia. *Brain J Neurol*. 2003;126(Pt 7):1537-44.



233. Al-Owain M, Kaya N, Al-Zaidan H, Al-Hashmi N, Al-Bakheet A, Al-Muhaizea M, et al. Novel intragenic deletion in OPHN1 in a family causing XLMR with cerebellar hypoplasia and distinctive facial appearance. *Clin Genet*. 2011;79(4):363-70.
234. Barone C, Bianca S, Luciano D, Di Benedetto D, Vinci M, Fichera M. Intragenic ILRAPL1 deletion in a male patient with intellectual disability, mild dysmorphic signs, deafness, and behavioral problems. *Am J Med Genet A*. 2013;161A(6):1381-5.
235. Piton A, Michaud JL, Peng H, Aradhya S, Gauthier J, Mottron L, et al. Mutations in the calcium-related gene IL1RAPL1 are associated with autism. *Hum Mol Genet*. 2008;17(24):3965-74.
236. Bayés A, van de Lagemaat LN, Collins MO, Croning MDR, Whittle IR, Choudhary JS, et al. Characterization of the proteome, diseases and evolution of the human postsynaptic density. *Nat Neurosci*. 2011;14(1):19-21.
237. Frank RA, Grant SG. Supramolecular organization of NMDA receptors and the postsynaptic density. *Curr Opin Neurobiol*. 2017;45:139-47.
238. Malinow R, Malenka RC. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*. 2002;25:103-26.
239. Wu Y, Arai AC, Rumbaugh G, Srivastava AK, Turner G, Hayashi T, et al. Mutations in ionotropic AMPA receptor 3 alter channel properties and are associated with moderate cognitive impairment in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(46):18163-8.
240. Coghlan S, Horder J, Inkster B, Mendez MA, Murphy DG, Nutt DJ. GABA system dysfunction in autism and related disorders: from synapse to symptoms. *Neurosci Biobehav Rev*. 2012;36(9):2044-55.
241. Chao H-T, Davids M, Burke E, Pappas JG, Rosenfeld JA, McCarty AJ, et al. A Syndromic Neurodevelopmental Disorder Caused by De Novo Variants in EBF3. *Am J Hum Genet*. 2017;100(1):128-37.
242. Moretto E, Murru L, Martano G, Sassone J, Passafaro M. Glutamatergic synapses in neurodevelopmental disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2017; [Epub ahead of print].
243. Hollmann M, Heinemann S. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci*. 1994;17:31-108.
244. Paoletti P, Bellone C, Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(6):383-400.
245. Gécz J, Barnett S, Liu J, Hollway G, Donnelly A, Eyre H, et al. Characterization of the human glutamate receptor subunit 3 gene (GRIA3), a candidate for bipolar disorder and nonspecific X-linked mental retardation. *Genomics*. 1999;62(3):356-68.
246. Chiyonobu T, Hayashi S, Kobayashi K, Morimoto M, Miyanomae Y, Nishimura A, et al. Partial tandem duplication of GRIA3 in a male with mental retardation. *Am J Med Genet A*. 2007;143A(13):1448-55.
247. Bonnet C, Leheup B, Béri M, Philippe C, Grégoire M-J, Jonveaux P. Aberrant GRIA3 transcripts with multi-exon duplications in a family with X-linked mental retardation. *Am J Med Genet A*. 2009;149A(6):1280-9.





248. Endele S, Rosenberger G, Geider K, Popp B, Tamer C, Stefanova I, et al. Mutations in GRIN2A and GRIN2B encoding regulatory subunits of NMDA receptors cause variable neurodevelopmental phenotypes. *Nat Genet.* 2010;42(11):1021-6.
249. Lemke JR, Hendrickx R, Geider K, Laube B, Schwake M, Harvey RJ, et al. GRIN2B mutations in West syndrome and intellectual disability with focal epilepsy. *Ann Neurol.* 2014;75(1):147-54.
250. Marwick K, Skehel P, Hardingham G, Wyllie D. Effect of a GRIN2A de novo mutation associated with epilepsy and intellectual disability on NMDA receptor currents and Mg(2+) block in cultured primary cortical neurons. *Lancet Lond Engl.* 2015;385 Suppl 1:S65.
251. Hu C, Chen W, Myers SJ, Yuan H, Traynelis SF. Human GRIN2B variants in neurodevelopmental disorders. *J Pharmacol Sci.* 2016;132(2):115-21.
252. Morisada N, Ioroi T, Taniguchi-Ikeda M, Juan Ye M, Okamoto N, Yamamoto T, et al. A 12p13 GRIN2B deletion is associated with developmental delay and macrocephaly. *Hum Genome Var.* 2016;3:16029.
253. Platzer K, Yuan H, Schütz H, Winschel A, Chen W, Hu C, et al. GRIN2B encephalopathy: novel findings on phenotype, variant clustering, functional consequences and treatment aspects. *J Med Genet.* 2017;54(7):460-70.
254. Coba MP, Pocklington AJ, Collins MO, Kopanitsa MV, Uren RT, Swamy S, et al. Neurotransmitters drive combinatorial multistate postsynaptic density networks. *Sci Signal.* 2009;2(68):ra19.
255. Li J, Zhang W, Yang H, Howrigan DP, Wilkinson B, Souaiaia T, et al. Spatiotemporal profile of postsynaptic interactomes integrates components of complex brain disorders. *Nat Neurosci.* 2017;20(8):1150-61.
256. Zheng C-Y, Seabold GK, Horak M, Petralia RS. MAGUKs, synaptic development, and synaptic plasticity. *Neurosci Rev J Bringing Neurobiol Neurol Psychiatry.* 2011;17(5):493-512.
257. Hayashi MK, Tang C, Verpelli C, Narayanan R, Stearns MH, Xu R-M, et al. The postsynaptic density proteins Homer and Shank form a polymeric network structure. *Cell.* 2009;137(1):159-71.
258. Kreienkamp H-J. Scaffolding proteins at the postsynaptic density: shank as the architectural framework. *Handb Exp Pharmacol.* 2008;(186):365-80.
259. Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P, Fauchereau F, et al. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet.* 2007;39(1):25-7.
260. Gauthier J, Champagne N, Lafrenière RG, Xiong L, Spiegelman D, Brustein E, et al. De novo mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 in patients ascertained for schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(17):7863-8.
261. Berkel S, Marshall CR, Weiss B, Howe J, Roeth R, Moog U, et al. Mutations in the SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation. *Nat Genet.* 2010;42(6):489-91.
262. Gong X, Jiang Y-W, Zhang X, An Y, Zhang J, Wu Y, et al. High proportion of 22q13 deletions and SHANK3 mutations in Chinese patients with intellectual disability. *PloS One.* 2012;7(4):e34739.



263. Redin C, Gérard B, Lauer J, Herenger Y, Muller J, Quartier A, et al. Efficient strategy for the molecular diagnosis of intellectual disability using targeted high-throughput sequencing. *J Med Genet*. 2014;51(11):724-36.
264. Leblond CS, Nava C, Polge A, Gauthier J, Huguet G, Lumbroso S, et al. Meta-analysis of SHANK Mutations in Autism Spectrum Disorders: a gradient of severity in cognitive impairments. *PLoS Genet*. 2014;10(9):e1004580.
265. Cochoy DM, Kolevzon A, Kajiwara Y, Schoen M, Pascual-Lucas M, Lurie S, et al. Phenotypic and functional analysis of SHANK3 stop mutations identified in individuals with ASD and/or ID. *Mol Autism*. 2015;6:23.
266. Hara M, Ohba C, Yamashita Y, Saitsu H, Matsumoto N, Matsuishi T. De novo SHANK3 mutation causes Rett syndrome-like phenotype in a female patient. *Am J Med Genet A*. 2015;167(7):1593-6.
267. Sala C, Vicidomini C, Bigi I, Mossa A, Verpelli C. Shank synaptic scaffold proteins: keys to understanding the pathogenesis of autism and other synaptic disorders. *J Neurochem*. 2015;135(5):849-58.
268. Terrone G, Vitiello G, Genesio R, D'Amico A, Imperati F, Ugga L, et al. A novel SHANK3 interstitial microdeletion in a family with intellectual disability and brain MRI abnormalities resembling Unidentified Bright Objects. *Eur J Paediatr Neurol EJPN Off J Eur Paediatr Neurol Soc*. 2017; [Epub ahead of print].
269. Louros SR, Osterweil EK. Perturbed proteostasis in autism spectrum disorders. *J Neurochem*. 2016;139(6):1081-92.
270. Bhakar AL, Dölen G, Bear MF. The pathophysiology of fragile X (and what it teaches us about synapses). *Annu Rev Neurosci*. 2012;35:417-43.
271. Darnell JC, Van Driesche SJ, Zhang C, Hung KYS, Mele A, Fraser CE, et al. FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. *Cell*. 2011;146(2):247-61.
272. Darnell JC, Klann E. The translation of translational control by FMRP: therapeutic targets for FXS. *Nat Neurosci*. 2013;16(11):1530-6.
273. Schmidt M, Finley D. Regulation of proteasome activity in health and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843(1):13-25.
274. Ehlers MD. Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nat Neurosci*. 2003;6(3):231-42.
275. Kishino T, Lalande M, Wagstaff J. UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nat Genet*. 1997;15(1):70-3.
276. Matsuura T, Sutcliffe JS, Fang P, Galjaard RJ, Jiang YH, Benton CS, et al. De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (UBE3A) in Angelman syndrome. *Nat Genet*. 1997;15(1):74-7.
277. Cooper EM, Hudson AW, Amos J, Wagstaff J, Howley PM. Biochemical analysis of Angelman syndrome-associated mutations in the E3 ubiquitin ligase E6-associated protein. *J Biol Chem*. 2004;279(39):41208-17.
278. Kühnle S, Mothes B, Matentzoglou K, Scheffner M. Role of the ubiquitin ligase E6AP/UBE3A in controlling levels of the synaptic protein Arc. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(22):8888-93.



279. Parnass Z, Tashiro A, Yuste R. Analysis of spine morphological plasticity in developing hippocampal pyramidal neurons. *Hippocampus*. 2000;10(5):561-8.
280. von Bohlen Und Halbach O. Structure and function of dendritic spines within the hippocampus. *Ann Anat Anat Anz Off Organ Anat Ges*. 2009;191(6):518-31.
281. von Bohlen Und Halbach O. Dendritic spine abnormalities in mental retardation. *Cell Tissue Res*. 2010;342(3):317-23.
282. Zito K, Knott G, Shepherd GMG, Shenolikar S, Svoboda K. Induction of spine growth and synapse formation by regulation of the spine actin cytoskeleton. *Neuron*. 2004;44(2):321-34.
283. Nadif Kasri N, Van Aelst L. Rho-linked genes and neurological disorders. *Pflugers Arch*. 2008;455(5):787-97.
284. Comery TA, Harris JB, Willems PJ, Oostra BA, Irwin SA, Weiler IJ, et al. Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(10):5401-4.
285. Nimchinsky EA, Oberlander AM, Svoboda K. Abnormal development of dendritic spines in FMR1 knock-out mice. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2001;21(14):5139-46.
286. McKinney BC, Grossman AW, Elisseou NM, Greenough WT. Dendritic spine abnormalities in the occipital cortex of C57BL/6 Fmr1 knockout mice. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet Off Publ Int Soc Psychiatr Genet*. 2005;136B(1):98-102.
287. Grossman AW, Elisseou NM, McKinney BC, Greenough WT. Hippocampal pyramidal cells in adult Fmr1 knockout mice exhibit an immature-appearing profile of dendritic spines. *Brain Res*. 2006;1084(1):158-64.
288. Lu R, Wang H, Liang Z, Ku L, O'donnell WT, Li W, et al. The fragile X protein controls microtubule-associated protein 1B translation and microtubule stability in brain neuron development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(42):15201-6.
289. Riederer BM. Microtubule-associated protein 1B, a growth-associated and phosphorylated scaffold protein. *Brain Res Bull*. 2007;71(6):541-58.
290. Chechlacz M, Gleeson JG. Is mental retardation a defect of synapse structure and function? *Pediatr Neurol*. 2003;29(1):11-7.
291. Aspenström P, Fransson A, Saras J. Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J*. 2004;377(Pt 2):327-37.
292. Newey SE, Velamoor V, Govek E-E, Van Aelst L. Rho GTPases, dendritic structure, and mental retardation. *J Neurobiol*. 2005;64(1):58-74.
293. Govek E-E, Hatten ME, Van Aelst L. The role of Rho GTPase proteins in CNS neuronal migration. *Dev Neurobiol*. 2011;71(6):528-53.
294. Martin-Vilchez S, Whitmore L, Asmussen H, Zareno J, Horwitz R, Newell-Litwa K. RhoGTPase Regulators Orchestrate Distinct Stages of Synaptic Development. *PLoS One*. 2017;12(1):e0170464.
295. Govek E-E, Newey SE, Akerman CJ, Cross JR, Van der Veken L, Van Aelst L. The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. *Nat Neurosci*. 2004;7(4):364-72.



296. Philip N, Chabrol B, Lossi A-M, Cardoso C, Guerrini R, Dobyns WB, et al. Mutations in the oligophrenin-1 gene (OPHN1) cause X linked congenital cerebellar hypoplasia. *J Med Genet.* 2003;40(6):441-6.
297. des Portes V, Boddaert N, Sacco S, Briault S, Maincent K, Bahi N, et al. Specific clinical and brain MRI features in mentally retarded patients with mutations in the Oligophrenin-1 gene. *Am J Med Genet A.* 2004;124A(4):364-71.
298. Zanni G, Saillour Y, Nagara M, Billuart P, Castelnaud L, Moraine C, et al. Oligophrenin 1 mutations frequently cause X-linked mental retardation with cerebellar hypoplasia. *Neurology.* 2005;65(9):1364-9.
299. Fauchereau F, Herbrand U, Chafey P, Eberth A, Koulakoff A, Vinet M-C, et al. The RhoGAP activity of OPHN1, a new F-actin-binding protein, is negatively controlled by its amino-terminal domain. *Mol Cell Neurosci.* 2003;23(4):574-86.
300. Nadif Kasri N, Nakano-Kobayashi A, Malinow R, Li B, Van Aelst L. The Rho-linked mental retardation protein oligophrenin-1 controls synapse maturation and plasticity by stabilizing AMPA receptors. *Genes Dev.* 2009;23(11):1289-302.
301. Nadif Kasri N, Nakano-Kobayashi A, Van Aelst L. Rapid synthesis of the X-linked mental retardation protein OPHN1 mediates mGluR-dependent LTD through interaction with the endocytic machinery. *Neuron.* 2011;72(2):300-15.
302. Rauen KA. The RASopathies. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2013;14:355-69.
303. Aoki Y, Niihori T, Inoue S, Matsubara Y. Recent advances in RASopathies. *J Hum Genet.* 2016;61(1):33-9.
304. Krab LC, Goorden SMI, Elgersma Y. Oncogenes on my mind: ERK and MTOR signaling in cognitive diseases. *Trends Genet TIG.* 2008;24(10):498-510.
305. Zhu JJ, Qin Y, Zhao M, Van Aelst L, Malinow R. Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell.* 2002;110(4):443-55.
306. Kim JH, Lee H-K, Takamiya K, Huganir RL. The role of synaptic GTPase-activating protein in neuronal development and synaptic plasticity. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2003;23(4):1119-24.
307. Thomas GM, Huganir RL. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci.* 2004;5(3):173-83.
308. Atkins CM, Selcher JC, Petraitis JJ, Trzaskos JM, Sweatt JD. The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci.* 1998;1(7):602-9.
309. Impey S, Obrietan K, Storm DR. Making new connections: role of ERK/MAP kinase signaling in neuronal plasticity. *Neuron.* 1999;23(1):11-4.
310. Kelleher RJ, Govindarajan A, Jung H-Y, Kang H, Tonegawa S. Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell.* 2004;116(3):467-79.
311. San Martín A, Pagani MR. Understanding intellectual disability through RASopathies. *J Physiol Paris.* 2014;108(4-6):232-9.
312. Costa RM, Federov NB, Kogan JH, Murphy GG, Stern J, Ohno M, et al. Mechanism for the learning deficits in a mouse model of neurofibromatosis type 1. *Nature.* 2002;415(6871):526-30.





313. Cui Y, Costa RM, Murphy GG, Elgersma Y, Zhu Y, Gutmann DH, et al. Neurofibromin regulation of ERK signaling modulates GABA release and learning. *Cell*. 2008;135(3):549-60.
314. Kushner SA, Elgersma Y, Murphy GG, Jaarsma D, van Woerden GM, Hojjati MR, et al. Modulation of presynaptic plasticity and learning by the H-ras/extracellular signal-regulated kinase/synapsin I signaling pathway. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2005;25(42):9721-34.
315. Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: regulation through repression. *Science*. 1999;286(5439):481-6.
316. Millan MJ. An epigenetic framework for neurodevelopmental disorders: from pathogenesis to potential therapy. *Neuropharmacology*. 2013;68:2-82.
317. Karpova NN, Sales AJ, Joca SR. Epigenetic Basis of Neuronal and Synaptic Plasticity. *Curr Top Med Chem*. 2017;17(7):771-93.
318. Globisch D, Münzel M, Müller M, Michalakis S, Wagner M, Koch S, et al. Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PLoS One*. 2010;5(12):e15367.
319. Moretti P, Zoghbi HY. MeCP2 dysfunction in Rett syndrome and related disorders. *Curr Opin Genet Dev*. 2006;16(3):276-81.
320. Illingworth RS, Bird AP. CpG islands--'a rough guide'. *FEBS Lett*. 2009;583(11):1713-20.
321. Fuks F. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Curr Opin Genet Dev*. 2005;15(5):490-5.
322. Dani VS, Chang Q, Maffei A, Turrigiano GG, Jaenisch R, Nelson SB. Reduced cortical activity due to a shift in the balance between excitation and inhibition in a mouse model of Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(35):12560-5.
323. Ballas N, Lioy DT, Grunseich C, Mandel G. Non-cell autonomous influence of MeCP2-deficient glia on neuronal dendritic morphology. *Nat Neurosci*. 2009;12(3):311-7.
324. Maezawa I, Swanberg S, Harvey D, LaSalle JM, Jin L-W. Rett syndrome astrocytes are abnormal and spread MeCP2 deficiency through gap junctions. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2009;29(16):5051-61.
325. Kishi N, Macklis JD. MECP2 is progressively expressed in post-migratory neurons and is involved in neuronal maturation rather than cell fate decisions. *Mol Cell Neurosci*. 2004;27(3):306-21.
326. Zhou Z, Hong EJ, Cohen S, Zhao W-N, Ho H-YH, Schmidt L, et al. Brain-specific phosphorylation of MeCP2 regulates activity-dependent Bdnf transcription, dendritic growth, and spine maturation. *Neuron*. 2006;52(2):255-69.
327. Abuhatzira L, Makedonski K, Kaufman Y, Razin A, Shemer R. MeCP2 deficiency in the brain decreases BDNF levels by REST/CoREST-mediated repression and increases TRKB production. *Epigenetics*. 2007;2(4):214-22.
328. Hara D, Fukuchi M, Miyashita T, Tabuchi A, Takasaki I, Naruse Y, et al. Remote control of activity-dependent BDNF gene promoter-I transcription mediated by REST/NRSF. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;384(4):506-11.



329. van Bokhoven H, Kramer JM. Disruption of the epigenetic code: an emerging mechanism in mental retardation. *Neurobiol Dis.* 2010;39(1):3-12.
330. Leal G, Comprido D, Duarte CB. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology.* 2014;76 Pt C:639-56.
331. Gabel HW, Kinde B, Stroud H, Gilbert CS, Harmin DA, Kastan NR, et al. Disruption of DNA-methylation-dependent long gene repression in Rett syndrome. *Nature.* 2015;522(7554):89-93.
332. Kleefstra T, Schenck A, Kramer JM, van Bokhoven H. The genetics of cognitive epigenetics. *Neuropharmacology.* 2014;80:83-94.
333. Hennekam RCM. Rubinstein-Taybi syndrome. *Eur J Hum Genet EJHG.* 2006;14(9):981-5.
334. Roelfsema JH, White SJ, Ariyürek Y, Bartholdi D, Niedrist D, Papadia F, et al. Genetic heterogeneity in Rubinstein-Taybi syndrome: mutations in both the CBP and EP300 genes cause disease. *Am J Hum Genet.* 2005;76(4):572-80.
335. Negri G, Milani D, Colapietro P, Forzano F, Della Monica M, Rusconi D, et al. Clinical and molecular characterization of Rubinstein-Taybi syndrome patients carrying distinct novel mutations of the EP300 gene. *Clin Genet.* 2015;87(2):148-54.
336. Lopez-Atalaya JP, Valor LM, Barco A. Epigenetic factors in intellectual disability: the Rubinstein-Taybi syndrome as a paradigm of neurodevelopmental disorder with epigenetic origin. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2014;128:139-76.
337. Kasper LH, Qu C, Obenauer JC, McGoldrick DJ, Brindle PK. Genome-wide and single-cell analyses reveal a context dependent relationship between CBP recruitment and gene expression. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(18):11363-82.
338. Bedford DC, Kasper LH, Fukuyama T, Brindle PK. Target gene context influences the transcriptional requirement for the KAT3 family of CBP and p300 histone acetyltransferases. *Epigenetics.* 2010;5(1):9-15.
339. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 2007;128(4):693-705.
340. Lopez-Atalaya JP, Gervasini C, Mottadelli F, Spina S, Piccione M, Scarano G, et al. Histone acetylation deficits in lymphoblastoid cell lines from patients with Rubinstein-Taybi syndrome. *J Med Genet.* 2012;49(1):66-74.
341. Goodman RH, Smolik S. CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev.* 2000;14(13):1553-77.
342. Wang J, Weaver ICG, Gauthier-Fisher A, Wang H, He L, Yeomans J, et al. CBP histone acetyltransferase activity regulates embryonic neural differentiation in the normal and Rubinstein-Taybi syndrome brain. *Dev Cell.* 2010;18(1):114-25.
343. Tanaka Y, Naruse I, Maekawa T, Masuya H, Shiroishi T, Ishii S. Abnormal skeletal patterning in embryos lacking a single Cbp allele: a partial similarity with Rubinstein-Taybi syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(19):10215-20.
344. Oike Y, Hata A, Mamiya T, Kaname T, Noda Y, Suzuki M, et al. Truncated CBP protein leads to classical Rubinstein-Taybi syndrome phenotypes in mice: implications for a dominant-negative mechanism. *Hum Mol Genet.* 1999;8(3):387-96.



345. Viosca J, Lopez-Atalaya JP, Olivares R, Eckner R, Barco A. Syndromic features and mild cognitive impairment in mice with genetic reduction on p300 activity: Differential contribution of p300 and CBP to Rubinstein-Taybi syndrome etiology. *Neurobiol Dis.* 2010;37(1):186-94.
346. Barco A. The Rubinstein-Taybi syndrome: modeling mental impairment in the mouse. *Genes Brain Behav.* 2007;6 Suppl 1:32-9.
347. Moeschler JB, Shevell M, American Academy of Pediatrics Committee on Genetics. Clinical genetic evaluation of the child with mental retardation or developmental delays. *Pediatrics.* 2006;117(6):2304-16.
348. Moeschler JB. Medical genetics diagnostic evaluation of the child with global developmental delay or intellectual disability. *Curr Opin Neurol.* 2008;21(2):117-22.
349. Moeschler JB, Shevell M, Committee on Genetics. Comprehensive evaluation of the child with intellectual disability or global developmental delays. *Pediatrics.* 2014;134(3):e903-918.
350. Srour M, Shevell M. Genetics and the investigation of developmental delay/intellectual disability. *Arch Dis Child.* 2014;99(4):386-9.
351. Wallace RA. Genetic testing of aetiology of intellectual disability in a dedicated physical healthcare outpatient clinic for adults with intellectual disability. *Intern Med J.* 2016;46(2):177-85.
352. Silove N, Collins F, Ellaway C. Update on the investigation of children with delayed development. *J Paediatr Child Health.* 2013;49(7):519-25.
353. Lion-François L, Cheillan D, Pitelet G, Acquaviva-Bourdain C, Bussy G, Cotton F, et al. High frequency of creatine deficiency syndromes in patients with unexplained mental retardation. *Neurology.* 2006;67(9):1713-4.
354. Caldeira Araújo H, Smit W, Verhoeven NM, Salomons GS, Silva S, Vasconcelos R, et al. Guanidinoacetate methyltransferase deficiency identified in adults and a child with mental retardation. *Am J Med Genet A.* 2005;133A(2):122-7.
355. Engbers HM, Berger R, van Hasselt P, de Koning T, de Sain-van der Velden MGM, Kroes HY, et al. Yield of additional metabolic studies in neurodevelopmental disorders. *Ann Neurol.* 2008;64(2):212-7.
356. van Karnebeek CDM, Stockler S. Treatable inborn errors of metabolism causing intellectual disability: a systematic literature review. *Mol Genet Metab.* 2012;105(3):368-81.
357. Makela NL, Birch PH, Friedman JM, Marra CA. Parental perceived value of a diagnosis for intellectual disability (ID): a qualitative comparison of families with and without a diagnosis for their child's ID. *Am J Med Genet A.* nov 2009;149A(11):2393-402.
358. Shevell M, Ashwal S, Donley D, Flint J, Gingold M, Hirtz D, et al. Practice parameter: evaluation of the child with global developmental delay: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and The Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology.* 11 févr 2003;60(3):367-80.
359. Galloway WH, Mowat AP. Congenital microcephaly with hiatus hernia and nephrotic syndrome in two sibs. *J Med Genet.* 1968;5(4):319-21.



360. Hinkes BG, Mucha B, Vlangos CN, Gbadegesin R, Liu J, Hasselbacher K, et al. Nephrotic syndrome in the first year of life: two thirds of cases are caused by mutations in 4 genes (NPHS1, NPHS2, WT1, and LAMB2). *Pediatrics*. 2007;119(4):e907-919.
361. Benoit G, Machuca E, Antignac C. Hereditary nephrotic syndrome: a systematic approach for genetic testing and a review of associated podocyte gene mutations. *Pediatr Nephrol Berl Ger*. 2010;25(9):1621-32.
362. Kambham N, Tanji N, Seigle RL, Markowitz GS, Pulkkinen L, Uitto J, et al. Congenital focal segmental glomerulosclerosis associated with beta4 integrin mutation and epidermolysis bullosa. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. 2000;36(1):190-6.
363. Zenker M, Aigner T, Wendler O, Tralau T, Müntefering H, Fenski R, et al. Human laminin beta2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities. *Hum Mol Genet*. 2004;13(21):2625-32.
364. Chernin G, Vega-Warner V, Schoeb DS, Heeringa SF, Ovunc B, Saisawat P, et al. Genotype/phenotype correlation in nephrotic syndrome caused by WT1 mutations. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 2010;5(9):1655-62.
365. Berkovic SF, Dibbens LM, Oshlack A, Silver JD, Katerelos M, Vears DF, et al. Array-based gene discovery with three unrelated subjects shows SCARB2/LIMP-2 deficiency causes myoclonus epilepsy and glomerulosclerosis. *Am J Hum Genet*. 2008;82(3):673-84.
366. Boerkoel CF, Takashima H, John J, Yan J, Stankiewicz P, Rosenbarker L, et al. Mutant chromatin remodeling protein SMARCAL1 causes Schimke immuno-osseous dysplasia. *Nat Genet*. 2002;30(2):215-20.
367. Robain O, Lyon G. [Familial microcephalies due to cerebral malformation. Anatomical and clinical study]. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1972;20(2):96-109.
368. Shapiro LR, Duncan PA, Farnsworth PB, Lefkowitz M. Congenital microcephaly, hiatus hernia and nephrotic syndrome: an autosomal recessive syndrome. *Birth Defects Orig Artic Ser*. 1976;12(5):275-8.
369. Metzke H, Brömme W. [Congenital microcephaly with muscle hypotonia and nephrotic syndrome]. *Padiatr Grenzgeb*. 1982;21(1):39-41.
370. Robain O, Deonna T. Pachygyria and congenital nephrosis disorder of migration and neuronal orientation. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1983;60(1-2):137-41.
371. Gaudelus J, Leverger G, Rault G, Nathanson M, Giorno JL, Boccon-Gibod L, et al. [Association of early-onset nephrotic syndrome and microcephaly. Apropos of 4 cases in 2 families]. *Arch Fr Pediatr*. 1984;41(6):409-15.
372. Palm L, Hägerstrand I, Kristoffersson U, Blennow G, Brun A, Jörgensen C. Nephrosis and disturbances of neuronal migration in male siblings--a new hereditary disorder? *Arch Dis Child*. 1986;61(6):545-8.
373. Roos RA, Maaswinkel-Mooy PD, vd Loo EM, Kanhai HH. Congenital microcephaly, infantile spasms, psychomotor retardation, and nephrotic syndrome in two sibs. *Eur J Pediatr*. 1987;146(5):532-6.
374. Koskimies O, Sariola H, Holmberg C, Rapola J. Clinical quiz. Congenital nephrotic syndrome, microcephaly, brain malformations and diaphragmatic abnormality





- associated with histological features of diffuse mesangial sclerosis. *Pediatr Nephrol Berl Ger.* 1991;5(4):433-5.
375. Cooperstone BG, Friedman A, Kaplan BS. Galloway-Mowat syndrome of abnormal gyral patterns and glomerulopathy. *Am J Med Genet.* 1993;47(2):250-4.
  376. Cohen AH, Turner MC. Kidney in Galloway-Mowat syndrome: clinical spectrum with description of pathology. *Kidney Int.* 1994;45(5):1407-15.
  377. Yu CH, Tsai WS, Wang PJ, Tsau YK, Tseng GC, Wang TR. Congenital nephrotic syndrome with microcephaly: report of a case. *J Formos Med Assoc Taiwan Yi Zhi.* 1994;93(6):528-30.
  378. Garty BZ, Eisenstein B, Sandbank J, Kaffe S, Dagan R, Gadoth N. Microcephaly and congenital nephrotic syndrome owing to diffuse mesangial sclerosis: an autosomal recessive syndrome. *J Med Genet.* 1994;31(2):121-5.
  379. Yalçinkaya F, Tümer N, Ekim M, Kuyucu S, Cakar N, Ensari C. Congenital microcephaly and infantile nephrotic syndrome--a case report. *Pediatr Nephrol Berl Ger.* 1994;8(1):72-3.
  380. Hou JW, Wang TR. Galloway-Mowat syndrome in Taiwan. *Am J Med Genet.* 1995;58(3):245-8.
  381. Sano H, Miyanoshita A, Watanabe N, Koga Y, Miyazawa Y, Yamaguchi Y, et al. Microcephaly and early-onset nephrotic syndrome--confusion in Galloway-Mowat syndrome. *Pediatr Nephrol Berl Ger.* 1995;9(6):711-4.
  382. Kingo AR, Battin M, Solimano A, Phang M, McGillivray B. Further case of Galloway-Mowat syndrome of abnormal gyral patterns and glomerulopathy. *Am J Med Genet.* 1997;69(4):431.
  383. Nishikawa M, Ichiyama T, Hayashi T, Furukawa S. A case of early myoclonic encephalopathy with the congenital nephrotic syndrome. *Brain Dev. mars* 1997;19(2):144-7.
  384. Hazza I, Najada AH. Late-onset nephrotic syndrome in galloway-mowat syndrome: a case report. *Saudi J Kidney Dis Transplant Off Publ Saudi Cent Organ Transplant Saudi Arab.* 1999;10(2):171-4.
  385. Meyers KE, Kaplan P, Kaplan BS. Nephrotic syndrome, microcephaly, and developmental delay: three separate syndromes. *Am J Med Genet.* 29 1999;82(3):257-60.
  386. Kucharczuk K, de Giorgi AM, Golden J, Zacharowicz L, van den Heuvel LP, Kaplan BS. Additional findings in Galloway-Mowat syndrome. *Pediatr Nephrol Berl Ger.* 2000;14(5):406-9.
  387. Lin CC, Tsai JD, Lin SP, Tzen CY, Shen EY, Shih CS. Galloway-Mowat syndrome: a glomerular basement membrane disorder? *Pediatr Nephrol Berl Ger.* 2001;16(8):653-7.
  388. de Vries BB, van'tHoff WG, Surtees RA, Winter RM. Diagnostic dilemmas in four infants with nephrotic syndrome, microcephaly and severe developmental delay. *Clin Dysmorphol.* 2001;10(2):115-21.
  389. Srivastava T, Whiting JM, Garola RE, Dasouki MJ, Ruotsalainen V, Tryggvason K, et al. Podocyte proteins in Galloway-Mowat syndrome. *Pediatr Nephrol Berl Ger.* 2001;16(12):1022-9.



390. Nakazato H, Hattori S, Karashima S, Kawano T, Seguchi S, Kanahori M, et al. Another autosomal recessive form of focal glomerulosclerosis with neurological findings. *Pediatr Nephrol Berl Ger*. 2002;17(1):16-9.
391. Shiihara T, Kato M, Kimura T, Matsunaga A, Joh K, Hayasaka K. Microcephaly, cerebellar atrophy, and focal segmental glomerulosclerosis in two brothers: a possible mild form of Galloway-Mowat syndrome. *J Child Neurol*. 2003;18(2):147-9.
392. Steiss JO, Gross S, Neubauer BA, Hahn A. Late-onset nephrotic syndrome and severe cerebellar atrophy in Galloway-Mowat syndrome. *Neuropediatrics*. 2005;36(5):332-5.
393. Chen C-P, Chang T-Y, Lin S-P, Huang J-K, Tsai J-D, Chiu N-C, et al. Prenatal magnetic resonance imaging of Galloway-Mowat syndrome. *Prenat Diagn*. 2005;25(6):525-7.
394. Kang L, Kuo P-L, Lee K-H, Liu Y-C, Chang C-H, Chang F-M, et al. Late-onset growth restriction in Galloway-Mowat syndrome: a case report. *Prenat Diagn*. 2005;25(2):159-62.
395. Chen CP, Lin SP, Chang TY, Tsai JD, Huang JK, Wang W. Recurrent Galloway Mowat syndrome associated with abnormal prenatal sonographic findings. *Genet Couns Geneva Switz*. 2006;17(1):87-9.
396. Chen CPV, Lin SP, Tsai JD, Huang JK, Yen JL, Tseng CC, et al. Perinatal imaging findings of Galloway-Mowat syndrome. *Genet Couns Geneva Switz*. 2007;18(3):353-5.
397. Akhtar N, Kiran S, Hafeez F. Galloway-Mowat syndrome. *J Coll Physicians Surg--Pak JCPSP*. 2008;18(8):520-1.
398. Sartelet H, Pietrement C, Noel L-H, Sabouraud P, Birembaut P, Oligny LL, et al. Collapsing glomerulopathy in Galloway-Mowat syndrome: a case report and review of the literature. *Pathol Res Pract*. 2008;204(6):401-6.
399. Dietrich A, Matejas V, Bitzan M, Hashmi S, Kiraly-Borri C, Lin S-P, et al. Analysis of genes encoding laminin beta2 and related proteins in patients with Galloway-Mowat syndrome. *Pediatr Nephrol Berl Ger*. 2008;23(10):1779-86.
400. Horton AL, Smith JK, Strauss RA. Recurrence of Galloway Mowat syndrome and associated prenatal imaging findings. *Prenat Diagn*. 2009;29(3):280-2.
401. Pezzella M, Yeghiazaryan NS, Veggiotti P, Bettinelli A, Giudizioso G, Zara F, et al. Galloway-Mowat syndrome: an early-onset progressive encephalopathy with intractable epilepsy associated to renal impairment. Two novel cases and review of literature. *Seizure*. 2010;19(2):132-5.
402. Keith J, Fabian VA, Walsh P, Sinniah R, Robitaille Y. Neuropathological homology in true Galloway-Mowat syndrome. *J Child Neurol*. 2011;26(4):510-7.
403. Chen C-P, Lin S-P, Liu Y-P, Tsai J-D, Chen C-Y, Shih S-L, et al. Galloway-Mowat syndrome: prenatal ultrasound and perinatal magnetic resonance imaging findings. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2011;50(2):212-6.
404. Krishnamurthy S, Rajesh NG, Ramesh A, Zenker M. Infantile nephrotic syndrome with microcephaly and global developmental delay: the Galloway Mowat Syndrome. *Indian J Pediatr*. 2012;79(8):1087-90.



405. Ekstrand JJ, Friedman AL, Stafstrom CE. Galloway-Mowat syndrome: neurologic features in two sibling pairs. *Pediatr Neurol.* 2012;47(2):129-32.
406. Malaki M, Rafeey M. Infant Boy with Microcephaly Gastroesophageal Refl ux and Nephrotic Syndrome (Galloway-Mowat Syndrome): A Case Report. *Middle East J Dig Dis.* 2012;4(1):51-4.
407. Hsia K-C, Stavropoulos P, Blobel G, Hoelz A. Architecture of a coat for the nuclear pore membrane. *Cell.* 2007;131(7):1313-26.
408. Jinks RN, Puffenberger EG, Baple E, Harding B, Crino P, Fogo AB, et al. Recessive nephrocerebellar syndrome on the Galloway-Mowat syndrome spectrum is caused by homozygous protein-truncating mutations of WDR73. *Brain J Neurol.* 2015;138(Pt 8):2173-90.
409. Ben-Sahra I, Howell JJ, Asara JM, Manning BD. Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1. *Science.* 2013;339(6125):1323-8.
410. Robitaille AM, Christen S, Shimobayashi M, Cornu M, Fava LL, Moes S, et al. Quantitative phosphoproteomics reveal mTORC1 activates de novo pyrimidine synthesis. *Science.* 2013;339(6125):1320-3.
411. Gödel M, Hartleben B, Herbach N, Liu S, Zschiedrich S, Lu S, et al. Role of mTOR in podocyte function and diabetic nephropathy in humans and mice. *J Clin Invest.* 2011;121(6):2197-209.
412. 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;33(18):7799-810.
413. Colin E, Huynh Cong E, Mollet G, Guichet A, Gribouval O, Arrondel C, et al. Loss-of-function mutations in WDR73 are responsible for microcephaly and steroid-resistant nephrotic syndrome: Galloway-Mowat syndrome. *Am J Hum Genet.* 2014;95(6):637-48.
414. Ben-Omran T, Fahiminiya S, Sorfazlian N, Almuriekhi M, Nawaz Z, Nadaf J, et al. Nonsense mutation in the WDR73 gene is associated with Galloway-Mowat syndrome. *J Med Genet.* 2015;52(6):381-90.
415. Vodopiutz J, Seidl R, Prayer D, Khan MI, Mayr JA, Streubel B, et al. WDR73 Mutations Cause Infantile Neurodegeneration and Variable Glomerular Kidney Disease. *Hum Mutat.* 2015;36(11):1021-8.
416. Rosti RO, Dikoglu E, Zaki MS, Abdel-Salam G, Makhseed N, Sese JC, et al. Extending the mutation spectrum for Galloway-Mowat syndrome to include homozygous missense mutations in the WDR73 gene. *Am J Med Genet A.* 2016;170A(4):992-8.
417. Jiang C, Gai N, Zou Y, Zheng Y, Ma R, Wei X, et al. WDR73 missense mutation causes infantile onset intellectual disability and cerebellar hypoplasia in a consanguineous family. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 2017;464:24-9.
418. Lewis TL, Courchet J, Polleux F. Cell biology in neuroscience: Cellular and molecular mechanisms underlying axon formation, growth, and branching. *J Cell Biol.* 2013;202(6):837-48.



419. Lannoo MJ, Brochu G, Maler L, Hawkes R. Zebrin II immunoreactivity in the rat and in the weakly electric teleost *Eigenmannia* (gymnotiformes) reveals three modes of Purkinje cell development. *J Comp Neurol*. 1991;310(2):215-33.
420. Bae Y-K, Kani S, Shimizu T, Tanabe K, Nojima H, Kimura Y, et al. Anatomy of zebrafish cerebellum and screen for mutations affecting its development. *Dev Biol*. 2009;330(2):406-26.
421. Boyer O, Nevo F, Plaisier E, Funalot B, Gribouval O, Benoit G, et al. INF2 mutations in Charcot-Marie-Tooth disease with glomerulopathy. *N Engl J Med*. 2011;365(25):2377-88.
422. Huynh Cong E, Bizet AA, Boyer O, Woerner S, Gribouval O, Filhol E, et al. A homozygous missense mutation in the ciliary gene *TTC21B* causes familial FSGS. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2014;25(11):2435-43.
423. Akchurin O, Reidy KJ. Genetic causes of proteinuria and nephrotic syndrome: impact on podocyte pathobiology. *Pediatr Nephrol Berl Ger*. 2015;30(2):221-33.
424. Kobayashi N, Gao S, Chen J, Saito K, Miyawaki K, Li C, et al. Process formation of the renal glomerular podocyte: is there common molecular machinery for processes of podocytes and neurons? *Anat Sci Int*. 2004;79(1):1-10.
425. Sun Y, Zhang H, Hu R, Sun J, Mao X, Zhao Z, et al. The expression and significance of neuronal iconic proteins in podocytes. *PloS One*. 2014;9(4):e93999.
426. Kobayashi N, Reiser J, Kriz W, Kuriyama R, Mundel P. Nonuniform microtubular polarity established by CHO1/MKLP1 motor protein is necessary for process formation of podocytes. *J Cell Biol*. 1998;143(7):1961-70.
427. Rastaldi MP, Armelloni S, Berra S, Calvaresi N, Corbelli A, Giardino LA, et al. Glomerular podocytes contain neuron-like functional synaptic vesicles. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2006;20(7):976-8.
428. Giardino L, Armelloni S, Corbelli A, Mattinzoli D, Zennaro C, Guerrot D, et al. Podocyte glutamatergic signaling contributes to the function of the glomerular filtration barrier. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2009;20(9):1929-40.
429. Braun DA, Rao J, Mollet G, Schapiro D, Daugeron M-C, Tan W, et al. Mutations in KEOPS-complex genes cause nephrotic syndrome with primary microcephaly. *Nat Genet*. 2017; [Epub ahead of print].
430. Rosti RO, Sotak BN, Bielas SL, Bhat G, Silhavy JL, Aslanger AD, et al. Homozygous mutation in *NUP107* leads to microcephaly with steroid-resistant nephrotic condition similar to Galloway-Mowat syndrome. *J Med Genet*. 2017;54(6):399-403.
431. van der Veen AG, Ploegh HL. Ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Biochem*. 2012;81:323-57.
432. Daniel J, Liebau E. The ufm1 cascade. *Cells*. 2014;3(2):627-38.
433. Wei Y, Xu X. UFMylation: A Unique & Fashionable Modification for Life. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2016;14(3):140-6.
434. Liu G, Forouhar F, Eletsky A, Atreya HS, Aramini JM, Xiao R, et al. NMR and X-RAY structures of human E2-like ubiquitin-fold modifier conjugating enzyme 1 (UFC1) reveal structural and functional conservation in the metazoan UFM1-UBA5-UFC1 ubiquitination pathway. *J Struct Funct Genomics*. 2009;10(2):127-36.





435. Zhang M, Zhu X, Zhang Y, Cai Y, Chen J, Sivaprakasam S, et al. RCAD/Ufl1, a Ufm1 E3 ligase, is essential for hematopoietic stem cell function and murine hematopoiesis. *Cell Death Differ.* 2015;22(12):1922-34.
436. Lemaire K, Moura RF, Granvik M, Igoillo-Esteve M, Hohmeier HE, Hendrickx N, et al. Ubiquitin fold modifier 1 (UFM1) and its target UFBP1 protect pancreatic beta cells from ER stress-induced apoptosis. *PLoS One.* 2011;6(4):e18517.
437. Gannavaram S, Connelly PS, Daniels MP, Duncan R, Salotra P, Nakhasi HL. Deletion of mitochondrial associated ubiquitin fold modifier protein Ufm1 in *Leishmania donovani* results in loss of  $\beta$ -oxidation of fatty acids and blocks cell division in the amastigote stage. *Mol Microbiol.* 2012;86(1):187-98.
438. Chen C, Itakura E, Weber KP, Hegde RS, de Bono M. An ER complex of ODR-4 and ODR-8/Ufm1 specific protease 2 promotes GPCR maturation by a Ufm1-independent mechanism. *PLoS Genet.* 2014;10(3):e1004082.
439. Bacik J-P, Walker JR, Ali M, Schimmer AD, Dhe-Paganon S. Crystal structure of the human ubiquitin-activating enzyme 5 (UBA5) bound to ATP: mechanistic insights into a minimalistic E1 enzyme. *J Biol Chem.* 2010;285(26):20273-80.
440. Oweis W, Padala P, Hassouna F, Cohen-Kfir E, Gibbs DR, Todd EA, et al. Trans-Binding Mechanism of Ubiquitin-like Protein Activation Revealed by a UBA5-UFM1 Complex. *Cell Rep.* 2016;16(12):3113-20.
441. Yoo HM, Kang SH, Kim JY, Lee JE, Seong MW, Lee SW, et al. Modification of ASC1 by UFM1 is crucial for ER $\alpha$  transactivation and breast cancer development. *Mol Cell.* 2014;56(2):261-74.
442. Kwon J, Cho HJ, Han SH, No JG, Kwon JY, Kim H. A novel LZAP-binding protein, NLBP, inhibits cell invasion. *J Biol Chem.* 2010;285(16):12232-40.
443. Roberts AM, Miyamoto DK, Huffman TR, Bateman LA, Ives AN, Akopian D, et al. Chemoproteomic Screening of Covalent Ligands Reveals UBA5 As a Novel Pancreatic Cancer Target. *ACS Chem Biol.* 2017;12(4):899-904.
444. Azfer A, Niu J, Rogers LM, Adamski FM, Kolattukudy PE. Activation of endoplasmic reticulum stress response during the development of ischemic heart disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291(3):H1411-1420.
445. Back SH, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. *Annu Rev Biochem.* 2012;81:767-93.
446. Watson CM, Crinnion LA, Gleghorn L, Newman WG, Ramesar R, Beighton P, et al. Identification of a mutation in the ubiquitin-fold modifier 1-specific peptidase 2 gene, UFSP2, in an extended South African family with Beukes hip dysplasia. *South Afr Med J Suid-Afr Tydskr Vir Geneesk.* 2015;105(7):558-63.
447. Rubio MD, Wood K, Haroutunian V, Meador-Woodruff JH. Dysfunction of the ubiquitin proteasome and ubiquitin-like systems in schizophrenia. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol.* 2013;38(10):1910-20.
448. Duan R, Shi Y, Yu L, Zhang G, Li J, Lin Y, et al. UBA5 Mutations Cause a New Form of Autosomal Recessive Cerebellar Ataxia. *PLoS One.* 2016;11(2):e0149039.
449. Muona M, Ishimura R, Laari A, Ichimura Y, Linnankivi T, Keski-Filppula R, et al. Biallelic Variants in UBA5 Link Dysfunctional UFM1 Ubiquitin-like Modifier Pathway to Severe Infantile-Onset Encephalopathy. *Am J Hum Genet.* 2016;99(3):683-94.



450. Arnadottir GA, Jensson BO, Marelsson SE, Sulem G, Oddsson A, Kristjansson RP, et al. Compound heterozygous mutations in UBA5 causing early-onset epileptic encephalopathy in two sisters. *BMC Med Genet.* 2017;18(1):103.
451. Colin E, Daniel J, Ziegler A, Wakim J, Scrivo A, Haack TB, et al. Biallelic Variants in UBA5 Reveal that Disruption of the UFM1 Cascade Can Result in Early-Onset Encephalopathy. *Am J Hum Genet.* 2016;99(3):695-703.
452. Tatsumi K, Yamamoto-Mukai H, Shimizu R, Waguri S, Sou Y-S, Sakamoto A, et al. The Ufm1-activating enzyme Uba5 is indispensable for erythroid differentiation in mice. *Nat Commun.* 2011;2:181.
453. Cai Y, Singh N, Li H. Essential role of Ufm1 conjugation in the hematopoietic system. *Exp Hematol.* 2016;44(6):442-6.
454. Homrich M, Wobst H, Laurini C, Sabrowski J, Schmitz B, Diestel S. Cytoplasmic domain of NCAM140 interacts with ubiquitin-fold modifier-conjugating enzyme-1 (Ufc1). *Exp Cell Res.* 2014;324(2):192-9.
455. Rutishauser U. Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9(1):26-35.
456. Havugimana PC, Hart GT, Nepusz T, Yang H, Turinsky AL, Li Z, et al. A census of human soluble protein complexes. *Cell.* 2012;150(5):1068-81.
457. Wang Q, Tang Y, Xu Y, Xu S, Jiang Y, Dong Q, et al. The X-linked deubiquitinase USP9X is an integral component of centrosome. *J Biol Chem.* 2017;292(31):12874-84.
458. Homan CC, Kumar R, Nguyen LS, Haan E, Raymond FL, Abidi F, et al. Mutations in USP9X are associated with X-linked intellectual disability and disrupt neuronal cell migration and growth. *Am J Hum Genet.* 2014;94(3):470-8.
459. Reijnders MRF, Zachariadis V, Latour B, Jolly L, Mancini GM, Pfundt R, et al. De Novo Loss-of-Function Mutations in USP9X Cause a Female-Specific Recognizable Syndrome with Developmental Delay and Congenital Malformations. *Am J Hum Genet.* 2016;98(2):373-81.
460. Au PYB, Huang L, Broley S, Gallagher L, Creede E, Lahey D, et al. Two females with mutations in USP9X highlight the variable expressivity of the intellectual disability syndrome. *Eur J Med Genet.* 2017;60(7):359-64.
461. Baker BM, Nargund AM, Sun T, Haynes CM. Protective coupling of mitochondrial function and protein synthesis via the eIF2 $\alpha$  kinase GCN-2. *PLoS Genet.* 2012;8(6):e1002760.
462. Zhao Q, Wang J, Levichkin IV, Stasinopoulos S, Ryan MT, Hoogenraad NJ. A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *EMBO J.* 2002;21(17):4411-9.
463. Gannavaram S, Sharma P, Duncan RC, Salotra P, Nakhasi HL. Mitochondrial associated ubiquitin fold modifier-1 mediated protein conjugation in *Leishmania donovani*. *PLoS One.* 2011;6(1):e16156.
464. Schapira AHV. Mitochondrial disease. *Lancet Lond Engl.* 2006;368(9529):70-82.
465. Monroe GR, Frederix GW, Savelberg SMC, de Vries TI, Duran KJ, van der Smagt JJ, et al. Effectiveness of whole-exome sequencing and costs of the traditional



- diagnostic trajectory in children with intellectual disability. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* 2016;18(9):949-56.
466. Stark Z, Schofield D, Alam K, Wilson W, Mupfeki N, Macciocca I, et al. Prospective comparison of the cost-effectiveness of clinical whole-exome sequencing with that of usual care overwhelmingly supports early use and reimbursement. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* 2017;19(8):867-74.
467. Tan TY, Dillon OJ, Stark Z, Schofield D, Alam K, Shrestha R, et al. Diagnostic Impact and Cost-effectiveness of Whole-Exome Sequencing for Ambulant Children With Suspected Monogenic Conditions. *JAMA Pediatr.* 2017;171(9):855-62.
468. Vissers LELM, van Nimwegen KJM, Schieving JH, Kamsteeg E-J, Kleefstra T, Yntema HG, et al. A clinical utility study of exome sequencing versus conventional genetic testing in pediatric neurology. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* 2017;19(9):1055-63.
469. Thevenon J, Duffourd Y, Masurel-Paulet A, Lefebvre M, Feillet F, El Chehadeh-Djebbar S, et al. Diagnostic odyssey in severe neurodevelopmental disorders: toward clinical whole-exome sequencing as a first-line diagnostic test. *Clin Genet.* 2016;89(6):700-7.
470. Sawyer SL, Hartley T, Dymont DA, Beaulieu CL, Schwartzentruber J, Smith A, et al. Utility of whole-exome sequencing for those near the end of the diagnostic odyssey: time to address gaps in care. *Clin Genet.* 2016;89(3):275-84.
471. Bouchany A, Thauvin-Robinet C, Lehalle D, Bruel A-L, Masurel-Paulet A, Jean N, et al. Reducing diagnostic turnaround times of exome sequencing for families requiring timely diagnoses. *Eur J Med Genet.* 2017;60(11):595-604.
472. Sobreira N, Schiettecatte F, Valle D, Hamosh A. GeneMatcher: a matching tool for connecting investigators with an interest in the same gene. *Hum Mutat.* 2015;36(10):928-30.
473. Sobreira N, Schiettecatte F, Boehm C, Valle D, Hamosh A. New tools for Mendelian disease gene identification: PhenoDB variant analysis module; and GeneMatcher, a web-based tool for linking investigators with an interest in the same gene. *Hum Mutat.* 2015;36(4):425-31.
474. Mackay DJG, Temple IK. Human imprinting disorders: Principles, practice, problems and progress. *Eur J Med Genet.* 2017; [Epub ahead of print].
475. Kalish JM, Jiang C, Bartolomei MS. Epigenetics and imprinting in human disease. *Int J Dev Biol.* 2014;58(2-4):291-8.

### **Sites internet**

<http://gnomad.broadinstitute.org/>

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

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>

<https://pecan.stjude.org/proteinpaint>

<http://www.mitomap.org>

<http://wintervar.wqlab.org/>

<https://genematcher.org>



# Thèse de Doctorat

Estelle COLIN

Identification de deux gènes, *WDR73* et *UBA5*, impliqués dans la déficience intellectuelle sévère syndromique

Identification of two genes, *WDR73* and *UBA5*, involved in severe syndromic intellectual disability

## Résumé

La prévalence de la déficience intellectuelle est estimée entre 1 à 3% de la population. En France, la déficience intellectuelle légère concerne entre 10 et 20 pour 1 000 personnes et la déficience intellectuelle sévère entre 3 à 4 pour 1 000 personnes. La déficience intellectuelle fait partie d'un groupe hétérogène de pathologies syndromiques et non syndromiques ayant en commun la limitation importante du fonctionnement intellectuel et du comportement adaptatif, apparaissant avant 18 ans et entraînant un handicap. Les causes de la déficience intellectuelle affectent la neurogénèse et/ou le fonctionnement neuronal. Environ 50% des déficiences intellectuelles sont encore à l'heure actuelle d'étiologie indéterminée. Les étiologies génétiques expliquent un grand nombre de déficiences intellectuelles et plus particulièrement les formes sévères. Les nouvelles technologies, telles que les analyses chromosomiques sur puce à ADN et le séquençage à haut débit de l'ADN, ont permis d'augmenter le rendement diagnostique à 55-70% dans les déficiences intellectuelles modérées à sévères. C'est grâce à ces techniques que nous avons pu identifier puis caractériser deux nouveaux gènes impliqués dans des déficiences intellectuelles sévères syndromiques autosomiques récessives: le gène *WDR73* responsable du syndrome de Galloway Mowat associant un déficience intellectuelle sévère et un syndrome néphrotique cortico-résistant et le gène *UBA5*, impliqué dans le processus d'ufmylation, dans une encéphalopathie précoce.

## Mots clés

Déficience intellectuelle, séquençage à haut débit, *WDR73*, Syndrome de Galloway Mowat, *UBA5*, ufmylation

## Abstract

The prevalence of intellectual disability is estimated between 1% and 3% of the population. In France, mild intellectual disability affects between 10 and 20 per 1,000 people and severe intellectual disability between 3 to 4 per 1,000 people. Intellectual disability is part of a heterogeneous group of syndromic and non-syndromic pathologies with limitation in intellectual functioning and adaptive behavior appearing before the age of 18 and causing a disability. The causes of intellectual disability affect neurogenesis and / or neuronal functions. About 50% of intellectual disabilities are still undetermined. Genetic etiologies explain a large number of intellectual disabilities and more particularly the severe forms. New technologies, such as Array-Based Comparative Genomic Hybridization and next generation sequencing, have increased the diagnostic yield to 55-70% in moderate to severe intellectual disability. Thanks to these techniques, we have been able to identify and characterize two new genes involved in severe autosomal recessive syndrome: the *WDR73* gene responsible for Galloway Mowat syndrome which associates severe intellectual disability with corticosteroid-resistant nephrotic syndrome, and the *UBA5* gene, involved in the ufmylation process in early encephalopathy.

## Key Words

Intellectual disability, next generation sequencing, *WDR73*, Galloway Mowat syndrome, *UBA5*, ufmylation