



**HAL**  
open science

## Recherche et caractérisation de nouveaux gènes impliqués dans l'albinisme

Perrine Pennamen

► **To cite this version:**

Perrine Pennamen. Recherche et caractérisation de nouveaux gènes impliqués dans l'albinisme. Génétique. Université de Bordeaux, 2021. Français. NNT : 2021BORD0136 . tel-03254455

**HAL Id: tel-03254455**

**<https://theses.hal.science/tel-03254455v1>**

Submitted on 8 Jun 2021

**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 PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE DE  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE N° 154 - Sciences de la Vie et de la Santé.  
SPÉCIALITÉ GENÉTIQUE

Présentée et Soutenue publiquement le 06/04/2021  
Par

Perrine PENNAMEN

Recherche et caractérisation de nouveaux gènes  
impliqués dans l'albinisme.

**Directeur de Thèse**

Professeur Benoit ARVEILER, PharmD., PhD

**Rapporteurs**

Mme ROUX, Anne-Françoise, Praticien Hospitalier, Université de Montpellier  
Mme VIDAUD, Dominique, Maître de Conférence des Universités, Praticien  
Hospitalier, Université Paris Descartes

**Jury**

M. TAIEB, Alain, Professeur Emérite, Université de Bordeaux, Président du jury  
Mme ODENT Sylvie, Professeure des Universités, Praticien Hospitalier,  
Université de Rennes 1, Examineur  
M. LACOMBE, Didier, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier,  
Université de Bordeaux, Invité

## **Titre : Recherche et caractérisation de nouveaux gènes impliqués dans l'albinisme.**

### **Résumé :**

L'albinisme est une affection de la pigmentation caractérisée par l'association d'anomalies oculaires à divers degrés d'hypopigmentation cutanéophanéarienne et parfois des atteintes systémiques dans les formes syndromiques que sont les syndromes d'Hermansky-Pudlak (HPS) et le syndrome de Chediak-Higashi. Avant ce travail, 19 gènes étaient connus comme impliqués dans des formes isolées ou syndromiques d'albinisme, dont la plupart sont autosomiques récessives à l'exception de l'albinisme oculaire lié à l'X. Après étude complète de ces 19 gènes, environ 25% à 30% des patients restent sans diagnostic moléculaire. Afin de rechercher de nouveaux gènes, nous avons développé et testé un panel de 129 gènes candidats chez 230 patients non résolus sur le plan moléculaire. Ceci a permis de mettre en évidence des variants délétères dans deux nouveaux gènes. Nous rapportons d'une part deux patientes porteuses de variants perte de fonction dans le gène *BLOC1S5*, une délétion intragénique homozygote emportant les exons 3 et 4 et une délétion homozygote d'une paire de base (pb) de l'exon 4. *BLOC1S5* code une des sous-unités du complexe BLOC-1 qui en compte huit et dont 3 sont déjà associées à des formes d'HPS (7, 8, 9). Ces patientes présentent un phénotype d'albinisme modéré et un défaut d'agrégation plaquettaire par déficit en granules denses. Les plaquettes de la patiente 1 présentent une absence de BLOC-1 montrant que la délétion entraîne une dysfonction de *BLOC1S5* gênant l'assemblage du complexe. Tandis que l'expression du transcrite humain sauvage de *BLOC1S5*, dans des mélanocytes murins avec KO de *Bloc1s5*, non pigmentés, restaure la pigmentation, l'assemblage de BLOC-1 et le trafic de cargo, l'expression du transcrite avec la délétion de la 1<sup>ère</sup> patiente ne le permet pas. Nous avons ainsi démontré que la perte de fonction de *BLOC1S5* est responsable d'une nouvelle forme d'HPS, HPS-11. Le deuxième gène, *DCT* ou *TYRP2* est suspecté de longue date du fait de sa collaboration à la synthèse de la mélanine avec *TYR* et *TYRP1*, gènes connus d'albinisme (OCA1 et 3, respectivement). Nous décrivons 2 patientes présentant un albinisme cutané modéré avec atteinte ophtalmologique caractéristique et porteuses de variants de *DCT*. Une patiente est homozygote pour un variant faux sens de l'exon 1 et l'autre hétérozygote composite pour un variant faux sens de l'exon 1 et une délétion de 14pb de l'exon 9. Les deux variants faux-sens sont situés dans des cystéines très conservées et ont été induits chez la souris par CrispR-Cas9, reproduisant l'hypopigmentation modérée et l'atteinte oculaire. Un modèle poisson zèbre a aussi été produit avec atteinte similaire. Nous concluons donc que *DCT* est impliqué dans une nouvelle forme d'albinisme oculo-cutané, OCA8. Enfin nous rapportons également le phénotype détaillé de trois patients porteurs de nouveaux variants dans *BLOC1S3*, associé à l'HPS-8, une des formes les plus rares d'albinisme syndromique. Avant ce travail, seulement 2 familles et deux variants étaient décrits dans la littérature. La description détaillée du phénotype de ces patients est une aide aux praticiens dans l'accompagnement diagnostique et pronostique des patients ainsi que pour le conseil génétique. Nous avons donc rapporté deux nouveaux gènes d'albinisme, pour une forme oculocutanée et pour une forme syndromique (HPS), toutes deux apparemment modérées et décrivons de nouveaux variants pour une forme connue mais néanmoins rare d'albinisme syndromique.

**Mots clés :** Maladies génétiques rares, génétique moléculaire, séquençage haut-débit, albinisme, analyses fonctionnelles

## **Title: Search and characterization of new genes involved in albinism.**

### **Abstract:**

Albinism is a pigmentation disorder characterized by visual impairment, isolated (Ocular Albinism, OA) or associated with generalized skin and hair hypopigmentation (Oculo-Cutaneous Albinism, OCA), and sometimes with other symptoms in syndromic forms called Hermansky-Pudlak (HPS) and Chediak-Higashi (CHS) syndromes. Most are autosomal recessive affections except for X-linked OA. Prior to this work 19 genes were known to cause isolated or syndromic albinism. After extensive analysis of these genes, 25 to 30% of patients remain molecularly unsolved. To search for new genes we screened, in 230 patients without molecular diagnosis, a panel of 129 candidate genes. We identified deleterious variants in two candidate genes. First, we report two patients with predicted loss-of-function variants in *BLOC1S5* in two patients. The first patient carries an intragenic homozygous deletion involving exons 3 and 4. The second patient has a homozygous one base-pair deletion in exon 4. *BLOC1S5* codes for one of the 8 subunits of BLOC-1, three of which are involved HPS-7, 8 and 9. Both patients had mild hypopigmentation, classical ocular albinism and moderate bleeding diathesis, platelet aggregation deficit and a very low number of platelet dense granules, compatible with HPS. Patient 1's platelets displayed an absence of BLOC-1, showing that the identified mutation disrupts *BLOC1S5* function and impairs BLOC-1 assembly. Whereas expression of a wild-type *BLOC1S5* protein in non-pigmented murine melanocytes rescued pigmentation, assembly of a functional BLOC-1, and melanosome cargo trafficking, expression of the patient's *BLOC1S5* variant allele did not. These data indicate that mutation of *BLOC1S5* is disease-causing, and we propose that *BLOC1S5* is the gene for a new form of HPS, HPS11. The second gene, *DCT* or *TYRP2* has been suspected for a long time, due to its collaboration with *TYR* (OCA1) and *TYRP1* (OCA3). We describe two unrelated patients presenting with clinical diagnosis of OCA. One patient is homozygous for a missense variant in the exon 1 of *DCT* and the other is a compound heterozygote for a missense variant in exon 1 and a frame-shift deletion in exon 9. Both missense variants, affecting highly conserved cysteine, were introduced in mice via Crispr-Cas9, which led to mild hypopigmentation of the fur and ocular anomalies. A Zebrafish knock-down model has also been produced by morpholino injection, leading to a significant decrease in melanin levels compared to controls. We propose that *DCT* is the gene for a new form of OCA, OCA8. In this work we also describe three unrelated patients with novel variants in *BLOC1S3* responsible for HPS-8. This rare form of HPS had been reported in only two families and we believe detailed clinical description of patients is useful for clinicians for patient's diagnosis and prognosis evaluation and genetic counseling. In conclusion we have reported two new genes involved in isolated and syndromic forms of albinism as well as new insight in an already known yet rare form of syndromic albinism.

**Key Words:** Rare genetic diseases, molecular genetics, high throughput sequencing, albinism, functional analyses.

---

### **Unité de recherche**

Inserm U1211 - Laboratoire Maladies Rares : Génétique et Métabolisme  
Ecole de Sages-Femmes - Hôpital Pellegrin  
Place Amélie Raba-Léon – 33076 BORDEAUX Cedex

À Cécile,  
À Maman,

Si tu aimes une fleur qui se trouve dans une étoile,  
c'est doux, la nuit, de regarder le ciel.

Antoine de St Exupéry

## REMERCIEMENTS

---

Je remercie l'ensemble des membres du jury d'avoir accordé de leur temps précieux pour évaluer ce travail.

Je remercie Monsieur le Professeur Alain Taïeb d'avoir accepté la présidence de ce jury. Je souhaite exprimer ma reconnaissance pour votre rôle crucial dans la mise en route du diagnostic moléculaire au CHU de Bordeaux et la mise en place de l'hôpital de jour d'Albinisme qui permet une prise en charge multidisciplinaire hyperspécialisée des patients.

Je remercie chaleureusement mes rapporteurs, Mesdames les Docteurs Anne-Françoise Roux et Dominique Vidaud, de juger le présent manuscrit et de m'apporter toute leur expertise dans leur évaluation.

Madame la Professeure Sylvie Odent, je vous adresse mes plus sincères remerciements pour avoir accepté d'examiner mon travail. Ayant fait mes premiers pas en génétique en tant qu'externe dans votre service, je suis émue de vous montrer une partie du chemin que j'ai parcouru depuis.

Je remercie sincèrement Monsieur le Professeur Didier Lacombe de participer à ce jury et vous remercie de m'avoir accueillie avec bienveillance à Bordeaux pour mon post-internat et soutenue dans mes démarches pour y rester au-delà.

Je remercie Monsieur le Professeur Benoit Arveiler d'avoir dirigé cette thèse passionnante, d'avoir su me guider avec gentillesse et sagesse dans cette aventure non sans encombre. Je le remercie de m'avoir épaulée dans des moments difficiles, des moments stressants et des moments joyeux également.

Je remercie toute l'équipe du Laboratoire Maladies Rares : Génétique et Métabolisme pour leur gentillesse et leur bonne humeur. Je tiens tout particulièrement à souligner l'implication et la contribution précieuse du Docteur Angela Tingaud-Sequeira, sa gentillesse et sa patience pour m'initier à certaines techniques, lors de mon Master 2 puis pour cette thèse.

Je remercie également Madame la Professeure Sophie Javerzat qui a rejoint notre équipe au court de ce travail et dont la passion et le dynamisme sont une inspiration.

Je remercie tous les étudiants que j'ai encadrés pendant ces quelques années, leur transmettre m'a également permis d'apprendre.

Un énorme merci à toute l'équipe du laboratoire de génétique moléculaire qui m'a accueilli et donné envie de rester auprès d'eux. Une pensée toute particulière pour la Team CGH pour leurs sourires, leur bonne humeur et leur gentillesse qui rendent le travail si agréable à leur côté.

Merci énormément à Madame la Professeure Caroline Rooryck-Thambo qui m'a soutenue depuis mon arrivée et me transmet sa passion et une toute petite partie de son énergie inépuisable depuis.

Merci bien sûr à Eulalie pour son amitié et son écoute. Sa force et sa ténacité dans les projets qu'elle mène me poussent chaque jour à me dépasser (même jusqu'à faire de la qualité !)

Je remercie Aurélien, mon camarade de thèse, sans qui je ne serai probablement jamais arrivée à Bordeaux, pour son amitié et sa gentillesse.

Merci à Claudio pour sa patience et sa douceur, et pour sa contribution inestimable pour le diagnostic d'albinisme. Merci à lui mais également à toute l'équipe technique pour la participation à ma formation à certaines manipulations, notamment au séquençage haut-débit qui a permis les résultats présentés ci-après.

Je n'oublie pas, bien sûr toute l'équipe du laboratoire de cytogénétique avec qui je partage mon amour des chromosomes et dont la bonne humeur et l'implication sont une chance.

Merci à Jérôme pour son écoute et sa bienveillance et de m'avoir permis d'ajouter la corde de cytogénéticienne à mon arc.

Merci à tous ceux que j'oublie malgré moi, mais qui comptent !

J'ai traversé bien des épreuves ces dernières années et je n'aurais pu y parvenir sans l'appui sans faille de Nicolas, qui partage ma vie et mon cœur, et sans le soutien indéfectible de ma famille, je n'ai pas les mots pour exprimer ma gratitude pour tout ce que vous m'apportez.

# TABLE DES MATIÈRES

---

INTRODUCTION.....	14
Préambule .....	14
Partie 1. Pigmentation : physiologie et pathologie.....	17
I. Peau et poils.....	17
I.1. Les mélanocytes, cellules spécialisées de la pigmentation.....	19
I.1.1 Développement des mélanocytes .....	19
I.1.2 Pathologies de la migration des mélanocytes.....	21
I.2. Les mélanosomes .....	23
I.2.1 Formation des mélanosomes .....	24
I.2.2 Pathologies de la biogenèse des mélanosomes et autres Lysosome-Related- Organelles.....	26
I.2.2.1 Syndrome de Chediak-Higashi (CHS) .....	26
I.2.2.2 Syndrome d'Hermansky-Pudlak (HPS).....	27
I.2.2.2.1 Class C VPS .....	28
I.2.2.2.2 Complexe AP-3.....	28
I.2.2.2.3 Complexes BLOC : BLOC-1 .....	30
<i>DTNBP1</i> et HPS-7 .....	31
<i>BLOCIS3</i> et HPS-8 .....	31
<i>BLOCIS6</i> et HPS-9 .....	32
I.2.2.2.4 Complexes BLOC : BLOC-2.....	32
HPS-3.....	34
HPS-5.....	34
HPS-6.....	35
I.2.2.2.5 Complexes BLOC : BLOC-3.....	35
HPS-1.....	36
HPS-4.....	36
I.3. Synthèse du pigment .....	37

I.3.1 Biochimie de la mélanogénèse .....	37
I.3.1.1 Eumélanogénèse .....	37
I.3.1.2. Phéomélanogénèse.....	38
I.3.1.3 Régulation du pH mélanosomal .....	39
I.3.1.4 Régulation de l'expression des gènes mélanogéniques .....	40
I.3.2 Pathologies de la mélanogénèse .....	41
I.3.2.1 OCA1 .....	41
I.3.2.2 OCA2.....	44
I.3.2.3 OCA3.....	45
I.3.2.4 OCA4.....	46
I.3.2.5 OCA5 .....	47
I.3.2.6 OCA6.....	48
I.3.2.7 OCA7.....	48
I.4. Transfert des mélanosomes.....	49
I.4.1 Mécanisme du transfert mélanosomal.....	49
I.4.2 Pathologies du transfert mélanosomal.....	49
II. Œil – Anatomie, physiologie et albinisme oculaire .....	51
II.1. Anatomie oculaire et histologie .....	51
II.1.1 Anatomie générale .....	51
II.1.2 Structure et organisation de la rétine.....	52
II.1.2.1 La neurorétine.....	52
II.1.2.2 L'épithélium pigmentaire rétinien.....	54
II.2. Embryologie oculaire.....	55
II.3 Albinisme oculaire et pathologies apparentées .....	58
II.3.1 Albinisme oculaire .....	59
II.3.2 Syndrome FHONDA .....	60
Partie 2. Caractéristiques cliniques de l'albinisme.....	61
I. Diagnostic dermatologique.....	61

II. Diagnostic ophtalmologique .....	63
II.1 Nystagmus .....	63
II.2 Acuité visuelle basse.....	64
II.3 Hypopigmentation irienne .....	64
II.4 Transillumination irienne.....	64
II.5 Hypopigmentation rétinienne .....	65
II.6 Hypoplasie Fovéolaire .....	65
II.7 Anomalie de décussation du chiasma optique .....	67
III. Cas particulier des formes syndromiques .....	68
III.1 Atteinte hématologique .....	68
III.2 Atteinte pulmonaire .....	69
III.3 Atteinte digestive.....	69
III.4 Atteinte immunologique.....	70
Partie 3. Génétique de l'albinisme.....	71
Objectif de la thèse .....	75
MATERIEL ET METHODE .....	76
I. Panel de gènes candidats .....	76
I.1 Gènes responsables d'hypopigmentation voire d'albinisme chez la souris.....	76
<i>DCT</i> .....	76
<i>PMEL</i> .....	77
<i>MLANA</i> .....	78
<i>VPS33A</i> .....	79
<i>BLOCIS4</i> .....	80
<i>BLOCIS5</i> .....	80
<i>RAB38</i> .....	81
<i>RAB32</i> .....	82
<i>RABGGTA</i> .....	82

I.2 Gènes codant des protéines de voies biologiques de la pigmentation et des mélanosomes .....	83
Complexe phosphoinositide 5-kinase.....	83
<i>TPCN2</i> .....	84
Complexe WASH.....	84
II. Séquençage haut-débit ou NGS .....	85
RÉSULTATS .....	87
I. SÉQUENÇAGE .....	87
II. ARTICLES .....	88
II.1 <i>BLOC1S5</i> pathogenic variants cause a new type of Hermansky-Pudlak Syndrome..	88
RESUME :.....	88
Objectif.....	88
Méthodes .....	88
Résultats.....	88
Conclusion.....	88
Authors and affiliations.....	89
ABSTRACT .....	89
Purpose .....	89
Methods .....	90
Results .....	90
Conclusion.....	90
INTRODUCTION.....	90
MATERIALS AND METHODS .....	91
Ethics statement.....	91
Platelet investigations .....	91
Electron microscopy .....	92
Sequencing of the candidate genes.....	92
Characterization of the <i>BLOC1S5</i> gene deletion .....	92

Cloning of control and mutant BLOC1S5 complementary DNA and generation of recombinant retroviral expression constructs .....	93
Other procedures.....	93
Statistical analyses.....	93
RESULTS.....	94
Identification of BLOC1S5 variants.....	94
Clinical cases .....	96
Impact of the BLOC1S5 deletion on BLOC-1 assembly and function.....	98
DISCUSSION .....	104
REFERENCES.....	107
Acknowledgements .....	109
SUPPLEMENTARY INFORMATION.....	109
SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS .....	109
Sequencing of the candidate genes, bioinformatics analysis, and characterization of the <i>BLOC1S5</i> gene deletion.....	109
Cloning of control and mutant <i>BLOC1S5</i> cDNA and generation of recombinant retroviral expression constructs. ....	110
Mouse melanocyte cell culture and transduction.....	111
Reverse-transcriptase PCR analysis in the melan-mu3 cell line.....	112
Immunoblotting.....	112
Immunofluorescence microscopy .....	113
Quantitative melanin content assay.....	114
SUPPLEMENTARY DATA.....	114
Characterization of the BLOC1S5 exon 3-4 deletion in patient 1.....	114
Supplementary Table 1: List of human genes associated with albinism .....	115
Supplementary Table 2 : Candidate genes tested in this study.....	116
Supplementary Table 3: Clinical Phenotypes of the different forms of Hermansky-Pudlak Syndrome .....	117
SUPPLEMENTARY FIGURES .....	118

Figure S1A .....	118
Figure S1B .....	119
Figure S1C .....	120
Figure S2 .....	121
Figure S3 .....	122
II.2 Dopachrome tautomerase variants in patients with oculocutaneous albinism .....	123
Authors and affiliations .....	123
Résumé .....	123
Objectif .....	123
Méthodes .....	123
Résultats .....	124
Conclusion .....	124
Abstract .....	124
Purpose .....	124
Methods .....	124
Results .....	124
Conclusion .....	125
INTRODUCTION .....	125
MATERIALS AND METHODS .....	126
Ethics statement .....	126
Sequencing of candidate genes .....	126
CRISPR modeling of <i>Dct</i> variants in the mouse .....	126
Mouse lines .....	126
Direct spectrophotometry of <i>Dct</i> mice .....	126
Eye histology .....	127
<i>dct</i> knockdown in <i>Danio rerio</i> .....	127
<i>dct</i> targeting .....	127
RESULTS .....	127

Identification of <i>DCT</i> variants in patients with oculocutaneous albinism.....	127
CRISPR modeling of <i>Dct</i> variants in the mouse .....	130
<i>dct</i> knockdown in <i>Danio rerio</i> .....	132
DISCUSSION .....	134
REFERENCES.....	138
Acknowledgements .....	140
SUPPLEMENTARY INFORMATION.....	140
SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS .....	140
Sequencing of the candidate genes, bioinformatics analysis. ....	140
CRISPR modelling of <i>Dct</i> variants in the mouse. ....	141
<i>dct</i> knock-down in <i>Danio rerio</i> .....	142
Supplementary Table 1: Candidate genes tested in this study.....	144
III. COMMENTAIRES SUR LES ARTICLES .....	145
III.1 Article 1 .....	145
III.2 Article 2 .....	147
IV. AUTRES RESULTATS.....	150
IV.1 Nouveaux variants du gène <i>BLOC1S3</i> .....	150
Novel variants in the <i>BLOC1S3</i> gene in patients presenting a mild form of Hermansky-Pudlak Syndrome. ....	151
Authors and affiliations .....	151
Résumé .....	151
Abstract.....	152
Main Text .....	152
Patient F1.II.8. ....	153
Patient F2.II.1. ....	154
Patient F3.II.1. ....	154
Acknowledgments .....	155
Conflict of Interest statement.....	155

References.....	156
Table 1. Clinical features of HPS-8 patients described in the present study and from the literature.....	157
IV.2 <i>PAX6</i> .....	158
IV.3 Mises au point pools parentaux .....	159
IV.4 Variants synonymes.....	159
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....	162
RÉFÉRENCES.....	174
ANNEXE 1 – Liste des gènes candidats.....	188

# INTRODUCTION

---

## Préambule

L'albinisme est une affection héréditaire universelle de la pigmentation. C'est une pathologie cliniquement hétérogène, l'hypopigmentation cutané-phanérienne et irienne pouvant être totale avec absence de production de pigment, plus modérée avec production résiduelle de pigment, ou même absente.

Altération visible, très reconnaissable dans toutes les espèces, l'albinisme est bien connu dans les modèles animaux dont certains sont très populaires comme animaux de compagnie ou comme sujets d'expérimentations, et dont les variants pathogènes ont fait l'objet d'observations depuis des siècles. (1-3) En réalisant des croisements de souris, l'apparition de rongeurs blancs a grandement intéressé les expérimentateurs qui par la suite ont également pu observer de nombreuses variations au niveau des teintes du pelage de ces animaux, dont le cycle de reproduction rapide en fait un modèle idéal pour observer des variants spontanés. Ainsi les variants de couleur de pelage ou allèles, ont été répertoriés (et affectueusement nommés) avant l'avènement des techniques de biologie moléculaire permettant d'identifier la variation génique responsable. (4)

Cependant, l'albinisme est en premier lieu une affection ophtalmologique, au cœur de la prise en charge des patients, a fortiori chez les populations caucasiennes chez qui les hypopigmentations cutané-phanériennes parfois modérées voire absentes peuvent passer inaperçues. L'hypopigmentation oculocutanée totale, liée à l'absence complète d'activité de l'enzyme nommée tyrosinase, est souvent évidente dès la naissance, mais les formes plus modérées sont souvent diagnostiquées chez le nourrisson présentant une atteinte visuelle.

Le signe le plus constant est le nystagmus qui se traduit par des saccades oculaires qui peuvent être observées par l'entourage ou dépistés lors des examens médicaux recommandés des premiers mois de vie. Un examen ophtalmologique permettra d'identifier les autres signes ophtalmologiques habituellement observés que sont la transillumination irienne, l'hypopigmentation rétinienne, l'hypoplasie fovéolaire, l'anomalie de décussation du chiasma optique.

Il existe différentes formes cliniques d'albinisme, la plus classique étant l'albinisme oculocutané non syndromique (AOC) qui touche la majorité des patients. Il existe également une forme oculaire pure (AO), sans hypopigmentation, seule forme actuellement connue de transmission liée à l'X, à laquelle on peut rapprocher le syndrome d'hypoplasie fovéolaire avec anomalie de décussation du nerf optique (FHONDA).

Enfin, il existe des formes syndromiques, associant à l'AOC des atteintes systémiques notamment plaquettaires, immunitaires, pulmonaires et/ou digestives, que sont les syndromes d'Hermansky-Pudlak et le syndrome de Chediak-Higashi.

Par ailleurs, d'autres atteintes avec hypopigmentation telles que le piebaldisme, les syndromes de Griscelli et de Waardenburg peuvent être abordées en ce qu'elles concernent les cellules spécialisées de la pigmentation appelées mélanocytes.

Le langage courant utilise le mot "Albinos" pour parler des personnes vivant avec l'albinisme (PVA). Cependant le terme de PVA est préféré car il met en avant la personne humaine avant sa condition. (5)

Bien que l'albinisme soit connu du grand public, les mécanismes moléculaires complexes, la grande variabilité phénotypique et génétique de cette affection rare restent du domaine du spécialiste. Les premières expériences ayant démontré le caractère héréditaire et récessif de l'albinisme chez les modèles animaux datent du début du 20<sup>ème</sup> siècle (6) période de la redécouverte des lois de Mendel. Avant cela, l'albinisme chez l'humain et notamment en Afrique, avait suscité bien des interrogations, ôtant même l'appartenance à l'espèce humaine aux PVA, les reléguant aux hommes des cavernes voire aux singes, ou même des hybrides homme-singe. Le terme albinos ne fut pas le premier employé pour décrire ces "nègres blancs" qui furent même affublés du terme de Chacrelas, d'après le mot cancrelat, insectes se réfugiant dans l'ombre. De nombreux philosophes ou naturalistes dès le XVII<sup>e</sup> siècle ont émis des théories sur l'existence de l'homme blanc parmi les noirs, y puisant même des ressources pour affirmer la suprématie blanche. (7)

Et si, fort heureusement, les mentalités ont pu évoluer notamment grâce à la découverte de l'origine génétique de l'albinisme, il persiste, en Afrique sub-saharienne notamment, une méconnaissance de cette condition, source d'idées reçues, de préjugés voire de croyances magiques à l'origine de discriminations et de violences. (8)

Si les PVA d'origine caucasienne peuvent parfois passer inaperçues parmi leurs pairs, en Afrique il s'agit d'une affection affichante et les PVA souffrent d'isolement, d'exclusions, de moqueries. Les croyances populaires attribuent l'absence de pigmentation à une malédiction ou même que les PVA seraient des fantômes immortels. Les femmes donnant naissance à un enfant atteint d'albinisme sont souvent quittées par leurs maris, ou les couples cachent leurs enfants, pour ne pas subir la stigmatisation associée. Dans certains pays comme la Tanzanie, la vie des PVA est mise en danger notamment par les croyances dans la sorcellerie, ce qui entraîne des violences atroces envers ces personnes qui sont enlevées, mutilées voire assassinées pour donner lieu à un trafic d'organes et de membres. En effet les sorciers guérisseurs, affirment que

certaines parties du corps de PVA peuvent apporter fortune et abondance et sont donc utilisées dans diverses potions et rituels. Ces "ingrédients" particuliers sont donc achetés à prix d'or, incitant donc ces crimes odieux, y compris parfois par les membres de la famille. Des ONG comme "Under the same sun" ont vu le jour afin de lutter contre ces croyances et ces discriminations mais de nombreuses personnes vivent dans la peur pour eux-mêmes ou pour leurs enfants et ceci accentué par l'absence de soutien des familles mais également des instances, puisque certains politiques et hommes d'affaires ont recours à la sorcellerie, croyant y voir une chance de succès. Le marché noir n'est donc pas inquiété et les coupables de violences, si appréhendés, sont encore trop peu condamnés.(9,10)

Tout ceci et le reflet d'une méconnaissance sur les origines de cette affection génétique rare, et met en lumière l'intérêt de l'identification des causes moléculaires. Cela permet aux patients d'identifier leur affection, de la nommer, de se rapprocher d'autres PVA par le biais d'associations de patients, de comprendre et d'expliquer la transmission à la descendance et d'effectuer un conseil génétique pour eux-mêmes et leurs apparentés. Cela permet de plus l'organisation de la prise en charge avec la mise en place de surveillance et de prévention spécifiques, notamment dans le cadre des formes syndromiques. Comme dans de nombreuses maladies rares, les associations de patients sont au cœur de la dynamique médicale et scientifique de l'albinisme, comme c'est le cas pour l'association française des patients atteints d'albinisme, Genespoir. (11)

Le but de ce travail est l'identification de nouveaux gènes d'albinisme afin d'élargir le spectre diagnostique et également augmenter les connaissances sur les mécanismes responsables d'albinisme chez l'humain. Pour cela nous avons recherché des variants génétiques potentiellement pathogènes dans des gènes candidats grâce aux nouvelles technologies moléculaires.

Ce travail exposera les résultats de cette recherche ayant notamment permis la découverte de deux nouveaux gènes d'albinisme, une forme isolée et une forme syndromique, ayant donné lieu à la publication de deux articles publiés dans cette thèse.

D'autres résultats seront présentés dont un article sur des nouveaux patients atteints d'une forme rare d'albinisme syndromique le syndrome d'Hermansky-Pudlak Type 8 (HPS-8) lié aux variants du gène *BLOC1S3*, permettant d'en étendre les connaissances phénotypiques.

## Partie 1. Pigmentation : physiologie et pathologie

### I. Peau et poils

La pigmentation de la peau et des poils est liée aux pigments nommés mélanines, produites par des cellules spécialisées appelées mélanocytes. Chez les animaux, les couleurs que l'on peut observer dans les plumes, le pelage ou la peau sont largement déterminées par les mélanines, et à moindre degré par l'hémoglobine et les caroténoïdes. Il existe également d'autres cellules intervenant dans la pigmentation animale, les xanthophores et iridophores, absentes chez les humains. La majeure partie des connaissances sur la pigmentation de la peau est tirée d'observations sur les modèles animaux notamment les souris, chez qui on peut observer facilement les modifications de couleur du pelage. Les poils, caractéristiques des mammifères, ont de nombreuses fonctions comme l'isolation thermique, le camouflage, la communication sociale et sexuée, la perception et la photoprotection. Les variations observées au niveau des couleurs de pelage sont le reflet de variations dans la copolymérisation des deux types de mélanines différents, l'eumélanine (brun, noir) et la phéomélanine (jaune orangée) aboutissant à des mélanges divers de poils noirs, bruns, jaunes, gris ou blancs. De nombreux animaux à fourrure n'ont pas de mélanocytes produisant du pigment dans leur épiderme mais uniquement dans leurs follicules pileux, contrairement à l'humain. Nos ancêtres, les chimpanzés, sont pourvus de fourrure noire et leur peau glabre, exposée au soleil, l'est également, tandis que la peau recouverte de fourrure est, elle, blanche. Avec l'évolution, les humains ont perdu leur fourrure, ce qui pourrait être expliqué par la nécessité de maintenir une meilleure régulation thermique avec les besoins grandissant de dissipation de la chaleur résultant de l'augmentation du flux sanguin vers le cerveau. Ainsi la photoprotection a été dévolue à la peau devenue glabre. Chez les humains la peau est la 1<sup>ère</sup> barrière à l'environnement extérieur et s'appuie sur les mélanocytes pour la photoprotection et la thermorégulation, via la production des mélanines, stimulée par l'exposition solaire. Les mélanocytes de la peau glabre peuvent absorber les UV et survivre à un stress genotoxique important. On distingue la pigmentation constitutionnelle, basale, de la pigmentation facultative, acquise. Après stimulation par les UV, les mélanocytes produisent une pigmentation facultative traduisant la capacité de chaque individu à développer un bronzage, le mécanisme naturel de protection de la peau.

La pigmentation humaine est génétiquement prédéterminée et la quantité basale de pigment produit détermine la pigmentation cutané-phanérienne ou phototype, dont Fitzpatrick (12) a déterminé 6 grades, qui permettent notamment de déterminer le niveau de risque de cancer cutané et d'adapter les mesures de prévention solaire (Figure 1).

PHOTOTYPE	CARACTÉRISTIQUES	RÉACTION AU SOLEIL	CONSEILS DE PROTECTION
1	<ul style="list-style-type: none"> <li>Peau très blanche</li> <li>Cheveux roux ou blonds</li> <li>Yeux bleus/verts</li> <li>Souvent des taches de rousseur</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Coups de soleil systématiques</li> <li>Ne bronze jamais, rougit toujours</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Exposition fortement déconseillée</li> <li>Restez à l'ombre le plus possible, ne pas chercher à bronzer, ne jamais s'exposer entre 12 h et 16 h</li> </ul>
2	<ul style="list-style-type: none"> <li>Peau claire</li> <li>Cheveux blonds/roux à châtain</li> <li>Yeux clairs à bruns</li> <li>Parfois apparition de taches de rousseur</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Coups de soleil fréquents</li> <li>Bronze à peine ou très lentement</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Au soleil, protection maximale indispensable : vêtements, chapeau, lunettes de soleil, crème solaire indice FPS très haute protection (50+).</li> </ul>
3	<ul style="list-style-type: none"> <li>Peau intermédiaire</li> <li>Cheveux châtain à bruns</li> <li>Yeux bruns</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Coups de soleil occasionnels</li> <li>Bronze graduellement</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Exposition prudente et progressive</li> <li>Éviter le soleil entre 12 h et 16 h</li> <li>Au soleil, haute protection recommandée : vêtements, chapeau, lunettes de soleil, crème solaire indice FPS haute protection (30 - 50) ou protection moyenne (15 à 25).</li> </ul>
4	<ul style="list-style-type: none"> <li>Peau mate</li> <li>Cheveux bruns/noirs</li> <li>Yeux bruns/noirs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Coups de soleil occasionnels lors d'expositions intenses</li> <li>Bronze bien</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Exposition progressive</li> <li>Éviter le soleil entre 12 h et 16 h</li> <li>Au soleil, protection recommandée : chapeau, lunettes de soleil, crème solaire indice FPS protection moyenne (15 à 25).</li> </ul>
5	<ul style="list-style-type: none"> <li>Peau brun foncé</li> <li>Cheveux noirs</li> <li>Yeux noirs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Coups de soleil rares</li> <li>Bronze beaucoup</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Exposition progressive</li> <li>Éviter le soleil entre 12 h et 16 h</li> <li>Au soleil, protection recommandée : chapeau, lunettes de soleil, crème solaire indice FPS protection moyenne (15 à 25).</li> </ul>
6	<ul style="list-style-type: none"> <li>Peau noire</li> <li>Cheveux noirs</li> <li>Yeux noirs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Coups de soleil très exceptionnels</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Exposition progressive</li> <li>Éviter le soleil entre 12 h et 16 h</li> <li>Au soleil, protection recommandée : chapeau, lunettes de soleil, crème solaire indice FPS protection moyenne (15 à 25).</li> </ul>

Figure 1. Echelle de phototypes selon Fitzpatrick.

Les pigments sont fabriqués par les mélanocytes dans des organelles spécialisées appelées mélanosomes qui sont ensuite exportés vers les kératinocytes adjacents. Sous l'effet des ultraviolets (UV), la synthèse de mélanines augmente et leur transfert aux kératinocytes est accéléré. Après une irradiation, les mélanosomes se rassemblent autour du noyau (phénomène de *capping*) et protègent ainsi le matériel génétique des kératinocytes. En effet, les UV peuvent entraîner des lésions de l'acide désoxyribonucléique (ADN) qui à leur tour sont responsables des premières étapes vers la transformation tumorale. Les UVA jouent un rôle aussi important que les UVB dans ces phénomènes, via la production de radicaux libres. La mélanine contenue dans ces mélanosomes a la capacité de transformer les radiations UV en chaleur et les mélanosomes exercent également un rôle de protection chimique vis-à-vis des radicaux libres. Les eumélanines ont un pouvoir photoprotecteur environ 1.000 fois supérieur à celui des phéomélanines. Malgré les processus d'absorption, environ 15 % des UVB parviennent encore jusqu'à la couche basale de l'épiderme et 50 % des UVA atteignent le derme. Les UVB induisent la formation de dimères dans les chaînes d'ADN, entraînant des défauts métaboliques (vieillesse ou héliodermie), la mort cellulaire par apoptose ou une multiplication cellulaire incontrôlée (cancers).

Chez les humains la pigmentation constitutionnelle diffère selon la répartition sur le globe terrestre avec un gradient nord-sud. Les habitants des régions les plus ensoleillées bénéficient d'une pigmentation plus intense qui leur offre une meilleure protection vis à vis des UVs. Dans les régions moins chaudes, une pigmentation moins importante permet de faciliter la transformation par les UVs du 7-dehydrocholesterol en pré-vitamine D3, nécessaire pour la métabolisation du calcium. (13)

## I.1. Les mélanocytes, cellules spécialisées de la pigmentation

L'acquisition de la pigmentation nécessite la mise en jeu de nombreux acteurs depuis la période embryonnaire et se poursuivant jusqu'à la fin de la vie. Comme pour tout processus biologique, une anomalie de fonctionnement à tout niveau du processus de développement pigmentaire peut entraîner un défaut de pigmentation. Elle implique des cellules spécialisées (les mélanocytes, dérivant des crêtes neurales) contenant des organelles dédiées, les mélanosomes, appartenant à la famille des lysosome-related-organelles (LRO), dans lesquels différentes réactions chimiques aboutissent à la synthèse des pigments. Pour cela il faut que toutes les molécules nécessaires parviennent jusqu'à ce petit réacteur, ce dernier étant ensuite lui-même transporté vers les kératinocytes où il joue son rôle de photoprotection. (13)

La pigmentation basale d'un individu est déterminée par des facteurs génétiques, et n'est pas liée à la densité de mélanocytes mais à leur niveau d'activité. De nombreux facteurs peuvent modifier la pigmentation notamment les UVs, certains agents chimiques ou encore certaines hormones. Le nombre de mélanocytes va en diminuant avec l'âge, phénomène facilement observable au niveau capillaire.

### I.1.1 Développement des mélanocytes

La peau est le plus grand organe du corps humain et la première barrière de l'organisme contre la déshydratation et de nombreux stress physiques, thermiques et chimiques. La peau adulte est composée de deux couches distinctes, le derme et l'épiderme, séparées d'une barrière physique, la membrane basale. Ces deux compartiments sont issus d'origines embryonnaires distinctes, l'épiderme dérivant de l'ectoderme, et le derme dérivant du mésoderme. L'épiderme est constitué de couches multiples de kératinocytes et inclut également les mélanocytes, les glandes sébacées, les glandes sudorales et les follicules pileux. Les mélanocytes situés au niveau de la couche basale de l'épiderme sont au nombre d'environ 1 pour 5 à 10 kératinocytes. A noter que des mélanocytes "non classiques" sont observés dans d'autres tissus notamment l'oreille interne, le cœur, le tissu adipeux et le cerveau. (14)

Les mélanoblastes, précurseurs des mélanocytes, dérivant des crêtes neurales, migrent après la fermeture du tube neural, notamment dans la couche basale de l'épiderme et dans les follicules pileux, en traversant le derme. Toutes les cellules pigmentées, à l'exception des cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine, proviennent de la crête neurale.

Durant le développement, la crête neurale est formée lors de l'étape de neurulation, au moment de la fermeture du tube neural (Figure 2). Les cellules de la crête neurale vont migrer le long de chemins prédéfinis dans l'embryon pour aboutir à leur différenciation dans les organes et

tissus cibles. Ces cellules multipotentes vont donner de nombreux types cellulaires incluant les mélanocytes, la plupart des neurones périphériques et des cellules gliales, les os et cartilages crânio-faciaux, le tissu adipeux, les cellules du muscle lisse cardiaque et les cellules sécrétoires surrénales. Les cellules de la crête neurale vont migrer selon deux-voies qui déterminent leur devenir, la voie dorso-ventrale qui donnera les cellules du système nerveux périphérique et la voie dorso-latérale qui donnera les mélanocytes.

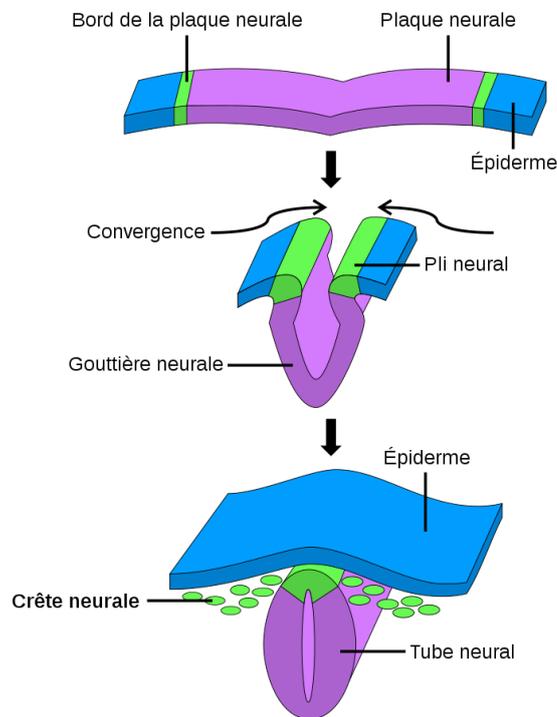


Figure 2. Fermeture du tube neural et émergence des cellules de la crête neurale.(15)

Lors de la neurulation les bords de la plaque neurale vont se rapprocher puis fusionner pour former le tube neural qui donnera le système nerveux central. La crête neurale ainsi formée par l'accolement des plis neuraux donnera naissance aux cellules à l'origine des mélanocytes et de nombreux autres sous-types cellulaires, qui vont migrer le long de l'axe embryonnaire.

Bien que certains dérivés des crêtes neurales soient spécifiquement issus de segments précis du tube neural, les précurseurs mélanogéniques et neurogéniques sont produits tout le long de l'axe embryonnaire. Les mélanoblastes vont se répartir dans l'ensemble de la peau en traversant le derme, l'épiderme puis éventuellement les follicules pileux.

Dans les follicules pileux, les mélanoblastes vont donner deux populations cellulaires distinctes, l'une située à la partie inférieure du follicule où ils se différencient en mélanocyte mature produisant de la pigmentation dans les poils et cheveux. L'autre réside dans une niche spécialisée appelée bulbe où les cellules souches mélanocytaires vont constituer une réserve cellulaire pour le renouvellement mélanocytaire du follicule.

Les mélanoblastes restant dans l'épiderme contribuent à la pigmentation cutanée. Un mélanocyte va établir des contacts cellulaires avec les kératinocytes voisins, environ 30 à 40,

formant des unités de mélanisation, à travers lesquelles les mélanosomes sont transférés vers les kératinocytes.

La localisation, le nombre et la répartition des mélanoblastes est régulée dans le temps et l'espace. Lors de la migration à travers le derme, l'épiderme et finalement dans le follicule pileux, les mélanoblastes reçoivent des signaux développementaux distincts, ce qui implique que le contexte environnemental va déterminer les taux de survie, de prolifération et la différenciation. Ces étapes aboutissant à la cellule effectivement capable de produire de la mélanine sont finement régulées par l'interaction avec les cellules dorsales du tube neural, l'ectoderme et les kératinocytes. (14)

Pour devenir des mélanocytes fonctionnels durant l'embryogenèse, les cellules de la crête neurale sont soumises à une cascade de stimulations sous l'effet de différents facteurs dont le MITF (Microphthalmia-Associated Transcription Factor) qui active la transcription de gènes codant pour des enzymes-clés de la mélanogenèse (dont tyrosinase) et le gène *PAX3* (*PAIRED BOX 3*) qui a un rôle dans la différenciation mélanocytaire. L'expression du gène *MITF* est elle-même régulée par de nombreux facteurs comme *PAX3*, *SOX10*, *FOXD3* et *CREB*. En l'absence de MITF la souris, blanche du fait de l'absence de mélanocytes, présente une microphthalmie par anomalie de l'épithélium pigmenté rétinien (RPE). (16)

Le récepteur à la tyrosine kinase situé à la surface des mélanocytes, appelé KIT, et son ligand, le SCF (Stem Cell Factor) produit par les kératinocytes, sont également impliqués dans la prolifération et la survie des mélanoblastes. Enfin, le produit du gène *SLUG*, le récepteur de l'endothéline B (EDNRB) et son ligand, l'endothéline 3 (EDN3), semblent également intervenir dans la différenciation et la survie mélanocytaire. En pathologie, les mutations des gènes codant ces protéines sont responsables du piebaldisme (mutations du gène *c-kit*) et du syndrome de Waardenburg. (14)

### **I.1.2 Pathologies de la migration des mélanocytes**

Les affections touchant les cellules dérivées des crêtes neurales sont regroupées sous le terme de neurocristopathies. Parmi celles-ci, celles qui nous intéressent plus particulièrement sont celles qui affectent les mélanocytes et plus particulièrement associées à un défaut de migration des mélanocytes.

Le piebaldisme se présente cliniquement par des macules hypopigmentées irrégulières, bien démarquées. Le signe typique et classique de l'affection est une mèche blanche médiane antérieure, souvent associé à une zone en V de dépigmentation au milieu du front (Figure 3).

Cette affection est liée aux variants pathogènes de *KIT*, associé à une transmission autosomique dominante.

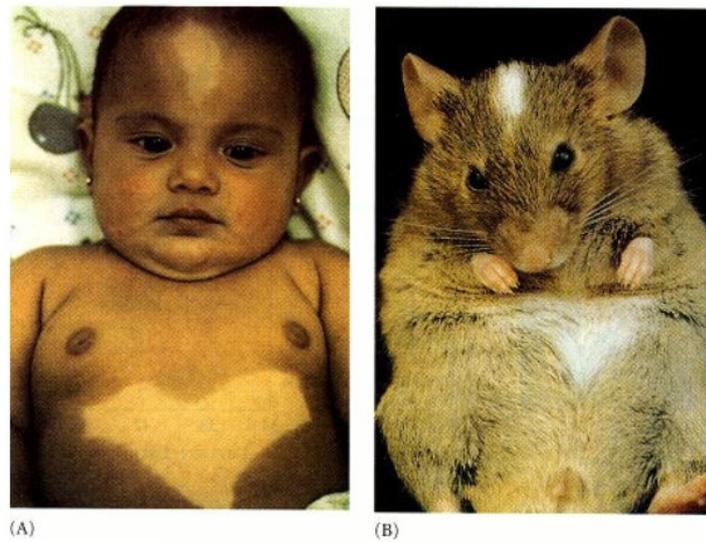


Figure 3. Piebaldisme lié au gène *KIT* chez l'humain (A) et la souris (B). (17)

Notez la similitudes des aires d'hypopigmentation médianes au niveau facial et abdominale entre le patient (A) et le modèle murin (B) porteurs de variants pathogènes du gène codant *KIT*.

Le syndrome de Waardenburg est caractérisé par l'association d'une leucodermie et d'une surdité neurosensorielle. Cette association est caractéristique d'un défaut de prolifération, survie, migration ou différenciation des mélanocytes. (18) Au niveau de la peau il existe des aires hypopigmentées, et l'on peut observer une mèche blanche médiane antérieure et/ou un blanchissement précoce des cheveux avant 30 ans. Au niveau des yeux on peut observer une hétérochromie totale ou partielle, ou une couleur bleu profond des iris (Figure 4a). Une hypopigmentation rétinienne peut parfois se voir, en regard de l'hypopigmentation irienne (Figure 4b).

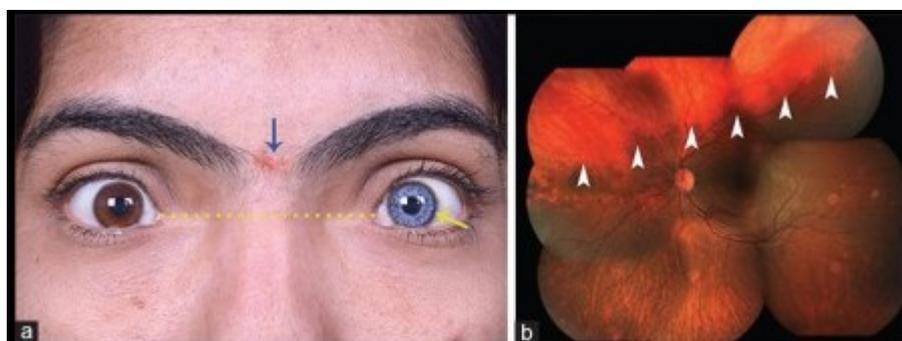


Figure 4. Syndrome de Waardenburg.

Syndrome associé à une dysmorphie faciale caractéristique pouvant associer a) Hétérochromie irienne (Flèche jaune) et télécanthus (pointillés). Un synophris peut être associé (flèche bleue) b) Fond d'oeil montrant la jonction entre la choroïde normale et la choroïde hypopigmentée (pointes de flèches). (19)

La surdité affecte 60 à 90% des patients avec une sévérité inter et intra-familiale variable, allant de la surdité profonde à l'hypoacousie post-linguale progressive. Ce syndrome rare est

néanmoins responsable de 1 à 3% des surdités congénitales. S'y associent des anomalies de l'oreille interne à type de dilatation de l'aqueduc vestibulaire et des malformations des canaux semi-circulaires (absence ou dilatation).

Il en existe plusieurs types différents :

- Le Type I (WS1) ou forme classique associe les anomalies de pigmentation, la surdité et une dysmorphie faciale à type de dystopie des canthi (écartement excessif des fentes palpébrales sans élargissement de la distance interorbitaire) avec parfois un synophris, (Figure 4a)
- Le type II (WS1) correspond au type I mais sans dystopie des canthis,
- Le type III (WS3) : correspond au type I avec anomalies musculo-squelettiques des membres supérieurs,
- Le type 4 (WS4) ou syndrome Waardenburg-Shah correspond au type I avec maladie de Hirschprung (défaut de migration des cellules ganglionnaires rectales induisant une aganglionose plus ou moins étendue du rectum entraînant une constipation opiniâtre).

Plusieurs gènes sont impliqués dans ce syndrome : *PAX3* (WS1,3), *MITF* (WS2) et *EDN3*, *EDNRB*, *SOX10* (WS4).

## I.2. Les mélanosomes

Les mélanocytes fabriquent des granules pigmentés appelés mélanosomes. Les mélanosomes sont trouvés dans les mélanocytes de la peau, des poils et des yeux mais aussi dans les cellules pigmentées épithéliales de la rétine, l'iris et les corps ciliés de l'œil.

Pour exercer leur fonction photoprotectrice, au niveau de la peau, les mélanosomes matures intacts passent des mélanocytes basaux vers les kératinocytes et intègrent leur compartiment lysosomal pour donner ensuite de la poudre de mélanine au niveau des couches supérieures de l'épiderme. Au contraire, dans les follicules pileux, les granules mélanocytaires tendent à rester intacts dans le poil, ce qui est particulièrement le cas pour les grains d'eumélanine observés dans les cheveux noirs notamment des populations orientales. Les granules phéomélanogéniques, caractéristiques des cheveux blonds et roux sont eux partiellement digérés. Ces deux types de granules peuvent être générés à partir d'un même mélanocyte. (13)

Les mélanosomes sont des organelles intracellulaires de la famille des Lysosome-Related-Organelles (LRO) appartenant au système endocytique et sécrétoire, très conservé chez tous les eucaryotes, et qui permet le tri et l'adressage des molécules au compartiment approprié ainsi que la maturation des différentes organelles impliquées. Les LRO sont proches des lysosomes conventionnels en ce qu'elles dérivent du système endocytique, possèdent un pH interne acide et un certain nombre de protéines lysosomales. Certaines LRO sont plutôt des lysosomes

modifiés, tandis que les LRO qui nous concernent ici coexistent avec les lysosomes et exercent des fonctions très spécialisées. Les cellules possédant ces LRO spécifiques doivent emprunter des voies alternatives pour amener les protéines nécessaires à leur fonctionnement (leur cargo) du système endocytique classique vers les LRO spécialisées. Tout défaut dans les mécanismes de maturation des LRO et d'adressage des cargos entraînera donc un déficit de ceux-ci et une pathologie subséquente. Le LRO le plus étudié est le mélanosome, et les mécanismes spécifiques s'appliquant au trafic des cargos vers les mélanosomes sont communs aux LRO d'autres types.(20)

### I.2.1 Formation des mélanosomes

Les mélanosomes contiennent les enzymes permettant la synthèse des mélanines à partir de Tyrosine, ainsi qu'une matrice fibrillaire composée de la protéine PMEL (PreMELanosome protein). Quatre stades sont nécessaires pour aboutir à la formation de mélanosomes matures pigmentés, reconnaissables à la microscopie électronique à transmission (MET) (Figure 5). (21)

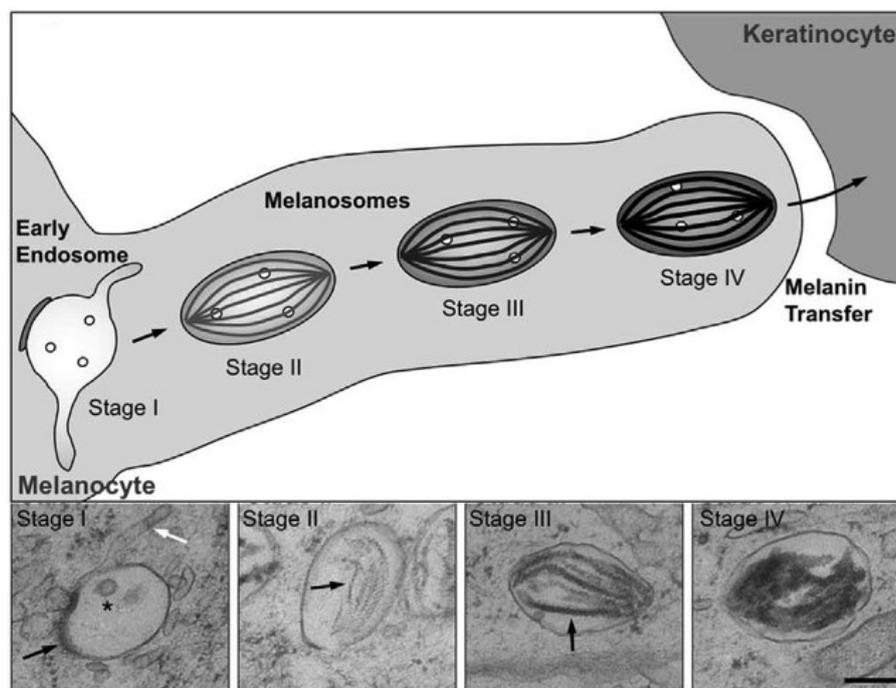


Figure 5. Stades de formation des mélanosomes. Les 4 stades successifs schématisés en haut sont reconnaissables en microscopie électronique (panels bas). (22) Au Stade I on observe les vésicules intra-luminales (ILV) (\*), au stade II apparition des fibrilles amyloïdes (flèche noire), au stade 3 les fibrilles s'épaississent (flèche noire) au stade 4 le mélanosome est entièrement obscurci.

Les mélanosomes de stade I sont des endosomes précoces contenant des vésicules intra-luminales (ILV). On les distingue des autres endosomes précoces par leur contenu en fibrilles amyloïdes composées de la protéine PMEL, émergeant des ILV. Ces fibrilles s'organisent en couches parallèles et forment une matrice qui caractérise l'endosome de stade II. La lipoprotéine ApoE jouerait un rôle dans l'organisation fibrillaire (20). La synthèse de mélanine

commence à ce stade par l'acheminement au mélanosome des enzymes clés tels que tyrosinase et TYRP1, ainsi que d'autres acteurs tels ATP7A (transporteur du cuivre) et OCA2. Le transport des protéines se fait par trafic vésiculaire ou tubulaire et résulte dans le dépôt de la mélanine sur les fibrilles. Ceci conduit à l'épaississement et assombrissement des fibres de la matrice qui définit le stade III. Le stade IV est atteint lorsque toutes les structures sont obscurcies. (21)

La maturation des mélanosomes requière l'arrivée des enzymes mélanogéniques au mélanosome de stade II. La plupart des protéines du mélanosome sont des glycoprotéines membranaires synthétisées par les ribosomes du réticulum endoplasmique où a lieu leur repliement. Les protéines correctement repliées vont pouvoir transiter par le Golgi avant d'atteindre leur destination, le mélanosome.(20)

L'arrivage des enzymes et transporteurs membranaires dans les mélanosomes en cours de maturation se fait par au moins deux voies distinctes, dépendantes de deux familles de complexes distincts. Ces voies dépendent de signaux d'adressages spécifiques. Les signaux d'adressages de TYR, TYRP1 et OCA2 sont conformes à une séquence consensus dite dileucine acide [D/E]XXX[L/I]. Le signal dileucine acide permet la liaison aux sites conservés des complexes protéiques adaptateurs (AP). Les AP sont une famille de 5 complexes qui servent d'adaptateurs solubles de tri, recrutés aux membranes puis se liant à leur cargo pour ensuite les regrouper dans des domaines membranaires. Dans les mélanocytes, les complexes AP1, 2 et 3 ont été impliqués dans le trafic des cargos vers les mélanosomes. AP1, 2 et 3 permettent la liaison à la clathrine ce qui permet l'intégration des cargos dans des vésicules recouvertes de clathrine, par bourgeonnement des domaines membranaires Golgiens, de surface cellulaire et des endosomes, respectivement. On trouve notamment OCA2 et Tyrosinase dans des vésicules et tubules recouvertes d'AP1 et AP3. La deuxième voie de transport des enzymes mélanogéniques, indépendante des complexes AP, est dépendante des 3 complexes BLOC (Biogenesis of Lysosome-Related-Organelles Complex, 1, 2 et 3). Tyrosinase est principalement acheminée par une voie requérant le complexe AP3 mais pas le complexe BLOC-1, tandis que TYRP1, OCA2 et une portion mineure de TYR requièrent BLOC-1 et nécessitent un recyclage tubulaire des intermédiaires de transport impliquant le complexe AP1 et le moteur microtubulaire KIF13A. D'autres effecteurs du transport mélanosomal RAB32 et RAB38 et leur échangeur, le complexe BLOC3, sont probablement impliqués dans cette voie. Le complexe BLOC2, dont le rôle est moins bien élucidé semble également impliqué dans la voie de transport dépendante de BLOC-1. (21,23)

Outre les mélanosomes, dans la famille des LRO on trouve les granules denses plaquettaires, les corps lamellaires dans l'épithélium type II pulmonaire et les endosomes de signal dans les

cellules dendritiques plasmacytoïdes. Ainsi une atteinte des voies de synthèse de ces LRO pourra à la fois conduire à un défaut de pigmentation et à d'autres atteintes systémiques associées, observées dans les formes d'albinisme syndromique que sont les syndromes d'Hermansky-Pudlak (HPS) et le syndrome de Chediak-Higashi (CHS).

## **I.2.2 Pathologies de la biogenèse des mélanosomes et autres Lysosome-Related-Organelles**

### **I.2.2.1 Syndrome de Chediak-Higashi (CHS)**

Le CHS (OMIM #214500 ; Online Mendelian Inheritance in Man®, <https://www.omim.org/>) (24) est une maladie autosomique récessive, létale, liée aux variants pathogènes du gène *LYST*. Les pertes de fonctions de *LYST* résultent en une diminution de la fission des lysosomes et probablement des LRO (dont le mélanosome fait partie).

Le CHS associe un albinisme oculocutané, un déficit immunitaire et une diathèse hémorragique modérée. (25) L'hypopigmentation cutanéophanérianne est en général modérée, avec des individus moins pigmentés que leurs apparentés. Classiquement les cheveux ont un aspect particulier, argentés ou aux reflets métallisés et l'analyse microscopique des cheveux révèle des amas pigmentaires caractéristiques (Figure 6A et B.). Cependant, certains individus ont été rapportés avec CHS sans albinisme. (26) Le modèle murin *beige* (*bg*) présente un phénotype similaire (Figure 6D). (27)

Le déficit immunitaire s'exprime par une susceptibilité accrue aux infections notamment respiratoires et cutanées. Environ 85% des patients développent une lymphohistiocytose hémophagocytaire ou phase accélérée, un syndrome hyper-inflammatoire mortel en absence de greffe de moelle osseuse. Tous les patients survivants présentent des troubles neurologiques dans l'enfance ou au début de l'âge adulte, associant troubles cognitifs, neuropathie périphérique, ataxie et syndrome parkinsonien. Le diagnostic peut être étayé biologiquement par la mise en évidence d'inclusions géantes dans les polynucléaires neutrophiles ou plus rarement dans les lymphocytes (Figure 6C), observables au frottis sanguin. Il existe également des anomalies de fonction des cellules NK et des neutrophiles qui peuvent être en nombre normal ou réduit. S'y associe un déficit total ou partiel en granules denses plaquettaires, avec une morphologie anormale, se traduisant de façon modérée par des saignements spontanés (épistaxis, ecchymoses faciles, saignement gingivaux) ou excessifs lors d'interventions chirurgicales.

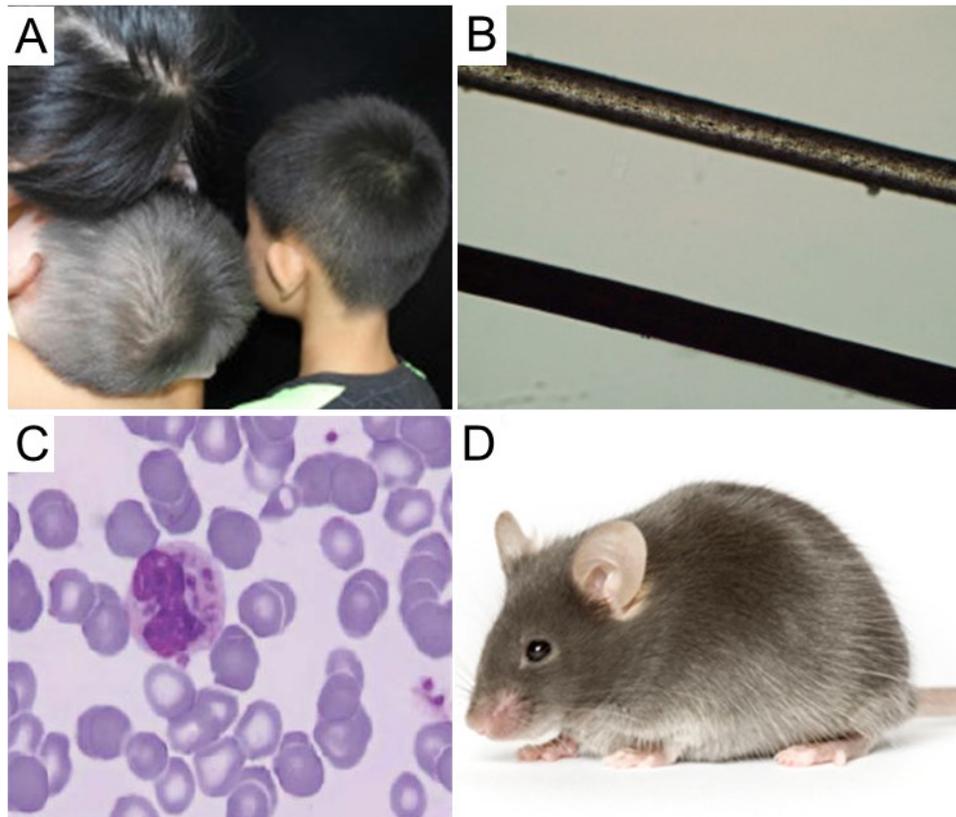


Figure 6. Atteintes du gène *LYST*. A. Aspect argenté des cheveux d'un patient atteint de CHS comparé à sa mère et son frère non atteints B. Cheveux présentant des amas pigmentaires (haut) du patient CHS comparé à un cheveu de son frère. C. Polynucléaire neutrophile avec inclusion géante. D. Modèle murin *beige* avec variant pathogène homozygote de *Lyst* ( $Lyst^{bg-J}/Lyst^{bg-J}$ ) (28,29)

### 1.2.2.2 Syndrome d'Hermansky-Pudlak (HPS)

Les syndromes Hermansky-Pudlak associant AOC à diathèse hémorragique, sont liés à un défaut de formation des mélanosomes et des granules denses plaquettaires. Certaines formes d'HPS associent également une fibrose pulmonaire probablement due à un défaut des corps lamellaires. Il existe également chez certains patients des déficits immunitaires causés par des anomalies touchant les LROs ou le tri moléculaire dans les cellules de l'immunité innée et adaptative.

L'HPS est rare, touchant approximativement 1 à 9 individus sur 1 million, dans l'ensemble du globe. A l'instar de l'albinisme non syndromique, il existe des régions du monde où cette fréquence est bien plus élevée avec des variants récurrents liés à effet fondateur. C'est le cas de Puerto Rico où l'HPS1 est particulièrement fréquent dans la région nord-ouest et où l'HPS3 est rencontré dans la région centrale. (30)

Avant cette thèse, on répertoriait 10 formes humaines d'HPS pour chacune desquelles il existe un modèle murin et au moins 6 modèles murins supplémentaires avec des phénotypes similaires.

Les protéines des 10 HPS humains et de 13/15 HPS murins sont des sous-unités appartenant à 5 complexes distincts : Class C VPS, AP3, BLOC-1, 2 et 3.

#### I.2.2.2.1 Class C VPS

Le Class C VPS (Vacuolar Protein Sorting), mieux connu chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, est un composant du complexe HOPS (Homotypic Fusion and Vacuole Sorting) constitué de 4 sous-unités. Dans la levure le complexe HOPS facilite l'arrimage des vésicules recouvertes d'AP3 à la vacuole. Le complexe HOPS des mammifères intervient dans les événements de fusions des endosomes et des lysosomes.

Un variant pathogène de la sous-unité codée par le gène *VPS33A* est responsable du phénotype HPS chez la souris *buff* (Figure 7) et plusieurs variants de sous unités du Class C VPS entraînent des défauts de LRO chez des modèles de souris, drosophiles et nématodes. (21)



Figure 7. Souris *buff* porteuse de variants pathogène de *VPS33A* (droite) présentant un pelage hypopigmenté brun, comparé à la souris sauvage noire (gauche) (31)

En revanche les mutations de *VPS33B* (OMIM \*608552) chez l'humain sont responsables d'un syndrome avec arthrogrypose, dysfonction rénale, et cholestase sans albinisme.

#### I.2.2.2.2 Complexe AP-3

Le complexe hétéro-tétramérique AP3 est exprimé de façon ubiquitaire. Il comprend les sous-unités  $\beta 3A$ ,  $\mu 3A$ ,  $\sigma 3$  et  $\delta$ . Dans le cerveau uniquement, les sous-unités  $\beta 3A$  et  $\mu 3A$  sont remplacées par leurs homologues  $\beta 3B$  et  $\mu 3B$  formant le complexe AP-3B.

AP3 est requis pour l'adressage de TYR et OCA2 au mélanosome natif. TYR est localisé dans les bourgeonnements des endosomes recouverts de AP1 et AP3. Des quantités significatives d'OCA2 et TYR sont délocalisées dans les mélanocytes génétiquement déficients en AP3. TYRP1 interagit avec AP1 mais pas AP3 *in vitro* et est donc retrouvé au bon endroit dans les cellules AP3-déficientes mais délocalisé dans des cellules AP1-déficientes. AP1 est également nécessaire au positionnement des endosomes à la périphérie des mélanosomes en cours de maturation, AP2 est nécessaire à l'acheminement de PMEL aux endosomes et à l'accumulation des mélanosomes dans les mélanocytes. (21)

*AP3B1* (anciennement *ADTB3A*) codant pour la sous-unité  $\beta 3A$ , est impliqué dans le HPS-2 (OMIM #608233) humain et la souris «*Pearl*» (Figure 8).

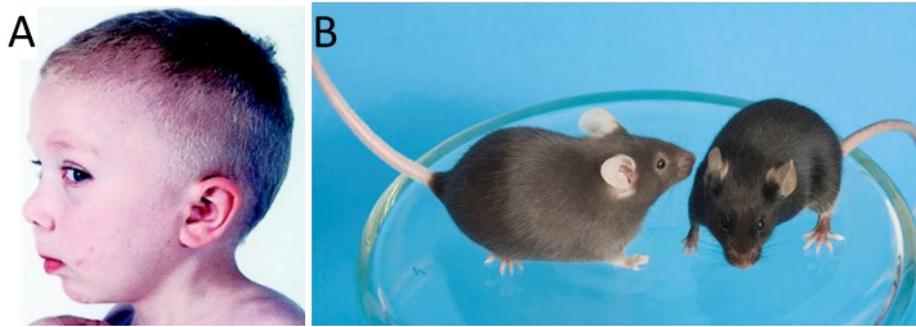


Figure 8. Atteintes d'*AP3B1*. A. Patient de 5 ans, atteint d'HPS2 par variants pathogènes dans *AP3B1*.(32) B. Souris Pearl (gauche) présentant un pelage hypopigmenté comparé à la souris WT (droite) (33)

Il s'agit du 2<sup>ème</sup> gène découvert comme impliqué dans l'HPS. Initialement rapporté chez deux frères hétérozygotes composites pour une délétion de 63 paire de base (pb) et un variant faux sens d'*AP3B1*, présentant un phénotype d'HPS (34), puis chez des patients présentant également des atteintes immunitaires sévères. (32,35) En novembre 2019, 35 patients et 29 variants pathogènes différents étaient décrits dans la littérature. (30) Chez ces patients, un trouble dysimmunitaire sévère est induit par une anomalie du trafic lysosomal, entraînant un défaut de sécrétion de granules lytiques dans les lymphocytes T cytotoxiques. Cette sécrétion est indispensable pour la lyse des cellules infectées par des pathogènes, mais également pour la lyse des cellules présentatrices d'antigène pour réguler la réponse immunitaire. En l'absence de régulation, l'activation constante des lymphocytes T entraîne une production excessive de cytokines et ainsi une activation macrophagique, impliquée dans la lymphohistiocytose hémophagocytaire, létale. *AP3* est donc impliqué dans la formation des polynucléaires neutrophiles, les cellules déficientes en *AP3* ont une localisation aberrante de protéines granulaires telles que la myéloperoxydase, l'élastase, et la protéine membranaire lysosomale CD63. Il est probable que l'HPS2 soit sous-diagnostiqué du fait de la présentation dysimmunitaire qui peut être au premier plan, avec des décès précoces.

L'atteinte d'*AP3B2*, codant la sous-unité neuro-spécifique  $\beta 3B$  entraîne une encéphalopathie épileptique avec atrophie optique (OMIM 617276), sans aucune atteinte mélanocytaire, plaquettaire ou immunitaire.

La sous-unité  $\delta$  est codée par *AP3D1* (OMIM \*607246) et donne une forme d'HPS avec lésions neuronales lié à la perte du complexe cérébrospécifique de *AP3*, en plus de la forme ubiquitaire, chez la souris *Mocha* et dans l'HPS-10. Il s'agit d'une forme très rare avec un premier patient

rapporté avec variant pathogène de *AP3D1*, présentant un albinisme, une neutropénie et un déficit immunitaire comme dans l'HPS-2, mais également un retard global de développement sévère, des crises convulsives généralisées et une hypoacousie. Ce patient malheureusement décédé des suites d'une infection pulmonaire à l'âge de 3 ans était porteur d'une délétion homozygote de 2pb dans l'exon 32 d'*AP3D1*. (36) En 2019 trois nouveaux patients, issus d'une même fratrie sont rapportés avec une délétion ponctuelle homozygote d'*AP3D1*, avec hypopigmentation modérée, albinisme oculaire, déficit en granules denses plaquettaires, déficit immunitaire et troubles neurologiques. Le frère aîné est décédé à l'âge de deux ans d'une pneumopathie, les sœurs jumelles sont décédées à 4 jours et 6 jours de vie. (37)

#### **I.2.2.2.3 Complexes BLOC : BLOC-1**

Il existe trois complexes nommés Biogenesis of Lysosome-related Organelles Complex (BLOC), BLOC-1, BLOC2 et BLOC3. Ces trois complexes sont impliqués dans des formes d'HPS de sévérités différentes.

BLOC-1 est composé de huit sous-unités dont 3 sont impliquées dans 3 HPS humains (HPS-7, 8 et 9) et 5 dans les HPS murins (*Cappucino*, *Muted*, *Pallid*, *Snapin*, *Dysbindin*). Trois sous-unités (BLOC1S1, BLOC1S2 et BLOC1S7) font également partie du complexe BORC (BLOC-1 Related Complex) impliqué dans le transport lysosomal. Les KO homozygotes de ces sous-unités chez les souris entraînent un phénotype très sévère voire une létalité, indiquant que le complexe BORC est probablement plus essentiel que BLOC-1. (38)

BLOC-1 est un complexe obligatoire. L'absence ou le dysfonctionnement d'une sous-unité de BLOC-1 entraîne la déstabilisation du complexe et la dégradation des autres sous-unités. (39) Ce complexe est bien conservé et dans des mélanocytes murins déficientes pour une des sous-unités, ne produisant pas de pigments, l'expression d'un transcrit humain normal de la sous-unité orthologue manquante, permet la restauration de la production de pigmentation. (40)

Les souris déficientes en BLOC-1 sont les plus hypopigmentées des modèles d'HPS. Ceci est lié en partie au rôle de BLOC-1 dans l'acheminement d'ATP7A, transporteur du cuivre, aux mélanosomes.

BLOC-1 fonctionne de concert avec AP3 dans les neurones et des associations de AP3 et BLOC-1 ont été montrées dans plusieurs types cellulaires. Dans les mélanocytes AP3 et BLOC-1 interagissent à différentes localisations des endosomes et régulent la localisation de différentes protéines au mélanosome : TYR dépend plutôt d'AP3 tandis qu'ATP7A et TYRP1 plutôt de BLOC-1. BLOC-1 faciliterait la sortie de TYRP1 des endosomes vers le mélanosome.

(38) Les HPS humains liés aux atteintes de BLOC-1 semblent relativement modérées et sont également des formes très rares avec très peu de patients décrits.

#### *DTNBP1* et HPS-7

L'HPS-7 est lié aux variants du gène *DTNBP1* ou *BLOC1S8* (OMIM 614076), codant la Dysbindin (Figure 9A). Le modèle murin de l'HPS-7 est nommé *Sandy* (Figure 9B). En novembre 2019 seulement 4 variants différents et 7 patients sont rapportés, tous homozygotes. (30) Il s'agit de variants non-sens ou de délétions induisant un décalage du cadre de lecture, prédisant une perte de fonction. Les patients décrits ne semblent pas présenter d'atteintes sévères pulmonaires ou immunitaires. Des variants hétérozygotes ont été identifiés grâce au séquençage haut-débit et associés à divers phénotypes notamment un variant non-sens hétérozygote observé chez un patient avec fibrose pulmonaire idiopathique.(30)

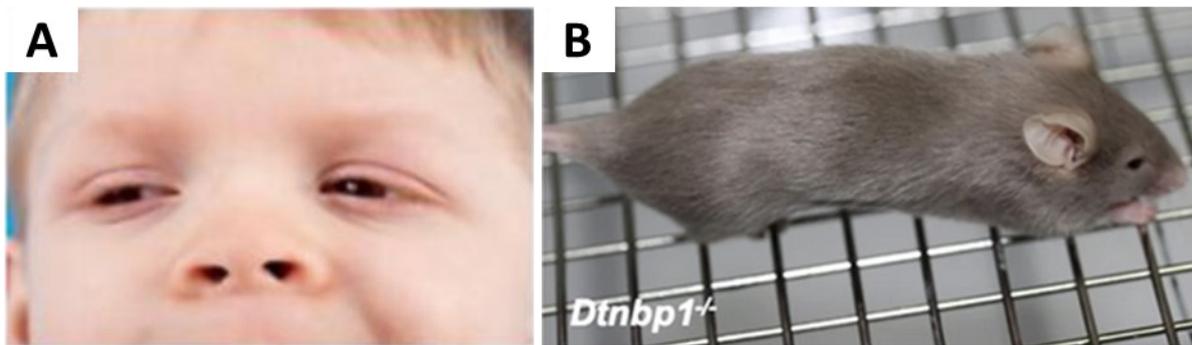


Figure 9. Phénotype HPS-7. A. Patient atteint d'HPS-7 avec hypopigmentation cutanéophanéarienne modérée. (41) B. Souris Sandy avec variant du gène *Dtnbp1* présentant un pelage hypopigmenté. (42)

#### *BLOC1S3* et HPS-8

L'HPS-8 est lié à l'atteinte de *BLOC1S3* chez l'humain, et le modèle murin orthologue est nommé *Reduced Pigmentation (rp)* (Figure 10E). Nous avons récemment rapporté 3 patients (43) (Figure 10A, B, C), portant le total de cas décrits à 10 patients (dont 6 d'une même fratrie) et 5 variants différents (Voir page 151 du présent manuscrit). Les variants rapportés sont 4 délétions induisant des décalages du cadre de lecture et un variant non-sens, observés à l'état homozygote chez nos patients. Les atteintes chez ces patients sont variables mais semblent plutôt modérées, bien que l'un de nos patients ait présenté un lymphome de Hodgkin à prédominance lymphocytaire, une forme rare et décrite chez 3 patients avec HPS-2. (44) Il n'y a pas d'atteintes pulmonaires, coliques ou dysimmunitaires autres rapportées chez ces patients, qui pour l'instant sont tous encore jeunes. (30)

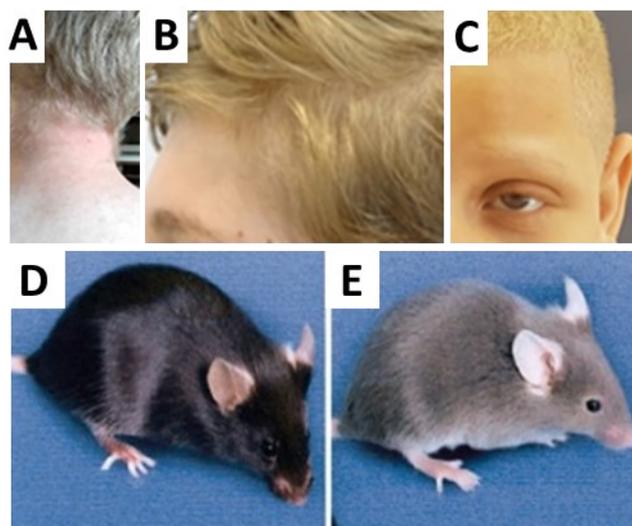


Figure 10. HPS-8. 3 patients avec atteintes de *BLOCIS3* (A, B, C) (43), souris WT noire (D) et souris *rp* hypopigmentée, porteuse d'un variant homozygote du gène *Bloc1s3* (E). (45)

### *BLOCIS6* et HPS-9

L'HPS-9 humain et la souris *Pallid* sont liés aux atteintes de *BLOCIS6* (OMIM 614171) codant la pallidine (Figure 11). La pallidine se lie à la Syntaxine 13, appartenant à la famille des protéines t-SNARE, qui est impliquée dans l'arrimage et la fusion vésiculaire. (45)

Seulement 3 patients étaient rapportés en novembre 2019, avec 2 variants, un non-sens et une duplication d'une base entraînant un décalage du cadre de lecture, à nouveau prédits comme entraînant une perte de fonction. Les patients rapportés présentent un HPS modéré, sans fibrose pulmonaire décrite à ce jour, mais 2 patientes présentent une atteinte immunitaire. (30)

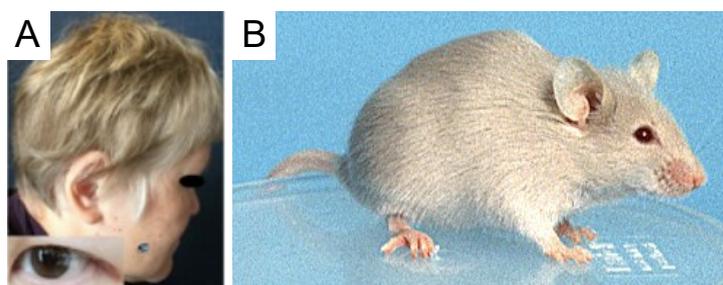


Figure 11. HPS-9. A. Patiente japonaise présentant un HPS-9. (46) B. Souris *Pallid* avec variants de *Bloc1s6*, présentant ne hypopigmentation franche. (47)

### **I.2.2.2.4 Complexes BLOC : BLOC-2**

Le complexe BLOC-2 est composé de 3 sous-unités, chacune responsable d'un HPS humain (HPS-3, 5 et 6) et murin (*Cocoa*, *ruby-eye-2*, *ruby-eye*).

BLOC-2 est situé sur les endosomes précoces et sur les transporteurs tels que BLOC-1, agissant hypothétiquement en aval de BLOC-1. L'interaction de BLOC-1 et BLOC-2 a été démontrée

par la génération de souris doubles homozygotes (*Bloc1s3*<sup>rp/rp</sup> et *Bloc2s3*<sup>ru/ru</sup>), présentant une hypopigmentation bien plus marquée que chaque simple homozygote (Figure 12).

Les doubles homozygotes pour 2 sous-unités BLOC-1 ou BLOC-2 ne sont pas plus hypopigmentées que les simples homozygotes. (45,48)



Figure 12. Souris avec diverses combinaisons mutationnelles de *Bloc1s3* (*rp*) et *Bloc2s3* (*ru*). (45) Comparées à la souris WT noire, les souris simples homozygotes *rp/rp* ou *ru/ru* présentent des hypopigmentations marquées. La souris *rp/rp* également hétérozygote *+/ru* semble légèrement plus hypopigmentée tandis que la double homozygote *rp/rp* et *ru/ru* présente une hypopigmentation majeure. Ceci traduit la complémentarité et non la redondance des complexes BLOC1 et BLOC2.

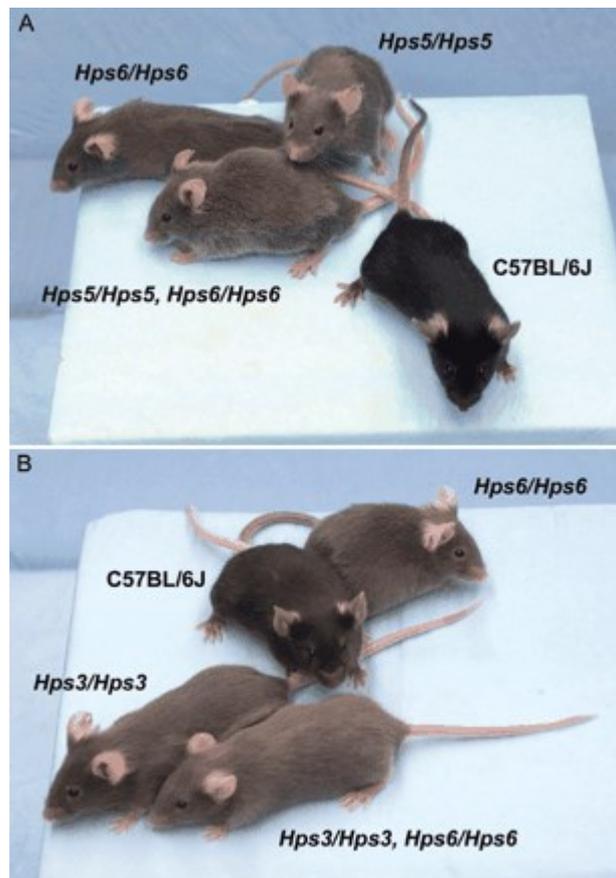


Figure 13. Souris avec combinaisons mutationnelles des sous-unités de BLOC-2. (48) Contrairement aux combinaisons mutationnelles précédentes (Fig. 12), toutes les compositions mutationnelles des sous-unités composant le complexe BLOC2 présentent une hypopigmentation similaire (comparées à la souris WT).

La fonction exacte de BLOC-2 est moins bien connue que celle de BLOC-1 mais il pourrait agir en liant les intermédiaires de transport à la membrane mélanosomale et en facilitant l'acheminement de ces intermédiaires jusqu'au mélanosome. BLOC-2 est localisé dans les tubules endosomaux des mélanocytes et interagit avec une cohorte de BLOC-1. TYR et TYRP1 sont délocalisés dans les mélanocytes BLOC-2-déficients. Dans des mélanocytes de patients mutés BLOC-2, TYR s'accumule dans des structures vésiculaires dans le cytoplasme suggérant un rôle de BLOC-2 dans la fusion des vésicules BLOC-1-dépendante aux mélanosomes. (21,23,38)

Dans les modèles murins avec déficit en BLOC-2, l'hypopigmentation est moins sévère que dans les déficits en BLOC-1. De même, les patients avec HPS-3, 5 et 6 semblent moins sévèrement hypopigmentés que dans les HPS7, 8 et 9. (43,49) Ces patients présentent un phénotype HPS modéré, sans fibrose pulmonaire ou immunodéficience de rapportée à ce jour, quelques patients présentent néanmoins des colites granulomateuses.

### HPS-3

L'HPS-3 chez l'humain et chez la souris *cocoa* (Figure 13B ; Figure 14) sont causés par des variants du gène *HPS3* ou *BLOC2S1* (OMIM 614072). Il est particulièrement fréquent dans la région centrale de Puerto Rico, du fait d'un variant récurrent par effet fondateur. Cela en fait un HPS relativement fréquent avec plus d'une centaine de patients rapportés dans le monde et 37 variants différents. (30)



Figure 14. HPS-3 chez une patiente chinoise. (50) L'hypopigmentation est peu marquée avec des cheveux bruns.

### HPS-5

L'HPS-5 humain et la souris *ruby-eye-2* (Figure 13A ; Figure 15) sont liés aux variants du gène *HPS5* ou *BLOC2S2* (OMIM 614074). Il y a 29 patients décrits dans le monde et 31 variants différents. (30,49)



Figure 15. HPS-5 chez un patient chinois. (51) L'hypopigmentation est peu marquée.

### HPS-6

L'HPS-6 humain (Figure 16) et la souris orthologue *ruby-eye (ru)*, (Figure 12 et Figure 13) résultent de variants bialléliques du gène *HPS6* ou *BLOC2S3* (OMIM 614075). Une soixantaine de patients et 45 variants sont décrits. (30)



Figure 16. HPS-6 chez 4 patients d'origine européenne. (52) L'hypopigmentation est peu marquée.

#### I.2.2.2.5 Complexes BLOC : BLOC-3

Le complexe BLOC-3 est un hétérodimère composé de deux sous-unités, dont la perte de fonction donne les HPS-1 et -4, la forme la plus fréquente de tous les HPS humains étant HPS-1. Les patients BLOC-3-déficients ont la forme la plus sévère de tous les HPS notamment du fait de l'apparition précoce de fibrose pulmonaire, de pronostic vital dramatique. Les mécanismes d'action de BLOC-3 sont pourtant les moins bien connus. L'hypopigmentation chez les patients HPS-1 est majeure. Chez la souris BLOC-3 déficiente (Figure 17), l'hypopigmentation de la fourrure et des yeux est moins sévère que celle touchant la peau glabre indiquant des voies de biogenèse du mélanosome différentes entre les mélanocytes folliculaires et interfolliculaires. La sévérité est encore plus marquée chez les doubles mutants avec KO homozygote d'une sous-unité de BLOC-3 et KO homozygote d'une sous-unité de BLOC-2 ou chez les KO de BLOC-3 et KO homozygote d'une sous-unité du complexe AP-3, suggérant que BLOC-3 fonctionne sur une voie séparée de ces deux autres complexes.

Le KO des sous-unités de BLOC-3 altère la distribution des endosomes tardifs et lysosomes suggérant un rôle primordial de BLOC-3 dans la motilité des organelles.

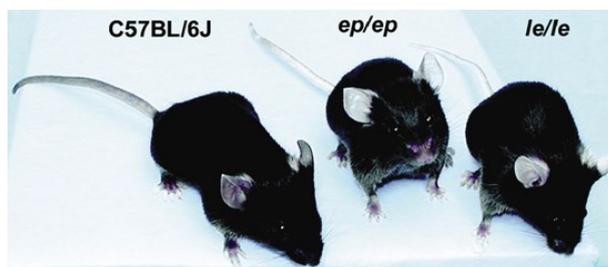


Figure 17. Souris orthologues de HPS-1 (*pale ears, ep*) et HPS-4 (*light ears, le*), qui présentent une hypopigmentation uniquement des oreilles et de la queue, comparées à la souris WT noire C57BL/6J. (53)

### HPS-1

Le gène *HPS1* (ou *BLOC3S1*, OMIM 203300) a été le premier gène identifié dans les formes syndromiques d'albinisme en 1996. L'inactivation de l'orthologue humain du gène *HPS1* chez la souris est responsable du mutant *pale-ears (ep)* (Figure 17). Seule la peau glabre de cette souris est hypopigmentée, tandis que chez l'humain les cheveux et poils sont sévèrement hypopigmentés (Figure 18). La découverte de ce gène a été permise par une agrégation de cas dans la région nord-ouest de Puerto-Rico, du fait d'un variant récurrent par effet fondateur. Il y aurait plus de 400 patients affectés à Puerto Rico, et plus d'une centaine dans le reste du monde, pour 76 variants différents. (30)



Figure 18. HPS-1 chez deux patients chinois avec hypopigmentation très visible au niveau des cheveux. (54)

### HPS-4

Le gène *HPS4* (ou *BLOC3S2*) est impliqué l'HPS-4 chez l'humain (OMIM 614073) et du phénotype *light ear* chez la souris (Figure 17). Beaucoup plus rare que l'HPS-1, avec une quarantaine de cas rapportés et 34 variants, la sévérité de l'HPS-4 est cependant similaire à l'HPS-1, bien qu'il existe une certaine variabilité d'expression au niveau pigmentaire (Figure 19). (30)



Figure 19. HPS-4 chez 5 patients avec hypopigmentation de sévérité variable. (55)

### I.3. Synthèse du pigment

#### I.3.1 Biochimie de la mélanogénèse

La mélanine est le pigment majoritaire intervenant dans la pigmentation animale. Ce pigment est conservé dans de nombreuses espèces dans tout le règne du vivant, des bactéries jusqu'aux mammifères. C'est un polymère non protéique, hétérogène et insoluble, composé d'unités issues de la modification de l'acide aminé L-tyrosine. (56)

Les 1<sup>ères</sup> étapes de synthèse des mélanines sont communes et limitantes, catalysées par l'enzyme Tyrosinase, codée par le gène *TYR*, spécifique des cellules pigmentées. La L-tyrosine est hydroxylée en L-DOPA (3,4-dihydroxyphenylalanine) qui est à son tour oxydée en DOPAquinone (DQ) le précurseur commun aux deux formes de mélanine (eumélanine, brun à noir et phéomélanine, jaune à orange). Des auteurs ont également démontré que la DQ peut être formée directement lors de la 1<sup>ère</sup> étape (Figure 20). Puis les voies de synthèse des deux types de mélanines se séparent. (56)

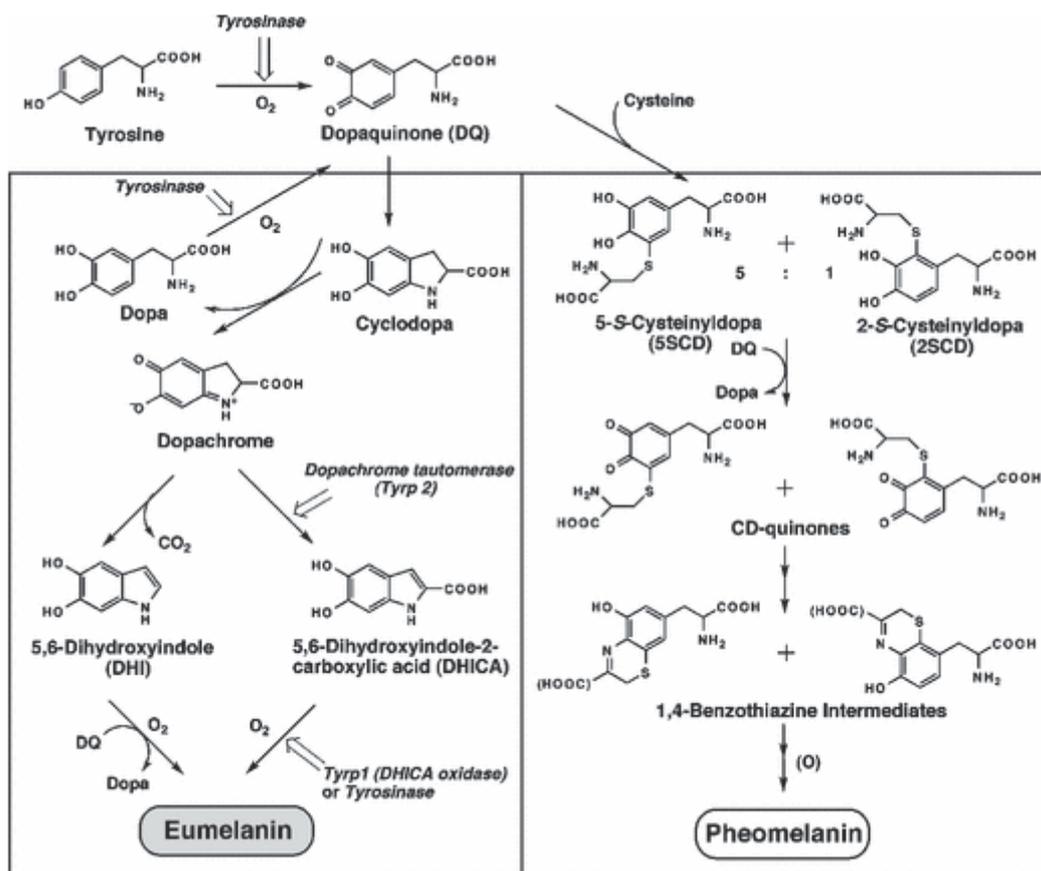


Figure 20. Voie de synthèse des Mélanines. (56)

##### I.3.1.1 Eumélanogénèse

L'eumélanine est un polymère hétérogène constitué d'un mélange d'unités de 5,6-dihydroxyindole (DHI) et 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylique (DHICA) à divers stades

d'oxydation faisant intervenir notamment deux enzymes TYrosinase-Related Protein-1 (TYRP1) et -2 (TYRP2) ou DopaChrome Tautomérase (DCT). La 1<sup>ère</sup> étape de l'eumélanogénèse est un phénomène relativement lent aboutissant à la formation de cyclodopa, rapidement oxydée en dopachrome. Ce dernier est un pigment rouge orangé à demi-vie courte, se décomposant spontanément par décarboxylation en DHI et DHICA avec un ratio de 70:1. En présence de DCT, le dopachrome est préférentiellement transformé en DHICA. Le ratio de DHICA par rapport au DHI dans les eumélanines naturelles est ainsi déterminé par l'activité de DCT. L'oxydation du DHI se produit par échanges oxydo-reductifs (redox) avec la DQ mais cette réaction semble moins efficace avec le DHICA, qui lui a besoin d'être oxydé par l'action directe de tyrosinase chez l'humain ou par TYRP1 chez la souris. A noter que chez l'humain TYRP1 ne peut pas catalyser l'oxydation du DHICA. Les activités de TYRP1 et TYRP2 affectent tout particulièrement la quantité et la qualité d'eumélanine produite. (56)

Il a été notamment montré que chez la souris *Slaty*, dont l'activité de DCT est réduite à 1/3 de l'activité de la souris noire WT, le poil contient un ratio de DHI/DHICA d'environ 3:1 contre un ratio de 1:3 dans le poil noir de la souris WT. (57) Le rôle de TYRP1 dans l'eumélanogénèse est plutôt la régulation du volume moléculaire de l'eumélanine, puisque la souris *brown*, dont l'activité de TYRP1 est déficiente, produit une eumélanine de plus bas poids moléculaire que la souris noire WT. Chez la souris l'enzyme TYRP1 a à la fois une activité de tyrosine hydroxylase et de L-DOPA oxydase, mais également de dopachrome tautomérase et de DHICA oxydase. Au contraire, la TYRP1 humaine ne montre qu'une activité tyrosine hydroxylase et pas d'activité DHICA oxydase ni dopachrome tautomérase. L'étude de l'activité enzymatique *in vitro* de ces protéines pourrait également ne pas refléter complètement les phénomènes qui surviennent *in vivo*. (58)

### **I.3.1.2. Phéomélanogénèse**

Pour la production de phéomélanine, la 1<sup>ère</sup> étape est l'ajout de la cystéine à la DQ pour former des isomères de cystéinyldOPA (CD) puis des échanges redox ont lieu entre CD et DQ créant la CD-quinone (CDQ) et de la DOPA. Les CDQ sont cyclisées par déshydratation donnant l'ortho-quinonimine (QI) ensuite réarrangée (avec ou sans décarboxylation) en 7-(2-amino-2-carboxyethyl)-5-hydroxy-2H-1,4-benzothiazine (BT) et 7-(2-amino-2-carboxyethyl)-5-hydroxy-2H-1,4-benzothiazine-3-carboxylic acid (BTCA) qui sont les deux précurseurs monomériques ultimes de la phéomélanine. Avant l'incorporation en phéomélanine, une petite partie de BT peut être modifiée pour former de la 7-(2-amino-2-carboxylethyl)-5-hydroxy-3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,4-benzothiazine (ODHBT) et du 6-(2-amino-2-carboxyethyl)-4-

hydroxy-benzothiazole (BZ). Les 3 unités monomériques (BT (et BTCA), ODHBT et BZ) sont polymérisées pour former la phéomélanine. (56)

*In vivo*, ces deux voies sont intimement mêlées en une mélanogénèse mixte aboutissant à un mélange des deux formes de mélanine. Il semble que dans des modèles cellulaires la production de phéomélanine soit constante quel que soit le niveau de pigmentation tandis que l'eumélanogénèse dépend du degré de pigmentation. La phéomélanine ne peut être produite que s'il existe des quantités suffisantes de cystéine disponible dans le mélanosome, et la balance entre production d'eumélanine et phéomélanine est modulées par voie enzymatique et en fonction du pH mélanosomal. (20)

### **I.3.1.3 Régulation du pH mélanosomal**

Le pH intramélanosomal est d'importance et des gènes impliqués dans la pigmentation sont impliqués dans la régulation de ce pH, notamment *OCA2*, *SLC24A5* et *SLC45A2*, ainsi que *ATP7A* et *TPC2*. Ces protéines seraient responsables d'échanges ioniques permettant l'abaissement du pH, Tyrosinase étant inactive en dessous d'un pH de 6. *OCA2* permettrait l'entrée d'anion (comme le Cl<sup>-</sup>) et *SL45A2* la sortie des H<sup>+</sup>. Le pH mélanosomal acide inhibe la fonction de TYR sans altérer l'expression son ARN messager (ARNm). Par ailleurs il a été observé que les pH des mélanosomes des personnes à peau claire est plutôt acide tandis que dans les peaux foncées il est plutôt neutre. L'augmentation du pH mélanosomal tendrait à orienter la mélanogénèse mixte vers l'eumélanine plutôt que la phéomélanine. Dans les cellules produisant plus de phéomélanine, il est noté une diminution de production de PMEL dont l'expression est fortement inhibée par Agouti. Les mélanosomes contenant majoritairement de la phéomélanine (phéomélanosomes) ont donc moins de fibrilles et un aspect plus irrégulier et arrondis que ceux qui contiennent plus d'eumélanine (eumélanosomes) qui sont eux ovalaires.

Tous les mélanosomes contiennent de la tyrosinase, mais seuls les eumélanosomes contiennent également les enzymes TYRP-1 et -2 qui permettent la stabilisation de tyrosinase.

De plus les ions Cu<sup>2+</sup> et Zn<sup>2+</sup> sont nécessaire au fonctionnement des protéines de la famille des tyrosinases (TYR, TYRP1 et TYRP2). TYR requiert du Cu<sup>2+</sup> tandis que TYRP2 nécessite du Zn<sup>2+</sup>. La liaison de TYRP1 à des ions métalliques n'est pas encore bien déterminée.

Ces 3 enzymes possèdent une structure commune avec un même domaine peptide signal N-Terminal, une région riche en cystéine intra-mélanosomale, un domaine catalytique tyrosinase-like contenant des acides aminés permettant la liaison à ces deux ions métalliques, un seul domaine transmembranaire en hélice alpha dans la partie C-Terminale et un domaine

cytoplasmique contenant le signal de tri et d'adressage au mélanosome. Elles partagent environ 40% de leur séquence d'acide aminés et 70% de similarité. La fonction exacte du domaine riche en cystéine n'est pas clairement élucidée, mais pour TYRP1, toutes les cystéines sont impliquées dans des ponts disulfures, indiquant un rôle dans le repliement de la partie intramélanosomale. (58)

#### **I.3.1.4 Régulation de l'expression des gènes mélanogéniques**

L'expression de *TYR* est modulée par la voie de signalisation du récepteur 1 à la Mélanocortine (MC1R)-cAMP (Adenosine MonoPhosphate cyclique) dépendante. MC1R est un récepteur membranaire couplé à une protéine G, présent sur les mélanocytes, qui reçoit le signal de la MSH (Melanocyte Stimulating Hormone) et via la voie AMPc-dépendante régule le MITF (Microphthalmia Associated Transcription Factor). A son tour le MITF module l'expression de *TYR*. Des variants du récepteur à la MSH, MC1R, entraînent des modifications de couleur du pelage chez la souris, comme le phénotype *recessive-yellow* ou à l'inverse le phénotype *sombre*. Le mélanisme, résultant en un pelage entièrement noir, observé spontanément chez des grands félins (Jaguar) ou sélectionné chez certains animaux domestiques, peut résulter d'un variant activateur de MC1R. (59) L'inactivation de MC1R est à l'inverse responsable d'absence d'eumélanine et, chez l'humain, les variants perte de fonction de ce gène sont impliqués dans la pigmentation particulière des individus roux, qui par ailleurs ont une sensibilité accrue aux UVs du fait de l'absence d'eumélanine. (60)

La fixation de la MSH à son récepteur peut être modifiée par la protéine Agouti qui en est un antagoniste. Agouti est un régulateur de la production des mélanines, qui tient son nom de l'animal *Dasyprocta Aguti*, un rongeur d'Amérique tropicale. Le pelage de cet animal a un aspect très particulier, brun moiré, facilitant le camouflage, observé chez de nombreux mammifères (notamment les rongeurs) à l'état sauvage. Cet aspect est lié à la présence d'une bande sub-apicale de phéomélanine encadrée par des bandes eumélaniques, constituant le phénotype sauvage. De nombreux variants du gène *Agouti* ont été décrits chez la souris, entraînant une couleur de pelage de jaune à noire. Seuls les mélanocytes du bulbe pileux sont affectés. La souris noire classiquement étudiée est en fait porteuse homozygote d'un variant *nonagouti*, ou allèle *a*, la souris sauvage étant agouti. Un autre variant classique de ce gène est la souris *lethal yellow*, hétérozygote pour un variant activateur d'agouti (allèle *A<sup>y</sup>*). Il s'avère donc que la perte de fonction des deux allèles de ce gène résulte en l'absence de formation de phéomélanine et entraîne un poil uniformément noir, tandis que la suractivation entraîne un poil uniformément jaune. La modulation fine de l'expression de ce gène permet l'alternance bande noire, bande jaune, bande noire, visible sur la fourrure des animaux agouti. Cette expression

alternante est présente au moment de la formation néonatale du poil mais également à la régénération de celui-ci après une perte spontanée ou provoquée d'un poil. (61) La régulation d'agouti est un phénomène naturel important et d'ailleurs, des éléments régulateurs d'Agouti chez le lièvre sont associés au changement saisonnier de couleur de pelage vers le blanc en région enneigée. (62) Bien que ce gène soit conservé chez tous les mammifères, il n'y a pas de phénotype de bande supapicale dans les poils d'humains. Des variants polymorphiques du gène orthologue humain ASIP (Agouti Signaling Protein, OMIM \*600201) semblent associés à la pigmentation cutané-phanérienne et à la susceptibilité au cancer cutané.

### I.3.2 Pathologies de la mélanogénèse

Les atteintes touchant les différentes enzymes et protéines de la voie de synthèse du pigment sont responsables d'albinisme oculocutané (OCA) dont 7 types étaient connus chez l'humain avant ce travail, liés à 6 gènes ainsi qu'un locus dont le gène n'est pas identifié à ce jour.

#### I.3.2.1 OCA1

L'OCA1 (OMIM #203100) est lié à l'atteinte du gène *TYR*, situé sur le chromosome 11, codant l'enzyme tyrosinase, enzyme clé de la synthèse des deux mélanines. La perte de fonction complète du gène entraîne donc une absence totale de pigmentation cutané-phanérienne et oculaire (Figure 21). L'activité enzymatique de tyrosinase est nulle. Le diagnostic est en général évident dès la naissance. La découverte du 1<sup>er</sup> variant de *TYR* responsable d'OCA1 humain date de 1989. (63)

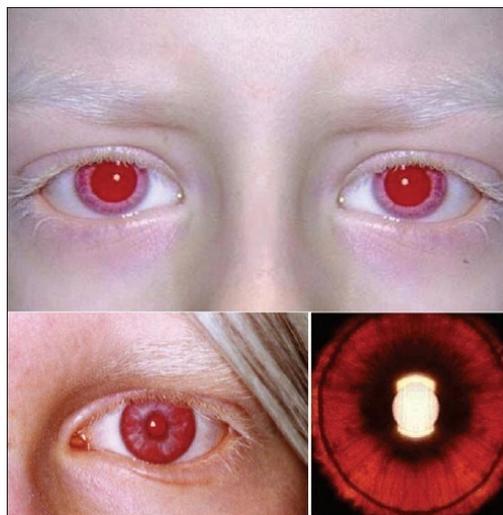


Figure 21. Aspect phénotypique caractéristique de l'OCA1, absence de pigmentation cutané-phanérienne, hypopigmentation et transillumination irienne complète. (64)

La souris de laboratoire albinos au pelage blanc et aux yeux rouges est porteuse d'un variant homozygote perte de fonction complète du gène orthologue *Tyr* (Figure 22).



Figure 22. Souris Homozygote pour l'allèle *Tyrc*-2J (c.291G>T p. Arg77Leu) présentant une absence de pigmentation irienne et cutané-phanérienne. (65)

Il existe cependant une certaine variabilité phénotypique, liée à des variants hypomorphes entraînant une forme plus modérée d'hypopigmentation anciennement nommé albinisme partiel, avec maintien partiel de l'activité enzymatique de tyrosinase (Figure 23). Les deux formes cliniques ont été distinguées en OCA1A (forme sévère) et OCA1B (forme modérée) mais il est désormais recommandé d'abandonner ce distinguo qui n'est en fait que le reflet du continuum phénotypique lié à l'existence de combinaisons alléliques de variants affectant l'activité de l'enzyme Tyrosinase à des degrés divers.



Figure 23. Aspect phénotypique de patients avec OCA1 présentant une hypopigmentation de sévérité variable (66)

Parmi les variants hypomorphes récurrents il en existe un particulièrement fréquent notamment chez les caucasiens et dont la pathogénicité a été longtemps controversée, le variant NM\_000372.4(TYR):c.1205G>A, couramment appelé R402Q. Ce variant est observé à une fréquence allélique de 17% à l'échelle mondiale dans la base de données de témoins GnomAD et chez les européens non finlandais à 27%. Il existe de nombreux individus porteurs de ce variant à l'état homozygote, ne présentant pas de phénotype d'albinisme. Cependant ce variant lorsqu'il se trouve en *trans* d'un variant pathogène de TYR, entraîne un albinisme modéré, comme l'a montré notre équipe. (67) La présence de ce variant entraîne une baisse d'activité tyrosinase à 37°C *in vitro* (27% par rapport à l'activité de l'allèle normal). (68) Il existe cependant des parents présentant le même génotype que leur enfant et n'ayant pas de phénotype particulier. Il existe peut-être des facteurs modificateurs expliquant la variabilité phénotypique de ces individus. Il a été montré qu'un haplotype rare contenant le variant R402Q ainsi qu'un autre variant fréquent le S192Y, est retrouvé de manière significativement plus fréquente chez des individus avec albinisme et un variant pathogène hétérozygote de TYR que dans la population générale. Le facteur pathogène au sein de cet haplotype n'est cependant pas identifié. (69) Il est à noter par ailleurs que notre équipe n'a pas trouvé d'effet additif des variants S192Y et R402Q sur le phénotype. (67) La question d'une perte de fonction de la Tyrosinase accrue liée à l'association des variants S192Y et R402Q par rapport à la présence du variant R402Q seul reste donc à creuser.

Il existe des variants dits thermosensibles (dont R402Q), entraînant une activité enzymatique de tyrosinase dépendante de la température : l'enzyme est moins active à 37°C qu'à des températures plus basses (31°C). (68) Ceci est parfaitement illustré par les chats siamois et diverses races à coloration dites « *seal point* » (Figure 24A) et par les souris « *Himalayan* » (Figure 24B) qui présentent une fourrure plus foncée aux extrémités (oreilles, museau), plus froides. Des patients ont également été rapportés avec des différences de pigmentation selon les zones plus ou moins chaudes du corps. (70)

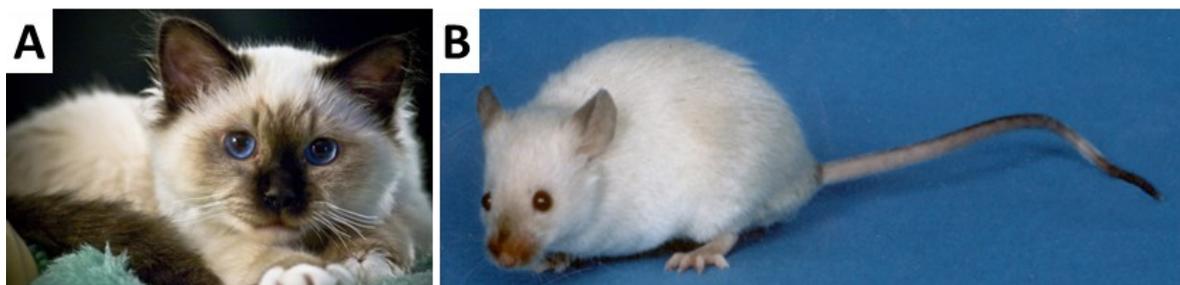


Figure 24. A. Chat sacré de Birmanie « *Seal point* ». B. Souris *Himalayan*, homozygote pour l'allèle c-h du gène *Tyr* (c.1259A>G p.His420Arg). (71) Ces deux modèles présentent une hypopigmentation qui varie en fonction des zones corporelles, les extrémités plus froides sont plus pigmentées, illustrant la thermosensibilité des variants du gène *Tyr*.

### I.3.2.2 OCA2

L'OCA2 est lié aux variants du gène *OCA2* (OMIM #203200), anciennement nommé gène *P*. OCA2 est impliqué dans la régulation du pH des mélanosomes. (72) C'est le gène le plus fréquemment touché dans les populations d'origine africaine, lié à un effet fondateur d'une délétion récurrente de 2,7 kb de l'exon 7 du gène. Les atteintes cutané-phanériennes liées à *OCA2* sont plus modérées que celles liées à une perte de fonction complète de *TYR*, avec une pigmentation plutôt jaune, traduisant un maintien de la production de phéomélanine modéré (Figure 25). A la naissance le phénotype peut évoquer un OCA1, cependant il existe une tendance à pigmenter avec l'âge, des nævi et des éphélides peuvent être observés, ainsi qu'une légère capacité à bronzer.



Figure 25. Aspect phénotypique de patients avec OCA2 avec hypopigmentation variable. (73)

La souris avec variant pathogène homozygote d'*Oca2*, nommée *Pink-eyed dilution* est également plus modérément atteinte (Figure 26).



Figure 26 . Souris homozygote pour l'allèle *Oca2*<sup>P-18J</sup> (g.56357112C>A p.A649D). (74)

Le gène *OCA2* est situé sur le chromosome 15, à proximité du locus des syndromes de Prader-Willi et Angelman. Ces syndromes, responsables de troubles neuro-développementaux sévères,

sont liés en majorité à une délétion hétérozygote interstitielle récurrente en 15q11.2. Le type de l'atteinte dépend de l'origine parentale du chromosome porteur de la délétion, du fait de la présence de gènes soumis à empreinte parentale. Une proportion significative de patients atteints de ces syndromes présente également un OCA2, lié à la présence d'un variant pathogène d'*OCA2* sur l'autre allèle. La découverte du gène responsable d'OCA2 a d'ailleurs été faite chez un patient atteint du syndrome de Prader-Willi, en 1993. (75)

### I.3.2.3 OCA3

L'OCA3 est lié à la perte de fonction du gène *TYRP1* (OMIM #203290). Décrit phénotypiquement dès la fin des années 70 chez des PVA du Nigeria, le gène a été rapporté initialement chez l'un de deux jumeaux d'origine afro-américaine en 1996. (76) Le phénotype, plutôt modéré, est caractérisé par un albinisme « brun » (*Brown OCA*) décrit chez les populations à peau noire présentant la peau et les cheveux brun clair et des iris bleus à gris. Une autre forme a également été décrite avec une coloration cuivrée de la peau, des cheveux roux et des iris bleus à bruns. Cette forme fût nommée ROCA pour *rufous oculocutaneous albinism*, avec une prévalence estimée à 1/8500 en Afrique du Sud (Figure 27). (77) L'OCA3 a maintenant été décrit dans diverses populations à travers le monde. (78)



Figure 27. Aspect phénotypique d'un patient caucasien avec OCA3. (73)

*TYRP1* est impliqué dans la voie des eumélanines expliquant le maintien de la production de phéomélanine. La souris avec variant homozygote du gène murin orthologue *Tyrp1* est nommée *brown* (Figure 28).



Figure 28. Souris homozygote pour l'allèle *Tyrp1*<sup>b-BTLR</sup> (g.80840778A>G p.Tyr296Cys). (79)

### I.3.2.4 OCA4

L'OCA4 est lié au gène *SLC45A2* ou *MATP* (*Membrane-Associated Transporter Protein* ; OMIM #606574), protéine transmembranaire, homologue par sa structure avec des protéines de transport de glucides ou dérivés glucidiques. Cette protéine est très conservée avec 82% d'homologie avec la protéine de la souris. (80) *SLC45A2* joue un rôle dans la neutralisation du pH mélanosomal, probablement à un stade de maturation mélanosomal plus avancé qu'OCA2. (72)

L'OCA4 est caractérisé par une hypopigmentation sévère pouvant se rapprocher des formes OCA1 et OCA2 (Figure 29). Il a été décrit en 2001 chez un patient d'origine Turque. (80) Il est également fréquemment observé chez les PVA d'origine Japonaise.



Figure 29. Phénotypes cutané-phanériens de plusieurs patients présentant différents variants du gène *SLC45A2*. (73)

Le modèle murin avec variant homozygote de *Slc45a2* est nommé *Underwhite* (Figure 30).

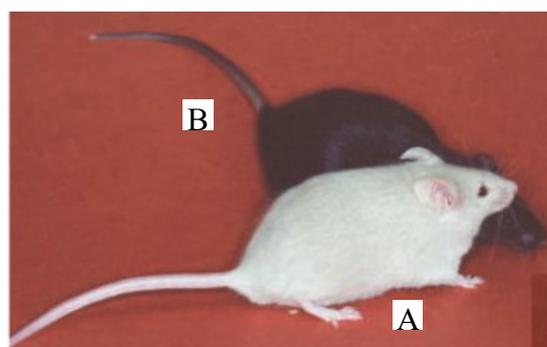


Figure 30. Souris homozygote pour l'allèle *uw* (*Underwhite*)(A), une délétion de 7pb de l'exon 3 du gène *Slc45a2* ou *Matp*, très hypopigmentée comparée à la souris WT (B). (81)

### 1.3.2.5 OCA5

L'OCA5 est une forme d'OCA sans gène identifié à ce jour. (82) Dans une grande famille consanguine d'origine Pakistanaise, des analyses de liaison ont pu identifier une région homozygote de 3.8Mb en 4q24 qui ségrégeait avec la maladie, mais aucun variant n'a pu être mis en évidence dans l'un des 14 gènes de cet intervalle à ce jour (Tableau 1).

Gène	OMIM	Protéine	Maladie humaine (OMIM) (24)	Hypopigmentation souris KO
<i>EMCN</i>	608350	ENDOMUCIN	NR	Non
<i>EMCN-IT3</i>	-	ARN non codant	NR	NR
<i>PPP3CA</i>	114105	CALCINEURIN A	Arthrogrypose, fente palatine, craniosténose, trouble neurodéveloppemental AD ; Encéphalopathie épileptique AD	Non
<i>FJL20021</i>	-	ARN non codant	NR	NR
<i>BANK1</i>	610292	B-CELL SCAFFOLD PROTEIN WITH ANKYRIN REPEATS 1	NR - association de certains polymorphismes avec des pathologies auto-immunes	Non
<i>SLC39A8</i>	608732	SOLUTE CARRIER FAMILY 39 (ZINC TRANSPORTER), MEMBER 8	Trouble congénital de la glycosylation, type IIa, AR	NR (létalité anténatale)
<i>NFKB1</i>	164011	NUCLEAR FACTOR KAPPA-B, SUBUNIT 1	Déficit immunitaire commun variable, 12, AR	Non
<i>MANBA</i>	609489	MANNOSIDASE, BETA A, LYSOSOMAL	Mannosidose beta, AR	Non
<i>UBE2D3</i>	602963	UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME E2D	NR	Non
<i>AK093356</i>	-	ARN non codant	NR	NR
<i>CISD2</i>	611507	CDGSH IRON SULFUR DOMAIN PROTEIN 2	Wolfram syndrome 2, AR	Non
<i>SLC9B1</i>	611527	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> EXCHANGER DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 1	NR	Non
<i>SLC9B2</i>	611789	NA <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> EXCHANGER DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 2	NR	Non
<i>BDH2</i>		type 2-hydroxybutyrate dehydrogenase	NR	NR
<i>CENPE</i>	117143	CENTROMERIC PROTEIN E	?Microcéphalie 13, primaire, AR (une seule famille)	NR (létalité anténatale)
<i>TACR3</i>	162332	TACHYKININ RECEPTOR 3	Hypogonadisme hypogonadotrophique 11 avec ou sans anosmie, AR	Non

Tableau 1. Gènes situés dans le locus associé à l'OCA5. AD : Autosomique dominant, AR : Autosomique Récessif ; NR : Non rapporté (absent de OMIM, PubMed, MGI, IMPC au 15/11/2020).

### I.3.2.6 OCA6

L'OCA6 est lié aux variant de *SLC24A5* aussi nommé *NCKX5* (OMIM \*609802). L'hypopigmentation est variable (Figure 31). La 1<sup>ère</sup> description date seulement de 2013 chez une patiente originaire de Chine. (83) Le gène *SLC24A5* code une protéine transmembranaire impliquée dans la régulation du pH mélanosomal par des échanges ioniques  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . (84) Cette protéine est partiellement localisée sur le réseau trans-golgien, mais également dans les mitochondries des mélanocytes, et non dans le mélanosome, et pourrait jouer un rôle dans la régulation du Calcium mélanosomal et mitochondrial. (85)

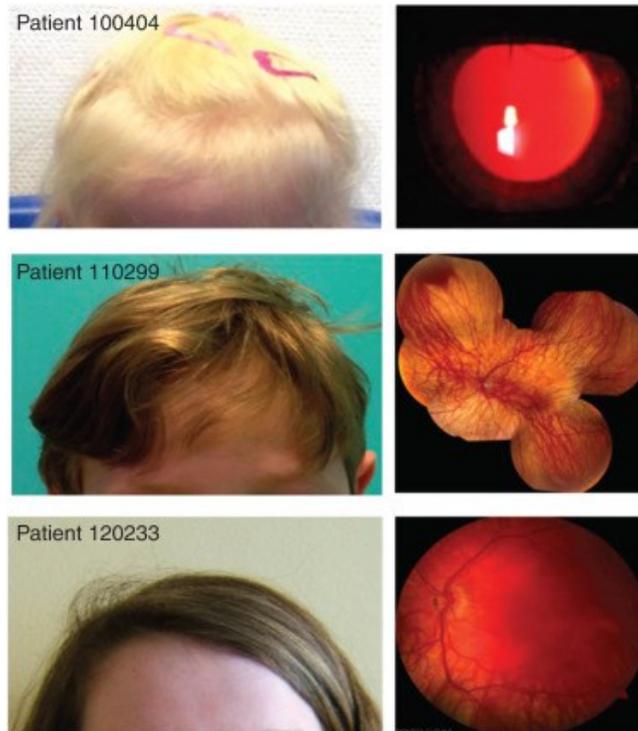


Figure 31. Phénotype de patients avec OCA6. Notez la variabilité de la pigmentation cutané-phanérienne chez ces trois patients différents (panels de gauche). Le phénotype oculaire est illustré à droite avec la transillumination irienne en haut et les fonds d'œil hypopigmentés (milieu et bas). (86)

### I.3.2.7 OCA7

L'OCA7 est lié aux variants du gène *LRMDA* (anciennement *C10ORF11*, OMIM \*614537). Il s'agit d'une forme très modérée d'OCA avec des individus légèrement moins pigmentés que leurs apparentés (Figure 32). Il a été mis en évidence chez des patients originaire des îles Féroé et de Lituanie. (87) Ce gène code une protéine avec plusieurs régions riches en leucines, à l'instar d'autres protéines impliquées notamment dans l'adhésion et le signal cellulaire, l'agrégation plaquettaire, le développement neuronal et la réponse immunitaire. Des études sur l'expression tissulaire de LRMDA chez l'humain et de knock-down chez le poisson zèbre sont en faveur de l'implication de LRMDA dans la différenciation et la fonction mélanocytaire. (87)



Figure 32. Patient avec OCA7. (73)

## I.4. Transfert des mélanosomes

### I.4.1 Mécanisme du transfert mélanosomal

Les mélanosomes matures formés dans les corps cellulaires, une fois pleinement pigmentés sont acheminés vers les kératinocytes le long de prolongements cellulaires des mélanocytes nommés dendrites, un mélanocyte pouvant entrer en contact avec une quarantaine de kératinocytes. Les mélanosomes migrent de part et d'autre de la région périnucléaire vers les dendrites grâce, à la fois aux mouvements microtubulaires contrôlés par les kinésines et dynéines, ainsi que le long des filaments d'actine grâce à une complexe trimérique constitué de la GTPase RAB27A, la mélanophiline et la protéine motrice Myosine Va. Les processus d'acheminement des mélanosomes aux kératinocytes ne sont actuellement pas complètement élucidés. (88)

### I.4.2 Pathologies du transfert mélanosomal

Dans les mélanocytes, la protéine RAB27A activée s'associe aux mélanosomes matures et avec l'aide de la mélanophiline recrute la myosine Va, un moteur actinique. Ceci permet le transfert des mélanosomes des microtubules vers le réseau d'actine périphérique des mélanocytes, permettant ainsi leur transfert aux kératinocytes. Les variants délétères d'un de ces acteurs entraînent l'accumulation des mélanosomes et sont liés aux phénotypes très particuliers d'hypopigmentation chez les souris *ashen*, *leaden* et *dilute* (Figure 33), toutes 3 apparentés au syndrome de Griscelli (GS) chez l'homme. (89)



Figure 33. Souris modèles du syndrome de Griscelli avec pigmentation gris métallisée de la fourrure. De gauche à droite : *Ashen Rab27<sup>aash/aash</sup>* ; Double mutant *Rab27<sup>aash/aash</sup>, Myo5a<sup>d/d</sup>*, *Dilute Myo5a<sup>d</sup>/Myo5a<sup>d</sup>*. (90)

Les 3 formes de syndrome de Griscelli chez l'humain, sont de transmission autosomique récessive et sont caractérisés par une hypopigmentation particulière. Les cheveux et poils des patients présentent des reflets métalliques caractéristiques, associés à des amas pigmentaires reconnaissables en microscopie optique (Figure 34).

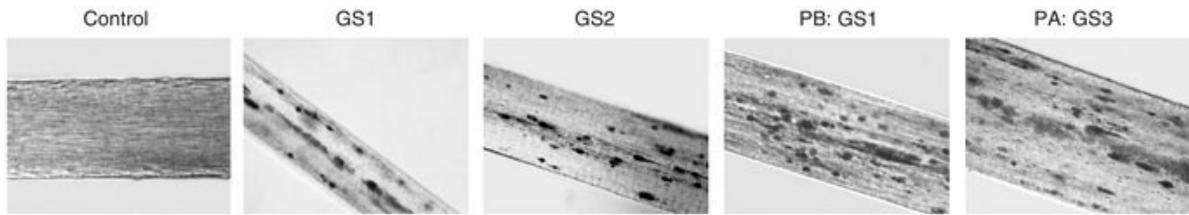


Figure 34. Cheveux de patients avec GS comparé à un témoin. Notez l'aspect d'agrégats pigmentés dans tous ces cheveux de patients avec GS 1, 2 ou 3 par rapport à un cheveu normal de témoin (control). (91)

Le GS1 (OMIM 214450) associe hypopigmentation et déficit neurologique (Figure 35A). Le GS1 est lié aux variants délétères de *MYO5A*. Les patients atteints du GS1 présentent un retard psychomoteur précoce et sévère.

Le GS2 (OMIM 607624), causé par les variants délétères de *RAB27A*, est caractérisé par une hypopigmentation et un déficit immunitaire (Figure 35B). Dans le GS2 peut survenir une réponse cytotoxique anormale et un syndrome d'activation incontrôlée des lymphocytes T et des macrophages, appelé syndrome hémophagocytaire, souvent fatal, et dont le seul traitement curatif est la greffe de moelle osseuse. Quelques patients peuvent présenter des atteintes neurologiques du fait de séquelles d'un syndrome hémophagocytaire.

Le GS3 (OMIM 609227) lié aux variants du gène *MLPH*, est caractérisé par une hypopigmentation sans atteinte neurologique ou immunitaire (Figure 35C et D).

Il ne s'agit pas de formes d'albinisme syndromique, les atteintes oculaires n'étant pas décrites chez ces patients. Cependant il s'agit d'une affection généralisée de la pigmentation liée aux mélanosomes et les atteintes systémiques associées peuvent faire évoquer un diagnostic de syndrome de Chediak-Higashi.



Figure 35. A. Patient GS1 lié au gène *MYO5A*. (92) B. Patient GS2 lié au gène *RAB27A*. (93) C et D. Patient GS3 lié au gène *MLPH*. (94) Notez la pigmentation particulière des cheveux gris, similaire aux modèles murin (Fig. 33)

## II. Œil – Anatomie, physiologie et albinisme oculaire

### II.1. Anatomie oculaire et histologie

#### II.1.1 Anatomie générale

L'œil est constitué de deux parties, la chambre antérieure et la chambre postérieure, délimitées par le cristallin (Figure 36). La chambre antérieure est délimitée en avant par la cornée et en arrière par le cristallin. Entre la cornée, à l'interface entre le globe oculaire et le monde extérieur, et le cristallin, se trouve un liquide composé d'eau et de nutriment appelé humeur aqueuse. En avant du cristallin se trouve l'iris, ouvert d'un orifice appelée pupille. C'est elle qui, grâce aux muscles constricteurs et dilatateurs modifiant son diamètre d'ouverture, module la quantité de lumière pénétrant à travers le segment postérieur jusqu'à la rétine optique. Le cristallin est une lentille biconvexe, reliée aux muscles ciliaires, qui permettent, par leur action, l'accommodation visuelle.

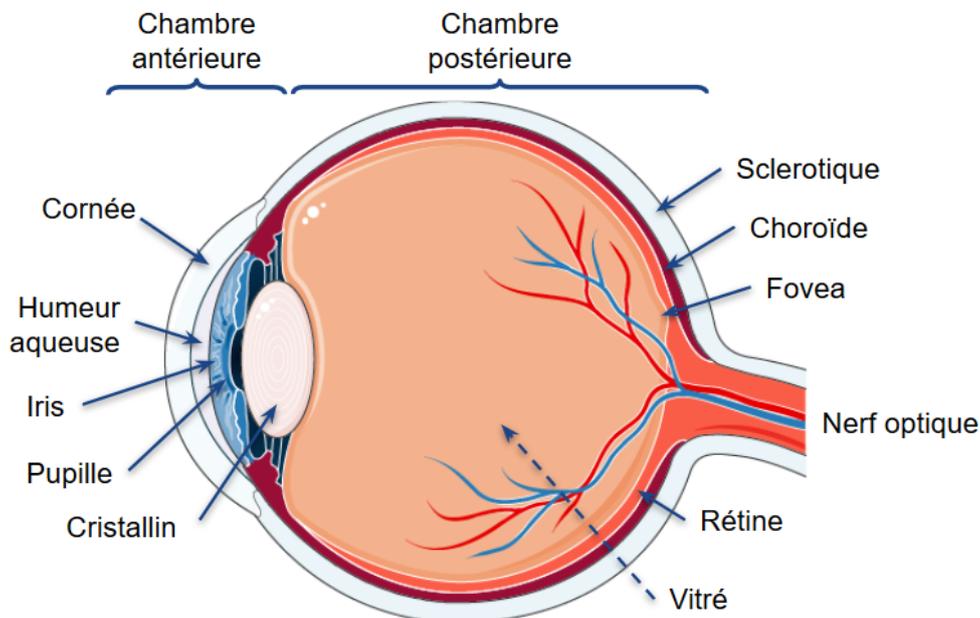


Figure 36. Anatomie de l'œil, coupe sagittale.

Le segment postérieur délimité par le cristallin en avant et la rétine en arrière, contient un gel transparent nommé le vitré. Autour de la rétine se trouve la choroïde qui contient de nombreux vaisseaux nourriciers de la rétine externe. Elle contient des vaisseaux sanguins, des mélanocytes, des fibroblastes, des cellules immunitaires et d'un tissu conjonctif de soutien collagénique et élastique. Sa richesse en vaisseaux lui confère un rôle nourricier pour la couche externe de la rétine mais également un rôle de thermorégulation, de régulation de la pression intra-oculaire et de photoprotection grâce aux mélanocytes.

Enfin à la périphérie de l'œil de trouve la sclérotique, dont la partie antérieure visible constitue le blanc de l'œil. (95)

## II.1.2 Structure et organisation de la rétine

La rétine est constituée de deux feuillets, la rétine neurosensorielle ou neurorétine et l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE).

### II.1.2.1 La neurorétine

La neurorétine est constituée de neurones spécialisés dont l'organisation spatiale forme trois couches cellulaires et 2 zones d'articulations interneuronales ou couches plexiformes (Figure 37A).

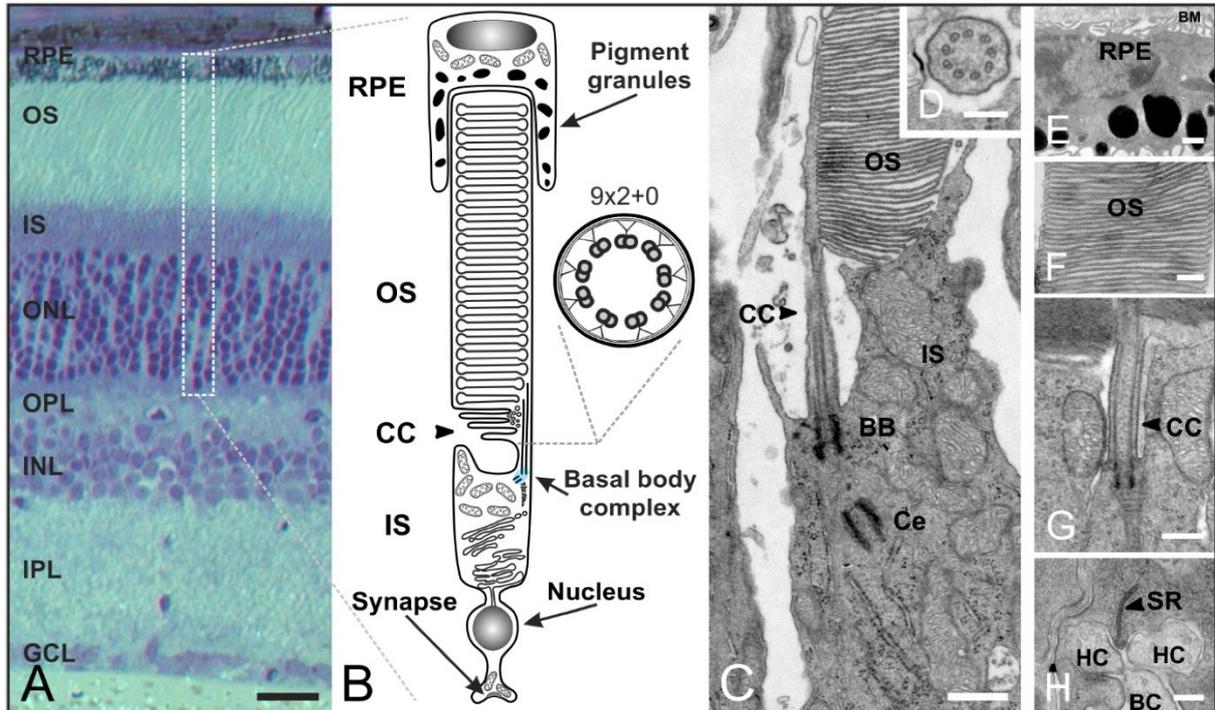


Figure 37. Structure de la rétine neurale. A Coupe verticale d'une rétine de vertébré (coloration au bleu de toluidine). B. Schéma d'un bâtonnet constitué d'un long segment externe (OS), enrobé par l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE) et connecté par le cil connecteur (CC) au segment interne (IS) qui inclut le complexe du corps basal (BBC) C-H. Microscopie électronique à transmission d'un photorécepteur. C. L'OS et l'IS sont connectés par le CC, le BBC est constitué du corps basal (BB) et son centriole (Ce). D. Coupe du CC montrant le réseau de microtubule. E. RPE avec ses granules pigmentés et la membrane de Bruchs (BM). F. Empilement serré de disques membranaires caractéristique de l'OS. G. Agrandissement du CC. H. Ruban synaptique (SR) avec invaginations des cellules horizontales post-synaptiques (HC) et cellules Bipolaires (BC). Echelle : A :100µm, (D,F,H) :200µm, E,G : 500nm. (96)

La rétine est dite inversée car la couche la plus profonde est celle qui contient l'extrémité sensible à la lumière des photorécepteurs (Outer Segment, OS. La lumière doit ainsi traverser toute la neurorétine pour les atteindre. La 1<sup>ère</sup> couche cellulaire, la plus profonde comprend environ 130 millions de cellules photosensibles, les cônes et les bâtonnets, dont les noyaux sont regroupés en une couche dense appelée couche granulaire externe (ONL, Outer Nuclear Layer). La 2<sup>ème</sup> couche cellulaire contient des neurones intermédiaires ou cellules bipolaires et est appelée couche granulaire interne (INL, Inner Nuclear Layer). La 3<sup>ème</sup> couche, appelée couche ganglionnaire (GCL, Ganglion Cell Layer) contient des cellules multipolaires dont les axones

constituent la dernière couche qui vient converger vers le nerf optique au niveau de la papille. Entre l'ONL et l'INL se trouve la 1<sup>ère</sup> zone plexiforme externe (OPL, Outer Plexiform Layer) et entre l'INL et la GCL se trouve la couche plexiforme interne (IPL, Inner Plexiform Layer).

Il existe deux types de photorécepteurs, les cônes qui sont adaptés à la vision diurne et permettent la vision fine des détails spatiaux et temporels et les couleurs, et les bâtonnets qui sont bien plus sensibles et permettent la vision en basse lumière. Le segment externe des photorécepteurs absorbe la lumière et produit le signal électrique qui est transmis aux cellules bipolaires via la synapse située à l'autre extrémité de la cellule. Le segment externe des bâtonnets est cylindrique tandis que celui des cônes est plus effilé (Figure 37B, Figure 38). Ils contiennent des pigments capables d'absorber la lumière, les opsines, qui diffèrent des mélanines, situés sur les disques composant le segment externe (Figure 37 B, C, F). Sur chaque photopigment est enchâssé un chromophore actif, commun aux cônes et bâtonnets, le 11-cis-rétinal. Les différences de capacité de détection visuelle entre cônes et bâtonnets sont déterminées par les types d'opsines qu'ils contiennent. Les bâtonnets contiennent la rhodopsine aussi appelé pourpre rétinien, qui peut capter des photons avec un large spectre de longueurs d'ondes. Les cônes possèdent quant à eux 3 types différents d'opsines captant différentes longueurs d'ondes. Les cônes contiennent les 3 opsines dans des proportions différentes dont l'une est souvent majoritaire et donne par simplification des cônes bleus, verts ou rouges. Les cônes bleus absorbent les courtes longueurs d'ondes (420nm), les cônes verts les moyennes (530 nm) et les rouges les longues (560 nm). (97)

Outre ces cellules qui transmettent l'information visuelle de manière directe ou verticale, il existe deux autres types de neurones qui modulent latéralement la transmission de l'information, les cellules horizontales en contact avec les photorécepteurs et les cellules bipolaires, et les cellules amacrines en contact avec les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires (Figure 38).

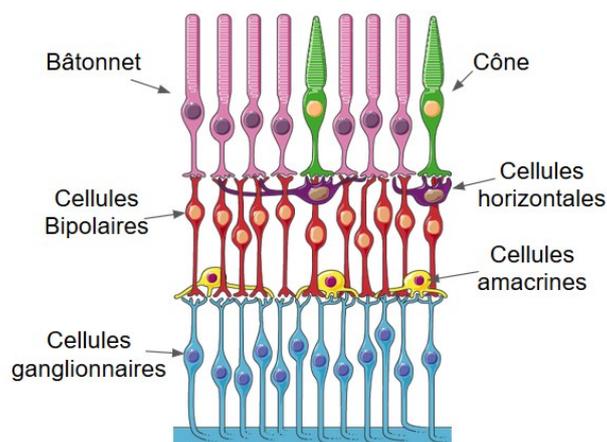


Figure 38. Neurones rétiniens

Par ailleurs, la rétine est traversée de cellules gliales appelées cellules de Müller qui enveloppent les vaisseaux sanguins et les corps cellulaires des neurones participant ainsi au maintien, à la survie et à la protection de la neurorétine.

La proportion des cônes et des bâtonnets diffère selon la région anatomique de la rétine. Le centre de la rétine est plus riche en cônes tandis que la rétine périphérique contient une majorité de bâtonnets. La région centrale de la rétine, la macula, forme une dépression avasculaire centrée par la fovéa. C'est au niveau de cette fovéa que la densité de photorécepteurs est la plus importante, et elle ne contient que des cônes. A mesure que l'on s'éloigne de la macula, la densité de photorécepteurs ainsi que la proportion en cônes par rapport aux bâtonnets diminuent, le rapport cônes/bâtonnets passant de 1:1 dans la macula à 1:13 en périphérie rétinienne. Dans la fovéa, un cône est relié à une seule cellule bipolaire, elle-même articulée à une seule cellule ganglionnaire, et l'acuité visuelle y est la plus forte. En périphérie de la rétine plusieurs photorécepteurs communiquent avec une seule cellule bipolaire et plusieurs cellules bipolaires avec une cellule ganglionnaire. Ainsi, le centre de la rétine est dédié à la vision discriminative, à la vision des couleurs, du relief et à la fixation des objets tandis que la rétine périphérique est dévolue à la vision nocturne, aux contrastes et à la perception périphérique des mouvements.

### II.1.2.2 L'épithélium pigmentaire rétinien

L'épithélium pigmentaire rétinien (RPE) joue un rôle de barrière entre la rétine et la circulation sanguine. Le RPE est constitué d'une monocouche de cellules hexagonales polarisées, pigmentées. Leur pôle basal repose sur une membrane (membrane de Bruchs, BM, Figure 37E) permettant les échanges avec les vaisseaux choroïdiens. Le pôle apical est en contact étroit avec les extrémités des photorécepteurs via des microvillosités permettant d'augmenter la surface d'échange et donc le transport des nutriments vers la neurorétine, et l'évacuation de ses déchets

vers la circulation sanguine (Figure 37B). Des transporteurs membranaires assurent les échanges d'eau et d'ions pour maintenir l'excitabilité des photorécepteurs. Une cellule de RPE est en contact avec plus d'une vingtaine de photorécepteurs. Le pôle basal contient également des mélanosomes qui lui confèrent sa pigmentation. (Figure 37E). Un rôle important du RPE est la photoprotection des tissus en arrière de la rétine et de réduire la diffusion et la réflexion de la lumière qui perturbe la formation d'une image nette. Les mouvements des mélanosomes dans le RPE en fonction de l'intensité lumineuse permettent également d'améliorer la vision en fonction de la luminosité.

Par ailleurs, le RPE a un rôle fondamental dans le cycle visuel. Il permet l'absorption de la vitamine A et son transport vers les photorécepteurs pour l'initiation du cycle visuel. Lors de la stimulation par un photon dans le photorécepteur, le chromophore actif est modifié entraînant une cascade de réactions permettant la transmission de l'information visuelle, aboutissant à une forme inactive. L'état actif du chromophore doit être restauré pour recommencer le cycle visuel. Le RPE est le siège de production et de renouvellement du chromophore actif. Le chromophore inactivé puis sa forme active après passage dans le RPE sont acheminés par des transporteurs spécifiques de la matrice inter-récepteurs. Le RPE est également indispensable à la survie des photorécepteurs et de la rétine en assurant leur cohésion, leur nutrition et leur maintenance. Les cellules épithéliales assurent le rôle de macrophage pour phagocyter les segments externes abîmés, en constant renouvellement. Chaque jour environ 10% des extrémités des photorécepteurs sont renouvelées. Ceci est possible grâce à la richesse du RPE en organelles dont, bien sûr, les mélanosomes mais également des phagosomes des segments externes, des autophagosomes, des endosomes et des lysosomes. Les voies de spécialisation des endosomes précoces nécessitent donc un contrôle précis pour l'adressage spécifique des protéines aux différents types d'organelles. (98)

## II.2. Embryologie oculaire

L'œil commence sa formation dès la 3<sup>e</sup> semaine de vie embryonnaire dans le cerveau antérieur ou prosencéphale par l'apparition de deux gouttières peu profondes de chaque côté. Ces gouttières s'invaginent après la fermeture du tube neural pour donner les vésicules optiques qui vont au contact de l'ectoblaste superficiel. Ce dernier est épaissi à cet endroit, formant la placode optique qui donnera ensuite le cristallin. L'invagination des vésicules optiques crée la cupule optique formée d'une double paroi, autour de la placode optique qui s'invagine également pour devenir la vésicule cristallinienne. La cupule optique est rattachée au cerveau par le pédicule optique. (Figure 39)

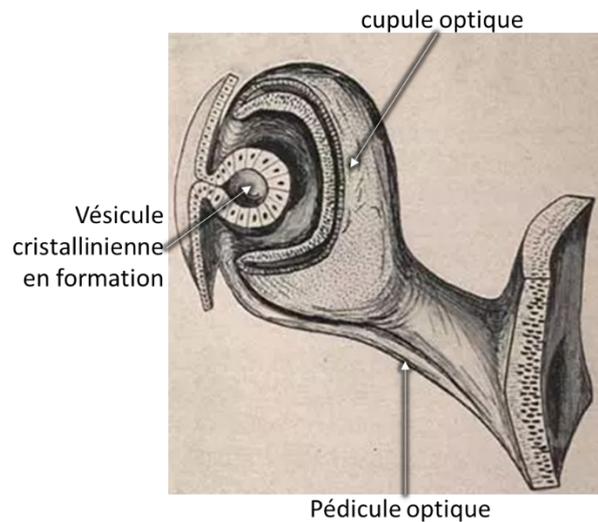


Figure 39. Développement de l'œil humain. D'après Ida Mann, 1928. (99)

Les deux couches de la vésicule optique sont initialement séparées par un espace rétinien qui disparaît par la suite avec l'accolement des deux parois. La partie ventrale de la cupule optique s'invagine à son tour en laissant un espace nommé fente colobomique se poursuivant le long du pédicule optique en s'effilant à son extrémité. La fente colobomique permet le passage de l'artère hyaloïde jusqu'à la chambre antérieure de l'œil, qui deviendra ensuite l'artère centrale de la rétine. Cette fente se ferme au cours de la 7<sup>ème</sup> semaine de développement constituant un canal dans lequel courent les fibres du nerf optique. La cupule optique reste ouverte à son extrémité par un orifice arrondi, la future pupille. La vésicule cristallinienne qui a perdu ses connections avec l'ectoblaste superficiel se situe dans cet orifice.

La couche externe de la cupule optique, composée de cellules épithéliales dans lesquelles on voit apparaître des petits granules pigmentés, donne la couche pigmentaire de la rétine, futur RPE. La pigmentation du RPE est visible dès le 33<sup>ème</sup> jour de gestation. A l'avant du globe oculaire, cette couche pigmentée externe donne l'épithélium pigmenté de l'iris.

La couche interne se développe en deux entités distinctes. A l'avant, autour de la région cristallinienne, environ 1/5 de la couche interne de la cupule devient la rétine "aveugle" qui par la suite se divisera pour donner la rétine irienne, à l'origine du feuillet postérieur de l'iris, et en rétine ciliaire participant à la formation du corps ciliaire. La rétine ciliaire forme un pli reconnaissable, le processus ciliaire, à l'extérieur duquel le mésenchyme se développe pour donner le muscle ciliaire. A l'intérieur, la rétine ciliaire est rattachée au cristallin par un

mésenchyme lâche qui deviendra le ligament suspenseur du cristallin. C'est à ce niveau que les contractions du muscle ciliaire vont permettre de régler la convergence du cristallin.

Les 4/5<sup>èmes</sup> postérieurs de la couche interne donnent la rétine optique. La couche interne de la cupule optique est formée d'un épithélium colonnaire, qui va devenir un épithélium pseudo-stratifié dans la rétine neurale primitive. Au cours de son développement, la polarité de la rétine se fixe, en commençant par l'axe naso-temporal, puis par l'axe dorso-ventral et enfin la polarité radiale. L'épaisseur de la rétine augmente progressivement avec le développement embryonnaire puis foetal. En parallèle ont lieu les différenciations cellulaires aboutissant aux différents types de neurones rétiens. Cela se déroule sous forme de deux gradients, le premier étant linéaire depuis l'intérieur vers l'extérieur des couches rétiennes. Le second gradient part du centre de la rétine pour gagner la périphérie. Les 1<sup>ères</sup> cellules à apparaître sont les cellules ganglionnaires. De la périphérie vers l'intérieur celle-ci se compose de la couche des cônes et des bâtonnets, la couche granulaire externe (constituée des noyaux des cônes et bâtonnets), la couche granulaire interne constituée de cellules bipolaires, la couche des cellules multipolaires et enfin la couche du voile marginal, composée des zones des cellules multipolaires convergeant vers le pédicule optique pour donner le futur nerf optique.

Autour du globe primitif se trouve du mésoblaste dans lequel des structures importantes vont se former, comme les muscles constricteurs et dilatateurs iriens (dérivant de l'ectoblaste). Le mésenchyme lâche qui entoure tout le globe va se différencier en une couche interne, richement vascularisée et pigmentée appelée choroïde. La couche externe donne quant à elle la sclérotique se prolongeant en dure-mère qui entoure le nerf optique. Des mélanoblastes viendront se placer dans ce mésenchyme, et se différencieront en mélanocytes pigmentés. Pour amorcer sa différenciation, le mésenchyme qui donnera la choroïde doit être en contact avec le RPE.

En avant du globe, le mésenchyme évolue différemment pour former la chambre antérieure de l'œil, avec une couche interne fine en avant du cristallin et de l'iris, la membrane pupillaire, et une couche externe épaisse en continuité avec la sclérotique et la cornée. (99)

Un des acteurs majeurs du développement oculaire, mis en évidence dans les années 90 grâce à des modèles animaux comme la drosophile et bien sûr la souris, est le gène homéotique *PAX6* (*PAIRED BOX GENE 6*, *OMIM* \*607108). Chez la drosophile l'absence de *Pax6* est responsable d'absence d'œil et l'expression ectopique de *Pax6* entraîne la présence d'yeux à des localisations aberrantes. Cette expression ectopique permettant la création d'yeux indique que *Pax6* est le gène source qui permet la formation des yeux en initiant une cascade de

réactions successives.(99) Chez la souris *Sey*, hétérozygote pour un variant pathogène de *Pax6* on observe une microphthalmie, une hypoplasie irienne, une cataracte et une opacification cornéenne. Chez l'humain les variants hétérozygotes de *PAX6* sont associés à l'aniridie, une pathologie congénitale caractérisée par une absence ou hypoplasie irienne, un nystagmus et une hypoplasie fovéolaire accompagnés de cataracte, glaucome et kératopathies cornéennes.

Lors du développement embryonnaire *PAX6* est exprimé dans une région antérieure de la crête neurale, l'aire optique, avant le début de la neurulation, initialement unique puis se divisant en 2 aires symétriques suite à un signal émis par la plaque préchordale : l'expression du gène *Sonic Hedgehog (SHH)*, un autre gène majeur du développement. *SHH* inhibe l'expression de *PAX6* et régule *PAX2*. *PAX2* intervient dans la différenciation du pédicule optique tandis que *PAX6* régule la différenciation de la cupule optique. *PAX6* est exprimé à la fois dans la rétine neurale et dans le RPE, ainsi que dans les structures de la chambre antérieure dérivant de l'ectoblaste incluant le cristallin et l'épithélium cornéen. Au début de la différenciation du RPE, *PAX6* active l'expression d'une forme de *MITF* spécifique du RPE, et ces deux acteurs contribuent à la régulation de la transcription des gènes *TYR*, *DCT* et *TYRP1*. *PAX6* est également indispensable à la production de facteurs de transcriptions neuronaux, impliqués dans la mise en place des cellules neuronales de la rétine. (95)

Contrairement aux mélanocytes de la peau où la mélanogénèse et le transfert des mélanosomes ont lieu tout au long de la vie, le RPE ne transfère pas ses mélanosomes et la biogénèse des mélanosomes est majoritairement embryonnaire. Les 4 stades de maturation sont cependant identiques. Si le dépôt de mélanine au stade II n'a pas lieu, les mélanosomes restants alors immatures sont perdus à l'âge adulte. Les mélanosomes du RPE se positionnent au niveau des prolongements apicaux, grâce aux moteurs tubulaires tels que RAB27A et la Myosine VIIA, à l'image du complexe RAB27A-Mélanophiline-Myosine V dans les mélanocytes cutanés. (98)

### II.3 Albinisme oculaire et pathologies apparentées

De nombreuses pathologies constitutionnelles ou acquises affectent la vision. La vision nette des formes, des couleurs, des mouvements, nécessite un globe oculaire exerçant correctement sa fonction de lentille afin de propager le signal lumineux composé de photons vers la rétine, que cette dernière puisse transformer le signal lumineux en influx nerveux et que celui-ci soit acheminé vers les aires visuelles du cerveau pour en faire l'analyse. Dans l'albinisme, l'atteinte visuelle est constante, de sévérité variable et non corrélée à la sévérité de l'atteinte cutanéophanérianne. En effet, il existe des PVA dont la pigmentation cutanéophanérianne est similaire

au reste de leur famille mais avec un réel handicap visuel. Il s'agit de l'albinisme oculaire pur ou OA. Les patients atteints de FHONDA (syndrome d'Hypoplasie Fovéolaire et Anomalies de Décussation du Nerf Optique et/ou dysgénésie du segment antérieur) présentent des caractéristiques en commun avec l'OA.

### II.3.1 Albinisme oculaire

L'albinisme oculaire (OA) est associé aux variants pathogène du gène *GPR143* (OMIM \*300808), situé sur le chromosome X. La transmission de l'OA est récessive liée à l'X. Les sujets masculins porteurs d'un variant pathogène hémizygote présentent des atteintes ophtalmologiques caractéristiques de l'albinisme mais sans hypopigmentation cutanéophanérienne. Les femmes transmettrices (hétérozygotes) peuvent présenter un phénotype assez caractéristique, avec une hypopigmentation rétinienne irrégulière (aspect peigné) reflet de l'inactivation aléatoire d'un des deux chromosomes X. Les mères de garçons suspectés d'être atteints d'albinisme oculaire sont donc souvent explorées par un examen ophtalmologique pour dépister ces signes.

Ce gène a été découvert par stratégie de clonage positionnel chez des patients atteints d'OA1 (100) puis il a été déterminé qu'il s'agissait d'un récepteur couplé à une protéine G mélanosomale, d'expression et de régulation similaire aux enzymes mélanogéniques. *GPR143* est exprimé exclusivement dans le RPE et l'épithélium pigmenté irien, ainsi que dans les mélanocytes de la peau. Il se localise à la surface des mélanosomes des mélanocytes de la peau et dans le RPE, à la partie apicale. Cette protéine est impliquée dans la régulation du nombre, de la morphologie et de la répartition des mélanosomes. Dans les cellules déficientes en *GPR143*, les mélanosomes présentent une forme anormale et sont élargis formant des macromélanosomes, alors que la synthèse de mélanine reste fonctionnelle. (101) L'absence de *GPR143* conduit aux mêmes affections rétiniennes que les autres formes d'albinisme, sans atteintes de la production de mélanine. L'absence de mélanine ne semble donc pas être directement responsable des défauts de développement rétiniens de l'albinisme. L'activité de transduction du signal de GPR143 semble être une clé dans le développement oculaire, et une voie commune entre les diverses formes d'albinisme.

La L-DOPA est un intermédiaire produit lors de la synthèse de mélanine. L'expression exogène de tyrosine hydroxylase dans le RPE permet aux cellules déficientes en tyrosinase de synthétiser de la L-DOPA mais pas de la mélanine. (102) Cela semble suffisant pour prévenir la survenue d'anomalies de développement oculaire, suggérant que c'est la L-DOPA et non la mélanine qui serait un facteur essentiel lors du développement oculaire et la L-DOPA est le ligand de

GPR143. (102) Il se pourrait donc que l'absence de L-DOPA (produite lors de la synthèse de mélanine) ou l'absence de son récepteur conduisent au même phénotype, qui serait donc lié à un défaut de transmission du signal par GPR143. GPR143 semble réguler la sécrétion du PEDF (*Pigment Epithelial Derived Factor*) par le RPE. Le PEDF est un facteur neurotrophique impliqué dans la survie neuronale et un inhibiteur de l'angiogénèse. GPR143 serait également impliqué dans le trafic des endosomes. (101)

### II.3.2 Syndrome FHONDA

Le syndrome FHONDA (*Foveal Hypoplasia, Optic Nerve Decussation defects and/or Anterior segment dysgenesis*) est apparenté à l'albinisme oculaire car il en possède de nombreux signes cardinaux tels que l'hypoplasie fovéolaire et les anomalies de décussation des fibres du nerf optique, et se manifeste donc par un nystagmus congénital, sans hypopigmentation cutanéophanérienne. Il s'agit d'une pathologie autosomique récessive liée aux variants pathogènes du gène *SLC38A8* (OMIM \*615585), localisé sur le chromosome 16. Le gène *SLC38A8* code une protéine de transport d'acides aminés, fortement exprimée dans la couche des photorécepteurs de la rétine. Il appartient à une famille de transporteurs comportant 11 membres aussi connus comme transporteurs d'acide aminés couplés au sodium ou SNATs (*Sodium-coupled Neutral Amino-acid Transporters*). Une des hypothèses est qu'une influence sur le transport de certains composants de neurotransmetteurs (tels que la glutamine) perturberait la formation et le remodelage des circuits synaptiques, incluant la prolifération des neurones de la rétine. (103) Tous les patients porteurs de variants de *SLC38A8* ne présentent pas de dysgénésie antérieure, ce qui comme pour l'albinisme dénote d'une certaine variabilité d'expression. De ce fait, de nombreux patients atteints du FHONDA sont initialement suspectés d'OA et seule l'analyse moléculaire permet de poser le diagnostic exact. (104)

## Partie 2. Caractéristiques cliniques de l'albinisme

Le diagnostic d'albinisme est en tout premier lieu clinique.

Si la détection est assez simple pour les formes avec absence complète de pigmentation cutanéophanérienne permettant généralement un diagnostic dès la naissance, ou encore pour les formes plus modérées dans les ethnies à forte pigmentation cutanéophanérienne, le diagnostic clinique est moins évident chez les caucasiens pour les formes modérées et *a fortiori* pour les formes à atteinte purement oculaire. Le diagnostic de certitude n'est possible que grâce à un examen ophtalmologique approfondi. Ce dernier n'est pas facilement accessible pour toute la population mondiale, on peut donc suspecter qu'une partie des PVA avec forme oculaire pure n'est pas ou mal diagnostiquée chez les moins fortunés.

### I. Diagnostic dermatologique

Les PVA présentent une hypopigmentation cutanéophanérienne plus ou moins intense selon l'atteinte moléculaire. Il existe de nombreux gènes responsables d'albinisme, et la présentation clinique, à quelques exceptions près, ne permet en général pas de déterminer le type d'albinisme en cause *a priori* (Figure 40).



Figure 40. Différentes présentations cliniques chez des PVA. Courtoisie du Pr Arveiler.

L'atteinte bi-allélique du gène *Tyrosinase (TYR)* entraînant sa perte de fonction complète donne lieu à une absence totale de production de pigment avec des cheveux et poils blancs, une peau très pâle laissant bien voir les vaisseaux sous cutanés et prompte à la rougeur. Ces personnes porteuses de variants entraînant une perte complète de fonction de *TYR* ne développent pas de nævus et ne pigmentent pas avec l'âge contrairement à certaines atteintes plus modérées. C'est également le cas pour les pertes de fonctions complètes des gènes *SLC45A2* et *HPS1*.

La forme liée au gène *OCA2*, prédominante en Afrique par un effet fondateur, permet le maintien d'une partie de la production de phéomélanine ce qui donne des cheveux, poils et peau légèrement jaunâtres.

L'atteinte du gène *TYRPI* peut être responsable d'une forme d'albinisme roux, mais également d'AOC très modéré.

Pour tous les gènes impliqués, la fabrication de pigment peut être partiellement ou totalement maintenue. La pigmentation peut donc être normale ou plus claire que les apparentés ce qui rend le diagnostic difficile dans les populations caucasiennes où les blonds et roux sont fréquents.

Les PVA peuvent avoir une plus ou moins grande sensibilité aux UVs selon l'atteinte et doivent donc bénéficier d'une photoprotection. Les risques de tumeurs cutanées sont importants, et responsables de décès précoces dans zones tropicales et équatoriales où les populations, souvent démunies, n'ont que peu de moyen de se protéger.

L'exposition solaire peut, sur le long terme, entraîner un épaissement de la peau appelé pachydermie, des lésions pré-cancéreuses de kératose actinique (Figure 41) puis des néoplasies telles que des carcinomes basocellulaires ou spinocellulaires, mais les mélanomes sont en général rares. Il faut bien distinguer ce risque tumoral qui s'apparente aux personnes à phototype clair (I ou II) du risque très important des syndromes tels qu'observés dans le Xeroderma Pigmentosum. (105)



Figure 41. PVA présentant d'importantes lésions de kératose actinique sur la peau photo-exposée. Crédit photo : Patricia Willoq. (106)

## II. Diagnostic ophtalmologique

L'atteinte ophtalmologique est constante chez tous les patients, et c'est souvent elle qui permet de poser le diagnostic clinique d'albinisme, surtout lorsque l'hypopigmentation est peu sévère voire normale comme c'est le cas pour l'albinisme oculaire.

Cependant, au même titre que l'atteinte cutané-phanérienne, les signes ophtalmologiques peuvent être d'intensité variable, certains signes pouvant être très modérés voire absents. La sévérité de l'atteinte ophtalmologique n'est pas forcément corrélée au degré d'hypopigmentation cutané-phanérienne, *a fortiori* pour les formes dites oculaires pures, à pigmentation normale. (95)

### II.1 Nystagmus

Le signe cardinal, et souvent le premier dépisté en dehors des atteintes cutané-phanériennes, est le nystagmus congénital, horizontal et pendulaire. Il est caractérisé par un balancement oculaire involontaire, souvent signalé par les parents. Il est le reflet du déficit visuel. Son évolution peut être favorable avec ralentissement voire disparition au cours de la vie et peut donc manquer lors d'un diagnostic tardif, alors qu'il est présent chez quasi toutes les PVA à la naissance.

## II.2 Acuité visuelle basse

Les PVA ont généralement une acuité visuelle basse (BAV), en moyenne entre 20/50 et 20/400 (Echelle de Snellen) après correction, qu'il convient de dépister et de corriger au plus tôt. La BAV est variable et n'est pas corrélée à la sévérité de l'atteinte moléculaire ou pigmentaire. Des anomalies de réfraction sont souvent observées et nécessitent d'être spécifiquement dépistées et corrigées. Un strabisme y est fréquemment associé. Les PVA n'ont en général pas d'anomalie de la vision des couleurs.

## II.3 Hypopigmentation irienne

Associé à l'hypopigmentation cutané-phanérienne existe évidemment l'hypopigmentation irienne facilement observable, avec des iris pâles, généralement bleus mais qui peuvent légèrement pigmenter et devenir verts ou noisette. Cette hypopigmentation peut être absente notamment dans les formes purement oculaires.

## II.4 Transillumination irienne

L'hypopigmentation irienne résulte en un défaut d'opacité ou excès de transparence entraînant une transillumination irienne. L'éclairage à la lampe à fente permet d'observer les rebords du cristallin, normalement masqués par la pigmentation irienne. Cette transillumination peut être totale ou partielle (Figure 42).

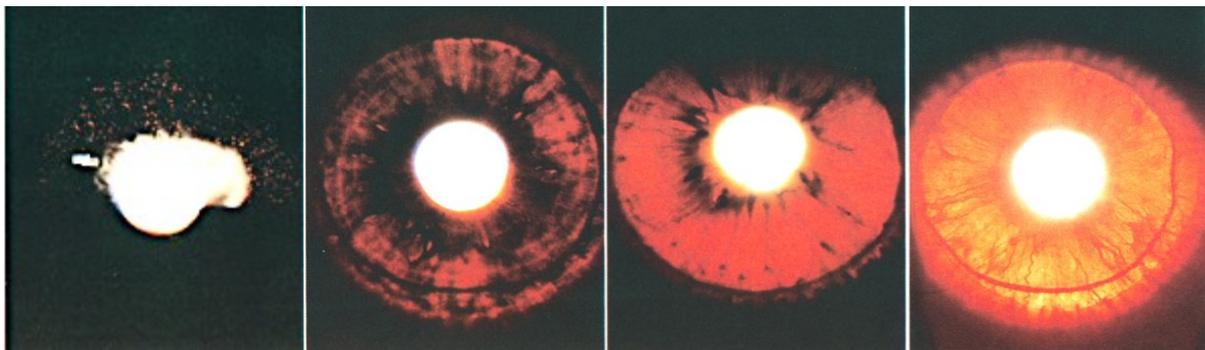


Figure 42. Clichés de segment antérieur en rétro-illumination. Echelle de cotation de la transillumination irienne en 4 grades de sévérité croissante de gauche à droite : grade 1 = transillumination ponctuée discrète mais persistance d'une pigmentation importante de l'iris, grade 2 = transillumination ponctuée mais diffuse et quantité modérée de pigment, grade 3 = faible quantité de pigment irien et transillumination quasi totale, grade 4 = absence totale de pigment et transillumination complète de l'iris. (107)

De plus, cette hypopigmentation peut se traduire par un reflet rouge pupillaire parfois visible sur les photographies et une photophobie (gêne voire douleur oculaire à la lumière).

## II.5 Hypopigmentation rétinienne

La rétine également est hypopigmentée, ce qui n'est visible que par l'étude du fond d'œil à la lampe à fente et qui est associée à une visibilité excessive des vaisseaux rétiniens. (Figure 43)

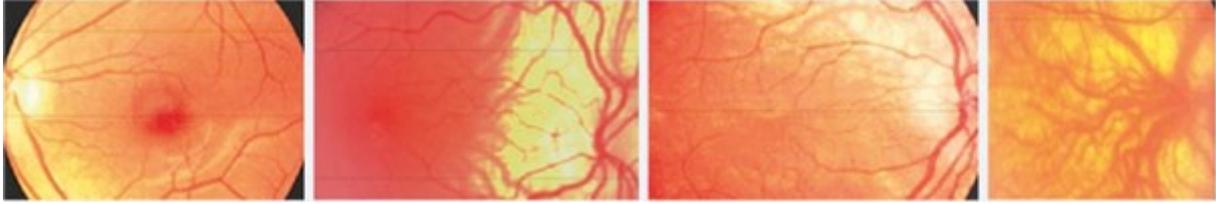


Figure 43. Echelle de cotation de l'hypopigmentation rétinienne. Sévérité croissante de gauche à droite : grade 1 = hypopigmentation périphérique, au-delà des arcades vasculaires, grade 2 = hypopigmentation périphérique et centrale épargnant la macula, grade 3 = hypopigmentation périphérique et centrale avec diminution du pigment maculaire, grade 4 = hypopigmentation diffuse, absence d'augmentation locale de la pigmentation au niveau de la macula. (108)

## II.6 Hypoplasie Fovéolaire

Un autre signe très caractéristique est l'hypoplasie fovéolaire. La fovéola est une région observable au fond d'œil car elle est avasculaire. A cet endroit se trouve normalement une dépression, reflet de l'absence des couches de fibres nerveuses de la rétine. Suite à un défaut de développement, cette dépression peut être absente ou incomplète avec persistance des couches internes de la rétine, ainsi que de la vascularisation. Il existe plusieurs grades qui peuvent être cotés grâce à une tomographie optique en cohérence (OCT) (Figure 44 et Figure 45).

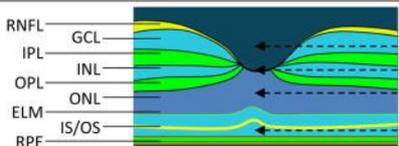
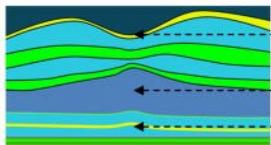
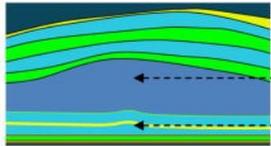
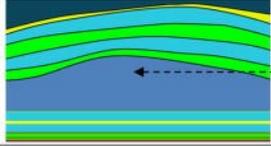
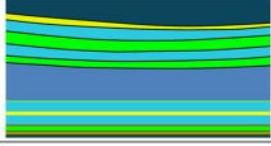
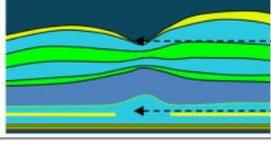
<b>(A)</b>		<b>Normal foveal structural features detectable using optical coherence tomography</b>		<b>Illustration</b>	
		(a) Extrusion of plexiform layers (b) Foveal pit (c) OS lengthening (d) ONL widening		 <p>Diagram illustrating normal foveal structure with layers: RNFL, GCL, IPL, INL, OPL, ONL, ELM, IS/OS, RPE. Features (a) through (d) are indicated by dashed lines and arrows.</p>	
<b>(B)</b>		<b>Grade of foveal hypoplasia</b>	<b>Structural features detected on optical coherence tomography</b>	<b>Present or absent</b>	<b>Illustration</b>
		<b>1</b>	(a) Extrusion of plexiform layers (b) Foveal pit – Shallow (c) OS lengthening (d) ONL widening	(a) Absent (b) Present (c) Present (d) Present	
		<b>2</b>	(a) Extrusion of plexiform layers (b) Foveal pit (c) OS lengthening (d) ONL widening	(a) Absent (b) Absent (c) Present (d) Present	
		<b>3</b>	(a) Extrusion of plexiform layers (b) Foveal pit (c) OS lengthening (d) ONL widening	(a) Absent (b) Absent (c) Absent (d) Present	
		<b>4</b>	(a) Extrusion of plexiform layers (b) Foveal pit (c) OS lengthening (d) ONL widening	(a) Absent (b) Absent (c) Absent (d) Absent	
		<b>Atypical</b>	(a) Extrusion of plexiform layers (b) Foveal pit – Shallow (e) IS/OS disruption	(a) Absent (b) Present (e) Present	

Figure 44. Schéma illustrant en A les structures d'une fovéa normale visibles en OCT Spectral Domain (SD-OCT) et en B différents aspects possibles de l'hypoplasie fovéolaire en SD-OCT permettant une classification avec des grades de sévérité croissante. (109)

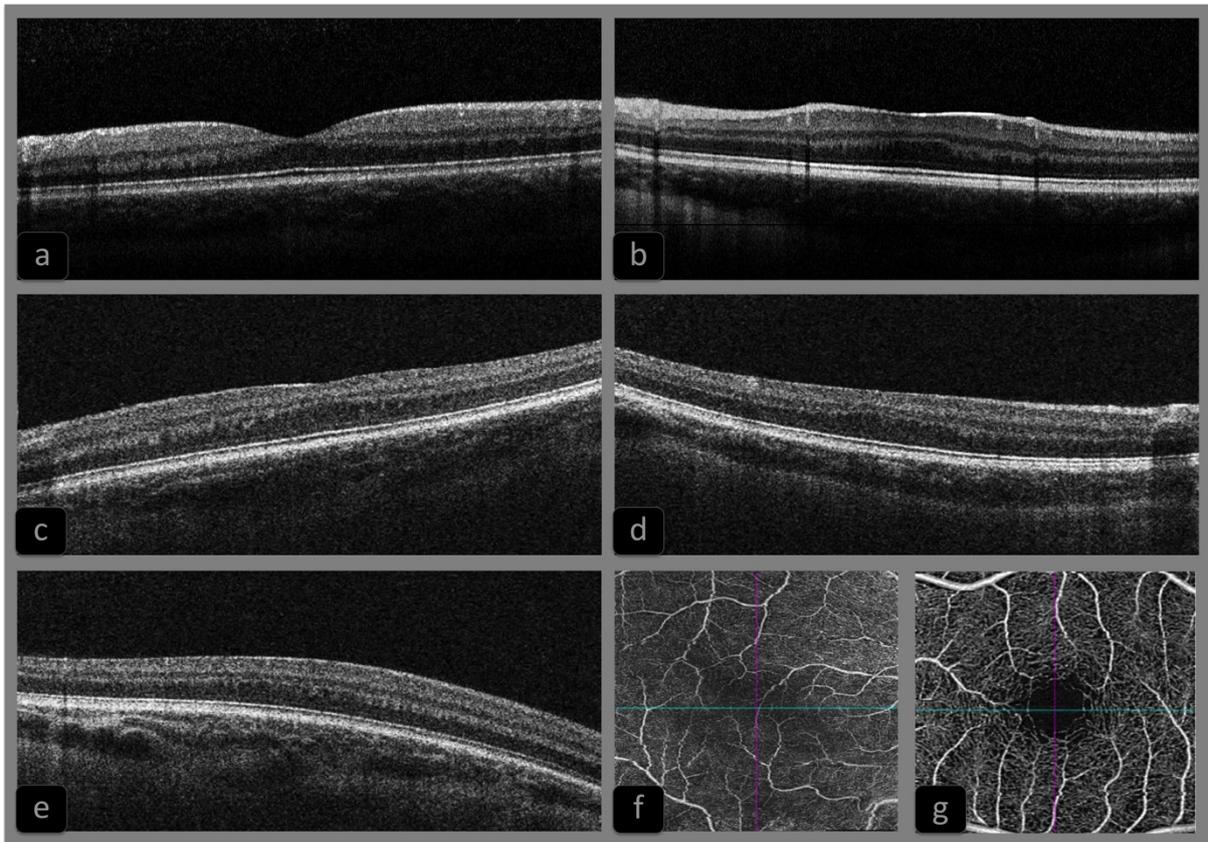


Figure 45. Divers degrés d'hypoplasie fovéolaire chez des patients OCA1. Imagerie par Tomographie Optique en Cohérence (OCT) de patient OCA1 montrant les différents grades d'hypoplasie fovéolaire. a. Grade 0 b. grade 1 c. Grade d. grade 3 e. grade 4. f. Angio-OCT de fovéa d'un patient OCA1 comparé à une fovéa normale (g) confirmant l'absence de zone avasculaire centrale. (67)

L'hypoplasie fovéolaire, bien que très évocatrice d'albinisme, peut aussi être observée dans l'aniridie, liée aux atteintes du gène *PAX6*.

## II.7 Anomalie de décussation du chiasma optique

Il existe chez les PVA des anomalies de décussation du chiasma optique. Le chiasma optique est une région anatomique de la base du crâne au niveau de laquelle les fibres du nerf optique se croisent. Prenant naissance au niveau de la rétine, les fibres du nerf optique, constitué des axones des cellules ganglionnaires de la rétine, rejoignent les aires visuelles de part et d'autre du cerveau. Au niveau du chiasma, certaines fibres se croisent pour rejoindre le côté opposé (controlatérales) tandis que d'autres restent du même côté (ipsilatérales). Dans un œil normalement pigmenté, la frontière entre cellules à projection ipsilatérale et cellules à projection controlatérale passe par la fovéa. Ainsi, les fibres issues de la rétine temporale se projettent dans le corps genouillé latéral (CGL) ipsilatéral, et les fibres issues de la rétine nasale se projettent dans le CGL controlatéral. Dans le cas d'un albinisme, la frontière est décalée vers la rétine nasale de 20° ou plus selon les cas. Le nombre de fibres controlatérales augmente au

détriment du contingent des fibres ipsilatérales. (Figure 46). Ce trouble de la décussation peut être observable à l'IRM de diffusion (110) mais en pratique courante c'est un enregistrement des potentiels évoqués visuels retrouvant un aspect d'asymétrie croisée qui permet de l'affirmer.

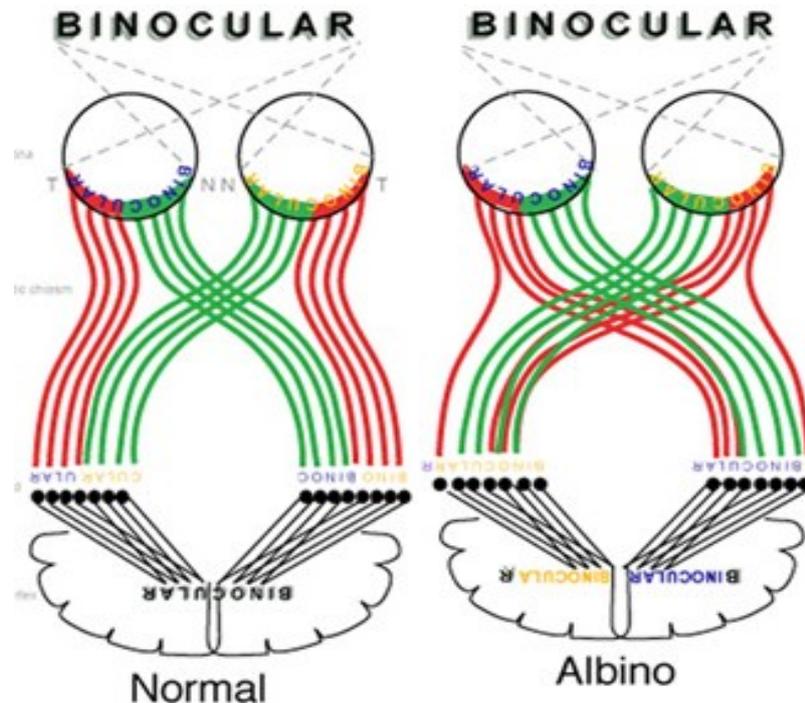


Figure 46. Anomalie du croisement des fibres rétino-fuges chez la PVA. Distribution des axones issus des cellules ganglionnaires de la rétine dans un œil avec une pigmentation normale (à gauche) et dans un œil albinos (à droite), selon leur latéralité. (111)

### III. Cas particulier des formes syndromiques

Dans les syndromes HPS ou CHS des atteintes systémiques s'ajoutent aux atteintes précédentes. (112) Les mélanosomes, organelles où se produit la synthèse du pigment, appartiennent à la famille des LRO. Dans cette famille on trouve également les granules denses plaquettaires, les corps lamellaires dans l'épithélium type II pulmonaire, et les endosomes de signal dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes. Les patients atteints de formes syndromiques peuvent donc présenter une atteinte hématologique à type de diathèse hémorragique, une fibrose pulmonaire, une colite granulomateuse ou encore un déficit immunitaire. La sévérité de l'atteinte semble être en partie corrélée à la forme génétique, les phénotypes les plus sévères étant liés aux altérations des gènes HPS-1 et 4.

#### III.1 Atteinte hématologique

Dans l'HPS et le CHS il existe chez tous les patients un déficit en granules denses plaquettaires sévère à total. Les patients souffrent alors d'un défaut d'agrégation des plaquettes pouvant occasionner une diathèse hémorragique. Celle-ci se caractérise par des ecchymoses faciles, des

saignements prolongés notamment gingivaux, des épistaxis, des ménorragies ou des hémorragies suite à des interventions chirurgicales, mais de sévérité moindre comparée aux atteintes de l'hémostase telles que l'hémophilie. Les coupures saignent plus longtemps mais se guérissent normalement. Les épistaxis surviennent dès l'enfance mais diminuent après l'adolescence. Il peut également survenir des saignements digestifs prolongés chez les patients atteints de colite.

Le diagnostic de déficit en granules denses est réalisable de manière directe grâce à la microscopie électronique en "whole mount", ou de manière indirecte (113) par des tests d'agrégation avec divers agonistes (ADP, collagène, acides arachidoniques) à faibles doses, le test pouvant être normal à fortes concentrations. On peut également étudier la sécrétion de sérotonine marquée, la chimiluminescence qui mesure la capacité de sécrétion d'ATP. En effet les granules denses des plaquettes stimulées, notamment par une lésion, vont relarguer leur contenu (ATP, ADP, sérotonine, calcium, phosphate) afin d'attirer d'autres plaquettes, ce qui n'est pas possible en l'absence des granules denses.

La numération plaquettaire, le temps de Prothrombine, le temps de Céphaline activée sont normaux en règle générale.

Le diagnostic moléculaire permet parfois de mettre en évidence une forme syndromique chez une personne suspectée d'albinisme et qui n'évoque pas forcément ces signes qui sont parfois mineurs. Cependant le diagnostic d'un déficit en granule dense est important car il existe un risque non négligeable de saignement lors d'une intervention chirurgicale, même mineure. Des moyens de préventions existent, tels que la prescription de Desmopressine ou la transfusion plaquettaire.

### III.2 Atteinte pulmonaire

L'atteinte pulmonaire est caractérisée par la fibrose pulmonaire, une maladie restrictive progressive de vitesse et durée d'évolution variable.

Elle peut débuter dès la trentaine et être fatale en une dizaine d'années. Cette atteinte semble limitée aux sous-types d'HPS liés aux gènes *HPS1*, *HPS4* et *AP3B1*, aucun cas n'étant rapportés dans les autres sous-types à ce jour.

### III.3 Atteinte digestive

Certains individus souffrent d'une colite granulomateuse hémorragique pouvant faire évoquer une maladie de Crohn, présente en général dès 15 ans avec une grande variabilité. Elle est sévère

chez 15% des atteints avec nécessité de colectomie. Certains patients peuvent être atteints d'inflammation intestinale sans que le diagnostic de colite soit objectivement posé.

Cette atteinte est principalement décrite dans les formes HPS-1 et HPS-4.

### III.4 Atteinte immunologique

Des neutropénies ou des déficits immunitaires ont été rapportés chez des patients avec atteintes d'*AP3B1* ou *AP3D1*. L'atteinte immunologique se caractérise par une sensibilité accrue aux infections. Dans le CHS, lié aux variants du gène *LYST*, l'atteinte est très sévère avec pronostic vital engagé dans l'enfance, nécessitant une greffe de moelle osseuse. Ces patients présentent des granules intracellulaires géants dans leurs polynucléaires neutrophiles, ce qui n'est jamais observé dans l'HPS.

### Partie 3. Génétique de l'albinisme

Comme nous l'avons vu précédemment, de nombreux gènes sont impliqués dans l'acquisition de la pigmentation, du développement embryonnaire jusqu'à la vie adulte. Tout défaut d'un acteur impliqué dans la pigmentation entraîne donc des atteintes plus ou moins visibles, isolées ou syndromiques. Même si certaines formes peuvent paraître faciles à diagnostiquer cliniquement, le diagnostic moléculaire est fondamental car il permet de dépister les formes syndromiques qui nécessitent la mise en place de surveillances et de prises en charges préventives ou curatives. Le diagnostic moléculaire permet également le conseil génétique.

Au début de cette thèse, 19 gènes étaient connus et associés à l'albinisme syndromique ou non et au syndrome apparenté, le FHONDA (Tableau 2).

Classification	Gene	Type d'albinisme
OCA1	<i>TYR</i>	Oculocutaneous albinism Type 1
OCA2	<i>OCA2</i>	Oculocutaneous albinism Type 2
OCA3	<i>TYRP1</i>	Oculocutaneous albinism Type 3
OCA4	<i>SLC45A2</i>	Oculocutaneous albinism Type 4
OCA5	Non identifié	Oculocutaneous albinism Type 5
OCA6	<i>SLC24A5</i>	Oculocutaneous albinism Type 6
OCA7	<i>LRMDA=C10orf11</i>	Oculocutaneous albinism Type 7
OA1	<i>GPR143</i>	Ocular albinism Type 1 (X-linked)
CHS	<i>LYST</i>	Chediak-Higashi Syndrome
HPS1	<i>HPS1</i>	Hermansky-Pudlak Syndrome Type 1
HPS2	<i>AP3B1</i>	Hermansky-Pudlak Syndrome Type 2
HPS3	<i>HPS3</i>	Hermansky-Pudlak Syndrome Type 3
HPS4	<i>HPS4</i>	Hermansky-Pudlak Syndrome Type 4
HPS5	<i>HPS5</i>	Hermansky-Pudlak Syndrome Type 5
HPS6	<i>HPS6</i>	Hermansky-Pudlak Syndrome Type 6
HPS7	<i>DTNBP1</i>	Hermansky-Pudlak Syndrome Type 7
HPS8	<i>BLOC1S3</i>	Hermansky-Pudlak Syndrome Type 8
HPS9	<i>BLOC1S6</i>	Hermansky-Pudlak Syndrome Type 9
HPS10	<i>AP3D1</i>	Hermansky-Pudlak Syndrome Type 10
FHONDA	<i>SLC38A8</i>	Foveal Hypoplasia, Optic Nerve Decussation defects and Anterior segment dysgenesis

Tableau 2. Liste des gènes connus d'albinisme et apparenté

La majorité de ces pathologies se transmettent sur un mode autosomique récessif. Ceci veut dire que la pathologie se déclare seulement si les deux copies (ou allèles) d'origine maternelle et paternelle d'un gène sont touchées par un variant pathogène. Les personnes porteuses d'un variant pathogène sur un seul allèle sont nommées hétérozygotes ou porteurs sains. Un couple d'hétérozygotes présente un risque sur quatre d'avoir un enfant atteint. L'exception est l'albinisme oculaire (OA1), lié au gène *GPR143*, situé sur le chromosome X. L'OA1 est récessif

lié à l’X, et les hommes n’ayant qu’un seul chromosome X seront donc atteints si leur seul allèle est porteur d’un variant pathogène. Des femmes peuvent être atteintes si leurs deux X sont porteurs d’un variant, leur père étant alors forcément atteint. Une femme hétérozygote peut aussi être atteinte en cas de biais d’inactivation de l’X défavorable, ceci étant très rare (en cas de translocation X-autosome par exemple). Cependant les mères hétérozygotes peuvent présenter une hypopigmentation rétinienne ponctuée, reflétant le biais d’inactivation aléatoire de chaque cellule oculaire.

L’intérêt du diagnostic génétique est donc multiple mais permet notamment de rechercher les variants impliqués chez des apparentés et de leur proposer un conseil génétique. Bien que l’intérêt éthique d’un diagnostic prénatal soit à discuter pour chaque couple demandeur, il est néanmoins techniquement possible de le réaliser si les variants pathogènes sont identifiés. La réalisation d’un diagnostic prénatal est discutée en comité pluridisciplinaire de diagnostic prénatal (CPDPN), sur demande expresse du couple. En cas d’enfant atteint, le couple pourrait demander une interruption de la grossesse pour raison médicale qui serait également étudiée en CPDPN.

Le laboratoire de génétique moléculaire du CHU de Bordeaux propose depuis près de 20 ans le diagnostic moléculaire d'albinisme. Initialement, seule l'analyse par séquençage Sanger des gènes les plus fréquemment touchés était proposée, hiérarchisée selon l'aspect clinique du patient. Depuis l'avènement du séquençage haut-débit, ces analyses ont évolué et continuent d'évoluer pour proposer actuellement un panel contenant non seulement les 19 gènes connus d'albinisme et du FHONDA, mais également des diagnostics d'anomalies de pigmentation apparentées comme les syndromes de Waardenburg, de Griscelli et le piebaldisme.

En 2018, le laboratoire a fait la synthèse de son activité sur l'analyse de 990 patients. (114) Au total, plus de 1600 patients ont été analysés à ce jour. Le Tableau 3 répertorie l'ensemble des patients analysés par notre laboratoire en diagnostic jusqu'à fin 2020. La répartition des patients entre les différentes formes d'albinisme est similaire à celle rapportée en 2018.

Gène	Patients	
	N	%
<i>TYR</i>	238	14,2
<i>TYR (R402Q)</i>	238	14,2
<i>OCA2</i>	359	21,4
<i>TYRP1</i>	24	1,4
<i>SLC45A2</i>	111	6,6
<i>SLC24A5</i>	30	1,8
<i>LRMDA</i>	4	0,2
<i>DCT</i>	2	0,1
<i>SLC38A8</i>	7	0,4
<i>LYST</i>	3	0,2
<i>GPR143</i>	82	4,9
<i>FRMD7</i>	13	0,8
<i>HPS1</i>	30	1,8
<i>HPS2</i>	0	0,0
<i>HPS3</i>	6	0,4
<i>HPS4</i>	5	0,3
<i>HPS5</i>	13	0,8
<i>HPS6</i>	18	1,1
<i>HPS7</i>	1	0,1
<i>HPS8</i>	3	0,2
<i>HPS9</i>	1	0,1
<i>HPS10</i>	0	0,0
<i>HPS11</i>	2	0,1
<i>Waardendurg</i>	4	0,2
<i>Pax6</i>	3	0,2
1 variant	216	12,8
Non résolu	268	15,9
Total	1681	

Tableau 3. Répartition des patients par gène à l'issue 2020.

A l'issue de cette analyse, environ 30% des patients n'ont pas de confirmation moléculaire diagnostique. Environ 13% des patients n'ont qu'un seul variant pathogène de l'un des gènes connus de transmission autosomique récessive et 16% n'ont pas de variant pathogène du tout. Il existe donc probablement des variants non identifiés, qui peuvent se trouver dans les régions non explorées par nos techniques, qui se focalisent sur les exons et les jonctions exons-introns, élargies à une cinquantaine de bases de part et d'autre. Les variants introniques profonds et des régions intergéniques (notamment au niveau de régions régulatrices) ne peuvent donc pas être identifiés actuellement. Par ailleurs, certaines anomalies de structures ne peuvent être visualisées par nos techniques comme les inversions, insertions ou translocations équilibrées. Cet aspect ne sera pas exploré dans cette thèse.

Une autre hypothèse est que de nouveaux gènes sont impliqués dans l'albinisme. En effet de nombreux gènes sont impliqués dans la pigmentation, nombreux sont connus comme responsables d'hypopigmentation chez la souris, et il est probable que certains d'entre eux soient également impliqués chez l'homme.

Enfin, nous verrons que certains patients qui sont adressés au laboratoire avec des formes modérées ont en fait des pathologies différentes et que l'analyse moléculaire peut non seulement affiner le diagnostic clinique mais également remettre ce dernier en cause.

## Objectif de la thèse

Ce travail de thèse a consisté en la recherche de nouveaux gènes impliqués dans des formes isolées ou syndromiques d'albinisme oculaire ou oculocutané. Pour ce faire, un panel de 129 gènes candidats a été élaboré grâce à une analyse bibliographique permettant d'identifier des gènes impliqués dans la pigmentation soit chez des modèles animaux d'albinisme ou d'hypopigmentation, soit impliqués dans les voies biologiques communes aux gènes déjà connus comme impliqués dans l'albinisme humain et animal. 230 patients sans diagnostic moléculaire à l'issue de l'analyse des 19 gènes connus ont été inclus et analysés. Nous présenterons dans ce travail les principaux résultats à travers deux articles décrivant l'identification de deux nouveaux gènes grâce à cette approche. Un troisième article publié permet de décrire en détail des patients présentant un syndrome d'Hermansky-Pudlak de type 8 liée au gène *BLOC1S3*, l'une des formes les plus rare et permettant d'illustrer l'intérêt du diagnostic moléculaire dans des formes pauci-symptomatiques.

# MATERIEL ET METHODE

---

Cette partie aborde brièvement la mise au point du panel de gène candidat et son analyse, ayant permis d'identifier deux nouveaux gènes. Les matériels et méthodes spécifiques ayant permis la validation des nouveaux gènes sont détaillées dans les articles ci-après.

## I. Panel de gènes candidats

L'objectif de ce travail était de découvrir de nouveaux gènes d'albinisme. Pour identifier des variants pathogènes responsables d'albinisme chez des patients cliniquement suspectés mais non résolus moléculairement, l'approche choisie a été de séquencer des gènes candidats. Ces gènes ont été sélectionnés pour leur implication dans des phénotypes d'hypopigmentation généralisée chez des modèles animaux (souris, poisson zèbre, drosophile entre autres) ou par leur participation à des voies impliquées dans la pigmentation, à l'instar des 19 gènes déjà connus.

Ce panel a été mis au point par des recherches extensives bibliographiques préalablement au début de cette thèse. Il contient 129 gènes. La liste complète des gènes (Annexe 1) ne sera pas détaillée dans ce manuscrit mais nous citerons ici certains des gènes et voies biologiques parmi les plus représentatifs, à titre d'illustration.

### I.1 Gènes responsables d'hypopigmentation voire d'albinisme chez la souris

#### *DCT*

*DCT* ou Dopachrome Tautomerase, aussi appelé *TYRP2* (*Tyrosinase-Related-Protein 2*) est une enzyme impliquée dans la synthèse de mélanine, en aval de Tyrosinase et en amont de *TYRP1* (*Tyrosinase-Related-Protein 1*). Les variants pathogènes de *Dct* chez la souris entraînent une hypopigmentation modérée ayant donné le nom *Slaty* (ardoisée) (Figure 47). (115) Ce gène était un très bon candidat mais jusqu'à présent aucun PVA avec des variants pathogènes de *DCT* n'avait été identifié.



Figure 47. Souris WT *Nonagouti* (noire, gauche) *a/a*, Souris avec variant de *Tyrp1*, *brown* (au-dessus) *Tyrp1<sup>b</sup>/Tyrp1<sup>b</sup>*, Souris avec variant de *Dct* : *Tyrp2*, *Slaty* (droite) *Dct<sup>slt</sup>/Dct<sup>slt</sup>*.(116)

## PMEL

*PMEL* (*PREMELANOSOME PROTEIN*, OMIM \*155550) est une protéine impliquée dans la biogenèse des mélanosomes puisqu'elle constitue les fibres qui permettent l'accumulation de mélanine dans les eumélanosomes. Le gène *PMEL* comporte de nombreux alias : *PMEL17*, *GP100*, *SILV*, *ME20*. Les souris avec variants de *Pmel* sont hypopigmentées, donnant notamment l'allèle *Silver* (Figure 48).

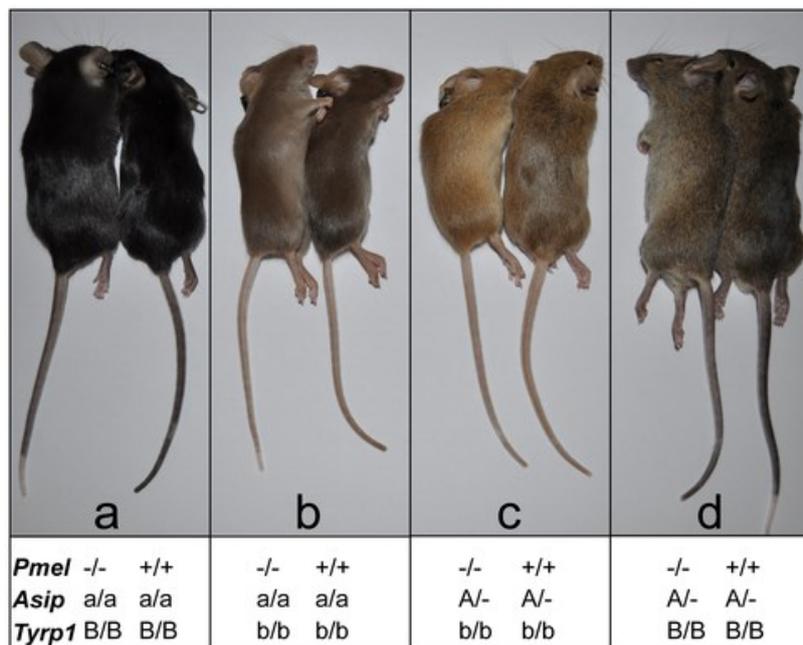


Figure 48. Différentes dilutions de la robe en fonction de la composition allélique. *Asip* : locus agouti, dominant (a et b vs c et d) *Tyrp1* : l'allèle muté récessif b est responsable d'une dilution par rapport au WT B (a, droite vs b droite pour le noir et d droite versus c droite pour l'agouti). *Pmel* ajoute un degré de dilution de plus (gauche versus droite). (117)

Chez le chien, le motif *Merle* transmis selon un mode autosomique dominant incomplet est lié à une insertion d'un retrotransposon de type *Short interspersed Element* (SINE) à la jonction entre l'intron 10 et l'exon 11 du gène *Silv*. Le phénotype de ces chiens est un équivalent du syndrome de Waardenburg avec des hypopigmentations en aires, des troubles ophtalmologiques et une surdité (Figure 49). (118)

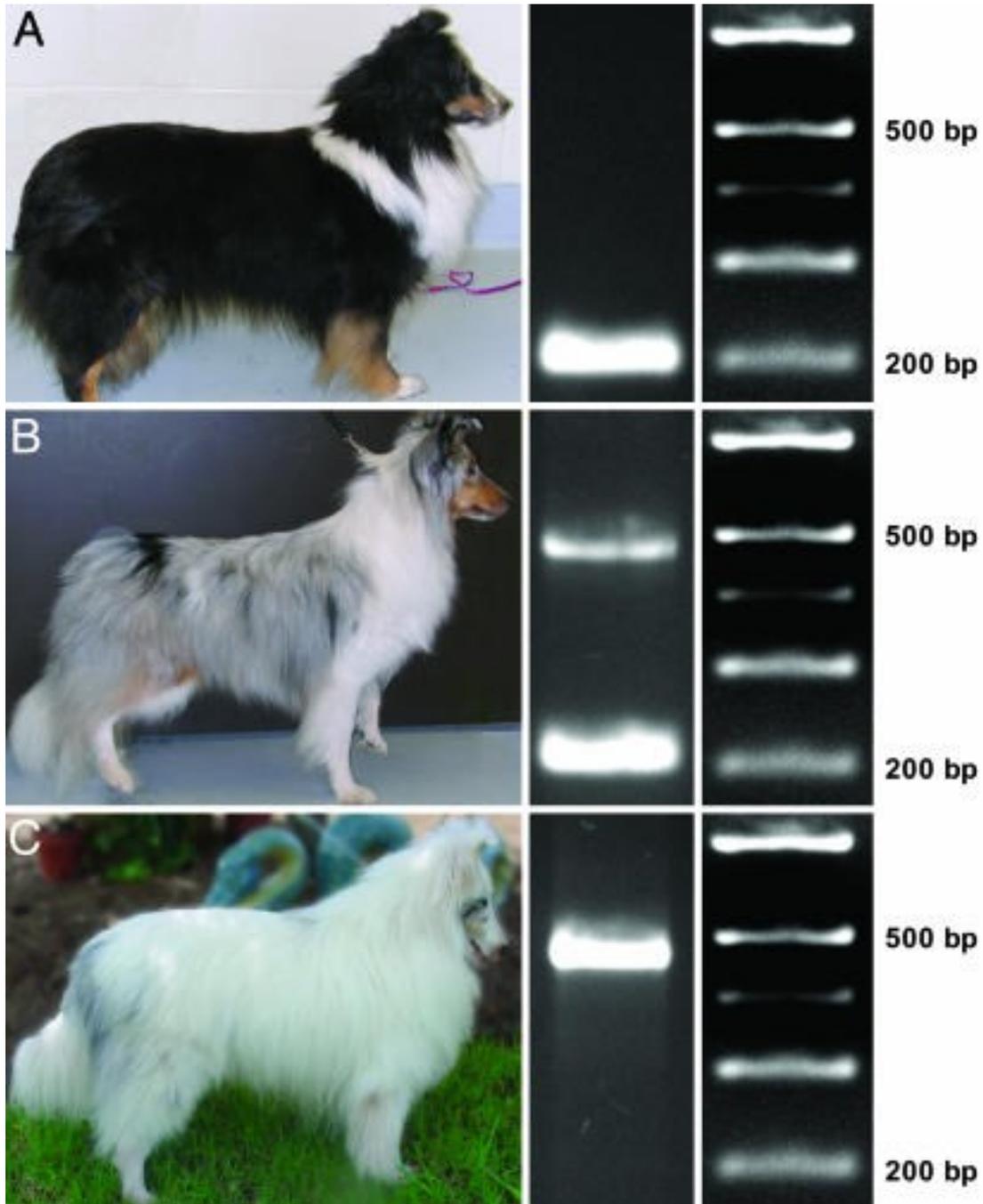


Figure 49. Variants du gène *Silv* et phénotype *Merle* chez le chien. (118)  
 Gauche phénotype, droite produit de PCR de l'exon 11 et marqueurs de taille. A. Chien WT(mm).B. Chien Merle (mM), hétérozygote C. Chien double merle (MM) homozygote.

### *MLANA*

*MLANA* (*MELAN A*, OMIM \*605513), aussi connu sous le nom de *MART-1* (*MELANOMA ANTIGEN RECOGNIZED BY T CELLS 1*) code une protéine impliquée dans la biogenèse des mélanosomes. La souris avec variants de *Mart-1* est légèrement hypopigmentée (Figure 50). L'inactivation de *MLANA* par un ARN interférent (siRNA) induit une diminution d'expression

de *PMEL* et entraîne un défaut d'acheminement de *PMEL* vers les mélanosomes. *MLANA* interagit également avec *GPR143* et son inactivation entraîne une perte de stabilité de *GPR143* et un phénotype mélanosomal similaire à la perte de fonction de *GPR143*. (119)



Figure 50. La souris *Mart-1<sup>-/-</sup>* est hypopigmentée et légèrement plus claire que la souris *MART-1<sup>+/+</sup>* de la même portée. (120)

## VPS33A

*VPS33A* (*VACUOLAR PROTEIN SORTING 33, YEAST, HOMOLOG OF, A* ; OMIM \*610034) code une sous-unité du complexe Class-C VPS appartenant au complexe HOPS (Homotypic Fusion and Vacuole Sorting) impliqué dans la fusion des endosomes et des lysosomes.

Les mutations des sous-unités du VPS class C sont responsables de dysfonction des LRO chez la souris, la mouche et les nématodes. Dans la levure le complexe HOPS facilite l'arrimage des vésicules recouvertes d'AP3 à la vacuole, suggérant un rôle dans la fusion des transports AP3-dépendants avec les mélanosomes précoces chez les mammifères. (21)

Les variants pathogènes de *VPS33A* sont responsables d'un phénotype HPS-like chez la souris *Buff* (Figure 51). (121) En revanche, les mutations de *VPS33B* (OMIM \*608552) chez l'Homme sont responsables d'un syndrome d'arthrogrypose, dysfonction rénale, cholestase sans albinisme, suggérant une fonction des complexes VPS classe C à des stades différents du trafic membranaire. (122)

En 2017, un variant pathogène de *VPS33A* (NM\_022916.4:c.1492C>T p.(Arg498Trp)) a été rapporté dans plusieurs familles comme impliqué dans un phénotype de mucopolysaccharidose sévère avec une atteinte typique associant traits épais, déficience intellectuelle, atteinte squelettique et respiratoire et hépatosplénomégalie, ainsi que des atteintes atypiques au niveau cardiaque, rénale et hématopoïétiques, avec un pronostic vital défavorable. L'hypopigmentation ne semble pas rapportée chez ces patients. (123) Il semble donc que le fonctionnement de ce complexe chez l'humain et la souris soit différent. Cependant un seul

variant a été rapporté, et il se pourrait que des variants affectant différemment *VPS33A* aient des effets différents.



Figure 51. Souris *buff* (droite) et souris WT (gauche). (124)

### *BLOC1S4*

*BLOC1S4* est une sous-unité du complexe BLOC-1 (Biogenesis of Lysosome Related Organelles Complex 1). Les variants pathogènes de *BLOC1S4* sont associés à un phénotype d'HPS chez la souris *Cappucino* (Figure 52). (125)



Figure 52. Souris *Cappucino* (avant) et souris WT (arrière). (125)

### *BLOC1S5*

*BLOC1S5* est une autre des sous-unités de BLOC-1. La souris *Muted*, porteuse d'un variant pathogène homozygote de *Bloc1s5*, présente un phénotype d'HPS (Figure 53). (126)



Figure 53. Souris *Muted* (droite) et souris WT agouti (gauche). (126)

Les trois autres sous-unités manquantes, BLOC1S1 (\*601444), BLOC1S2 (\*609768) et BLOC1S7 ou Snapin (\*607007), sont communes à un autre complexe, le complexe BORC (BLOC-1-related complex). L'inactivation homozygote de ces gènes entraîne une létalité pré ou périnatale, ce complexe semble donc plus essentiel pour la survie que BLOC-1. (127)

### *RAB38*

RAB38 est une protéine de la famille des RAB-GTPase, telle RAB27A, impliquée dans la régulation de la biogenèse du mélanosome et localisée à la membrane mélanosomale. (128)

Des mutations de *Rab38* chez la souris *Chocolate* (Figure 54) entraînent une hypopigmentation modérée de la fourrure avec un pelage brun, similaire à l'atteinte de *Tyrp1*, mais d'importants défaut de maturation des mélanosomes de la rétine. Cette souris présente également une atteinte de la biogenèse des corps lamellaires pulmonaires, mais pas d'atteinte plaquettaire. Chez le rat *ruby* l'atteinte de ce gène entraîne un phénotype HPS avec trouble de l'hémostase et atteinte pulmonaire. (129,130)



Figure 54. A. Phénotype de la souris *Chocolate* (droite) et WT (gauche) B. Œil de Souris WT et C. Œil de la souris *Chocolate*, hypopigmenté. (129)

Il semble que la dilution modérée observée chez la souris mutée RAB38 puisse s'expliquer par une redondance fonctionnelle avec RAB32. Un orthologue RAB38/32 chez la mouche entraîne un défaut de formation des granules pigmentaires. Dans les mélanocytes déficients en RAB38 et 32, TYR et TYRP1 sont délocalisées au réseau trans-golgien ou dégradés dans les lysosomes. Un défaut de VARP, un des effecteurs de RAB32/38, entraîne le même type de délocalisation. Encore d'autres protéines de la famille RAB interviennent dans les voies du mélanosome (RAB7A, 9, 31,32, 33A...). (21)

## RAB32

La protéine RAB32 exerce également des fonctions dans la voie de biogenèse des LRO. Chez l'humain et la souris, contrairement au rat, les plaquettes expriment également RAB32.

La souris avec variants homozygotes de *Rab32* ne présente pas d'hypopigmentation par rapport à la souris WT et ne présente pas d'atteinte pulmonaire. La souris avec double KO *Rab38* et *Rab32* présente un phénotype HPS et une hypopigmentation très marquée, indiquant des rôles redondants dans la formation des granules denses plaquettaires (Figure 55). (131)



Figure 55. De droite à gauche, Souris WT, Souris KO *Rab38* uniquement (pigmentation similaire à la souris *Chocolate*), Souris double KO *Rab32* et *Rab38* et souris KO *Rab38* et hétérozygote pour le variant *Rab32*, présentant une hypopigmentation intermédiaire entre la double KO et la KO *Rab38*. (131)

## RABGGTA

Dans cette famille des protéines Rab, d'autres acteurs sont altérés dans des modèles animaux présentant des défauts de pigmentation. RAB27A (impliquée dans le syndrome de Griscelli) est une cible de RAGGTA (Rab-geranylgeranyl transferase type-2 subunit-alpha), protéine d'expression restreinte aux mélanocytes et quelques autres types cellulaires. La sous-unité RABGGTA lorsqu'elle est mutée donne lieu au phénotype *gunmetal* chez la souris (Figure 56), un autre modèle d'HPS. (132)



Figure 56. Souris *gunmetal* RABGGTA<sup>-/-</sup> à gauche, souris WT à droite. (132)

## I.2 Gènes codant des protéines de voies biologiques de la pigmentation et des mélanosomes

### Complexe phosphoinositide 5-kinase

Les mélanosomes sont des organelles dynamiques et les lipides membranaires qui les composent sont impliqués dans cette dynamique. Les mélanosomes contiennent notamment le phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate (PI(3,5)P<sub>2</sub>), un phospholipide présent dans les endosomes tardifs et les lysosomes et intervenant dans la régulation du trafic membranaire. Ce phospholipide est synthétisé par le complexe phosphoinositide 5-kinase, constitué de PIKFYVE (PHOSPHOINOSITIDE KINASE FYVE-TYPE ZINC FINGER CONTAINING, \*609414), FIG4 (FIG4 PHOSPHOINOSITIDE 5-PHOSPHATASE, \*609390), et VAC14 (VAC14 COMPONENT OF PIKFYVE COMPLEX, \*604632). Des anomalies de PI(3,5)P<sub>2</sub> sont impliquées dans l'hypopigmentation. PIKFYVE serait impliquée dans la fusion des mélanosomes stades I aux lysosomes, et dans la régulation du trafic des cargo mélanosomaux ainsi que dans la formation des fibres de PMEL. (128) Le KO homozygote de *Pikfyve*, *Vac14* ou *Fig14* est létal chez la souris, avec une létalité embryonnaire pour *Pikfyve* ne laissant pas observer de défaut de pigmentation contrairement aux variants de *Vac14* et *Fig4*. Des expériences de KO-conditionnel de *Pikfyve*, circonscrit aux mélanocytes, ont permis de démontrer un défaut de pigmentation lié à un blocage de PMEL et du trafic de TYRP1 vers le mélanosome. (133) Un variant faux-sens homozygote de *Vac14* chez la souris *Ingl3* est responsable d'un phénotype sévère avec retard de croissance et dilution de la pigmentation et un décès précoce autour de 3 semaines de vie. Chez l'humain, le gène *VAC14* (OMIM \*604632) est associé à une dégénérescence neuronale nigrostriée infantile, autosomique récessive, associée à une régression psychomotrice et à une accumulation de vacuoles dans les fibroblastes des patients. (134) Quant à *FIG4* (OMIM \*609390), il est associé à plusieurs pathologies neurologiques chez l'humain : maladie de Charcot-Marie-Tooth type 4J et syndrome de Yuris-Varon, autosomiques récessifs, ainsi que la sclérose latérale amyotrophique, autosomique dominante. La souris *pale tremor* présente des tremblements, un trouble de la marche et une hypopigmentation, liés à une insertion homozygote d'un transposon de 5kb dans un intron entraînant un épissage aberrant de *Fig4*.

## *TPCN2*

Le gène *TPCN2* (TWO-PORE SEGMENT CHANNEL 2) code TPC2, un canal ionique exprimé par les mélanocytes et localisé à la membrane mélanosomale. Une étude d'association a impliqué ce gène dans la pigmentation humaine chez des européens. (135) Un KO par CrispR-Cas9 dans des lignées pigmentées MNT-1 a résulté en une augmentation de la pigmentation et un knock-down par ARN interférant (si-RNA) a confirmé cette augmentation dans des cellules primaires humaines. Des modifications de la taille et du pH luminal des mélanosomes traités ont été constatés. (136) Des variants gain de fonction sont associés aux cheveux blonds. (137)

## Complexe WASH

Le complexe WASH est impliqué dans la formation des réseaux d'actine. Il est composé de 5 sous-unités : WASHC1 ou WASH, WASHC2 ou FAM21C, WASHC3 ou CCDC53, WASHC4 ou KIAA1033 et WASHC5 ou Strumpellin. Ce complexe est impliqué dans la machinerie du transport mélanosomal et contribue à la constriction et la fission des tubules mélanosomaux. TYRP1 s'associe à la sous-unité WASHC1, tandis qu'une autre sous-unité, la Strumpellin, s'associe, elle, à la myosine6. La perte du complexe WASH entraînerait un phénotype mélanosomal équivalent à la perte de la myosineVI, les mélanocytes déficients en *WASH1* ont un contenu en mélanine augmenté indiquant un rôle dans l'homéostasie de ces organelles. (138)

## II. Séquençage haut-débit ou NGS

L'ADN préalablement extrait de 230 patients a été étudié par séquençage haut-débit. Le séquençage est la technique qui permet de lire une séquence d'ADN et d'identifier des variations de celle-ci par rapport à une séquence de référence. La séquence de référence utilisée pour les analyses du présent travail est la séquence du génome humain version hg19 ou GRCh37. Le séquençage haut-débit permet de lire des millions de séquences en simultanément, on parle de séquençage massif en parallèle ou séquençage nouvelle génération (NGS).

Le laboratoire dispose de la technologie Ion Torrent (Life, ThermoFisher Scientific, Eindhoven, The Netherlands) basée sur les semi-conducteurs, utilisant la détection de modifications infimes du pH. (139)

A l'issue du séquençage, les données brutes issues du séquençage sont transformées en séquences analysables en passant par différentes étapes informatiques.

Tout d'abord les variations de pH enregistrées par le séquenceur sont transformées en suite de bases : c'est l'étape du *basecalling* qui produit un fichier SAM (*Sequence Alignment Map*). Les séquences des bases doivent ensuite être alignées sur la séquence de référence afin de déterminer l'origine génomique de chaque fragment : c'est l'alignement. Les séquences alignées sont présentes dans un fichier nommé BAM (*Binary SAM*) qui permet de visualiser les *reads* grâce à des logiciels adaptés (par exemple : Alamut Visual, SOPHiA GENETICS, Saint-Sulpice, Switzerland). Le nombre de fois qu'une base à une position génomique donnée est effectivement lue représente la profondeur. Si une base est séquencée 30 fois, on parle de 30X de profondeur. L'ensemble des bases du génome qui ont été séquencées avec une profondeur suffisante (en générale au moins 20X, mais cette valeur est déterminée selon l'utilisation des données) est appelée couverture. La profondeur et la couverture sont deux paramètres de qualité très importants à suivre.

Chaque différence entre la séquence lue et la séquence de référence est référencée pendant l'étape du *variant calling*. A l'issue du *variant calling*, un fichier vcf (fichier vCard) est généré, qui peut être ouvert par un tableur comme Excel (Microsoft). Ces variants sont ensuite annotés. L'annotation permet de récupérer des informations sur les variants, les modifications prédites *in silico* sur la séquence protéique ou sur l'épissage, leur présence ou absence de bases de données de population générale (comme GnomAD, genome aggregation database, <https://gnomad.broadinstitute.org/> ou dbSNP, Database of Short Genetic Variations <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) ou de variants responsables de pathologies (comme Clinvar, Clinically Relevant Sequence Variations <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar> ou HGMD, Human Gene Mutation Database, <https://portal.biobase-international.com>) ainsi que

leur fréquence. Toutes ces informations sont indispensables pour permettre de filtrer les variants et ne sélectionner que ceux qui pourraient avoir un impact clinique. Nous avons utilisé les logiciels inclus dans la suite logicielle fournie avec le séquenceur pour aller jusqu'au *variant calling*. L'annotation et le filtrage des variants ont ensuite été réalisés grâce au logiciel Cartagenia NGS BenchLab puis Alissa Interpret (Agilent, Santa Clara, U.S.A.).

Nous avons choisi de ne pas filtrer les variants sur la qualité, les variants sélectionnés sur les autres critères ont été visuellement évalués sur l'aspect des BAMs dans le logiciel Alamut Visual (SOPHiA GENETICS), afin de ne pas méconnaître un variant peu couvert dans une zone mal séquencée.

Les variants fréquents dans la population générale ont été éliminés (>1% dans GnomAD), puis les variants ont été classés selon leur effet sur la protéine. Les variants ayant un effet sur le codage (modification d'un acide aminé par un autre ou faux-sens, remplacement d'un acide aminé par un codon stop ou non-sens, insertion ou délétion ne décalant pas le cadre de lecture (*in-frame*)), décalant le cadre de lecture (*frameshift*) (insertion, délétion) ou sur les sites canoniques d'épissage (5 bases en amont et en aval de la jonction) ont été priorisés. Les variants synonymes rares (<1% ou absents des bases de données de population générale) et les variations autour du site d'épissage (10 bases de part et d'autre de la jonction), et les variants de codage peu fréquents (de 1 à 5% de la population générale) ont été analysés dans un second temps.

# RÉSULTATS

## I. SÉQUENÇAGE

Cinq *runs* de séquençage haut-débit de deux puces contenant 24 librairies ont été réalisés pendant ma thèse. La qualité de ces *runs* et la quantité de *reads* par patient est homogène pour les 10 puces (Tableau 4).

Puce	Nombres de bases séquencées en Gb (Q20)*	Nombres de <i>reads</i> totaux en millions	Nombre de <i>reads</i> par patient
1	5,34	21,3	887 500
2	5,57	20,7	860 417
3	5,2	20,4	850 000
4	5,18	20,3	845 833
5	5,55	20,2	841 667
6	5,01	18,2	758 333
7	5,58	21,8	908 333
8	4,24	16,4	681 250
9	6,08	23,0	958 333
10	5,17	19,7	820 833
<b>Moyenne</b>	5,292	20,2	841 250

Tableau 4. Résumé des principales données issues de *runs* de séquençage haut-débit. \*Q20 désigne le nombre de bases lues avec une profondeur >20X et de qualité suffisante.

Mis à part de rares échecs, 230 patients ont pu être étudiés. Environ 500 à 600 variants par patient ont été mis en évidence et filtrés à l'aide du logiciel Cartagenia Bench Lab NGS pour ne sélectionner que les variants rares, exoniques ou proches de la jonction exon-intron. Selon les patients, jusqu'à une dizaine de variants ainsi filtrés ont été ensuite visualisés dans le logiciel Alamut Visual (SOPHiA GENETICS) afin d'éliminer de potentiels artefacts en observant les BAMs et la répartition des variants. Les variants hétérozygotes potentiellement pathogènes ont fait l'objet d'une analyse complète du BAM du gène pour rechercher un second évènement non appelé par le *variant calling*. Les variants du nombre de copies ont également été dépistés en utilisant le plug-in mis au point au laboratoire.

Très peu de patients avec un variant homozygote ou deux variants dans un même gène ont été mis en évidence. Deux gènes pour chacun desquels 2 patients avec variants pathogènes sont décrits dans les articles ci-après.

## II. ARTICLES

### II.1 *BLOC1S5* pathogenic variants cause a new type of Hermansky-Pudlak Syndrome.

*Genetics in Medicine*, volume 22, pages 1613–1622

Published: October 2020, PMID: 32565547 DOI: 10.1038/s41436-020-0867-5

#### RESUME :

##### Objectif

Le syndrome d'Hermansky-Pudlak (HPS) est caractérisé par l'association d'un albinisme oculocutané et de saignements excessifs, ainsi que souvent des symptômes supplémentaires. Des variants dans dix gènes différents ont été impliqués dans l'HPS. Cependant certains patients avec HPS n'ont pas de variants identifiés dans ces 10 gènes. Notre but était d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans l'albinisme isolé ou syndromique.

##### Méthodes

L'ADN de 230 patients atteints d'albinisme, sans diagnostic moléculaire, a été analysé à la recherche de variants dans un panel de gènes candidats, sélectionnés pour leur lien connu avec la pigmentation ou l'HPS.

##### Résultats

Nous avons identifié deux patientes non apparentées avec deux variants homozygotes distincts dans le gène *BLOC1S5* (Biogenesis of Lysosome related Organelles Complex-1 subunit 5). Le phénotype de ces patientes incluait un albinisme oculocutané modéré, une diathèse hémorragique peu sévère liée à un déficit d'agrégation plaquettaire et une baisse drastique du nombre de granules denses plaquettaires, en faveur d'un diagnostic clinique d'HPS. Des tests fonctionnels plaquettaires sur une patiente ont démontré l'absence du complexe multimérique obligatoire BLOC1 indiquant que le variant altère le fonctionnement de *BLOC1S5* et bloque l'assemblage de BLOC1. L'expression de l'allèle délété dérivé de la patiente dans des mélanocytes non pigmentés de souris *Bloc1s5*<sup>-/-</sup> (melan-mu) ne permet pas la restauration de la pigmentation, de l'assemblage d'un complexe BLOC1 fonctionnel et du trafic de cargo, contrairement à l'allèle sauvage non délété.

##### Conclusion

La perte de fonction de *BLOC1S5* est pathogène et nous proposons que *BLOC1S5* est le gène d'une nouvelle forme de syndrome d'Hermansky-Pudlak, HPS-11.

## Authors and affiliations

Perrine Pennamen (MD) (1,2), Linh Le (PhD) (3,4,5), Angèle Tingaud-Sequeira (PhD) (1), Mathieu Fiore (MD, PhD) (6), Anne Bauters (MD) (7), Nguyen Van Duong Béatrice (MD) (8), Valentine Coste (MD) (9), Jean-Claude Bordet (MD) (10), Claudio Plaisant (2), Modibo Diallo (MD) (1), Vincent Michaud (MD) (2), Aurélien Trimouille (MD) (1,2), Didier Lacombe (MD) (1,2), Eulalie Lasseaux (PharmD) (2), Cédric Delevoye (PhD) (11,12), Fanny Morice Picard (MD, PhD) (13), Bruno Delobel (MD) (14), Michael S. Marks (PhD) (3,4), Benoit Arveiler (PharmD, PhD) (1,2)

- 1) Rare Diseases, Genetics and Metabolism, INSERM U1211, University of Bordeaux, Bordeaux, France.
- 2) Molecular Genetics Laboratory, Bordeaux University Hospital, Bordeaux, France.
- 3) Dept. of Pathology and Laboratory Medicine, Children's Hospital of Philadelphia Research Institute, Philadelphia, PA, 19104, USA.
- 4) Dept. of Pathology, Laboratory Medicine and Dept. of Physiology, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104, USA
- 5) Cell and Molecular Biology Graduate Group, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104, USA
- 6) Laboratoire d'Hématologie, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France / Reference Center for Platelet Disorders, CHU de Bordeaux, Pessac, France
- 7) Hémostase et Transfusion CHU Lille, 59045 Lille, France
- 8) Service d'Ophtalmologie Pédiatrique, Hôpital Saint-Vincent de Paul, Lille
- 9) Service d'Ophtalmologie, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France.
- 10) Laboratoire d'Hématologie, CHU Lyon, Lyon, France
- 11) Institut Curie, PSL Research University, CNRS, UMR144, Structure and Membrane Compartments, 75005 Paris, France.
- 12) Institut Curie, PSL Research University, CNRS, UMR144, Cell and Tissue Imaging Facility (PICT-IBiSA), 75005 Paris, France.
- 13) Service de Dermatologie, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France.
- 14) Centre de Génétique Chromosomique, GHICL, Hôpital Saint Vincent de Paul - LILLE – France

## ABSTRACT

### Purpose

Hermansky–Pudlak syndrome (HPS) is characterized by oculocutaneous albinism, excessive bleeding, and often additional symptoms. Variants in ten different genes have been involved in HPS. However, some patients lack variants in these genes. We aimed to identify new genes involved in nonsyndromic or syndromic forms of albinism.

## Methods

Two hundred thirty albinism patients lacking a molecular diagnosis of albinism were screened for pathogenic variants in candidate genes with known links to pigmentation or HPS pathophysiology.

## Results

We identified two unrelated patients with distinct homozygous variants of the *BLOC1S5* gene. Patients had mild oculocutaneous albinism, moderate bleeding diathesis, platelet aggregation deficit, and a dramatically decreased number of platelet dense granules, all signs compatible with HPS. Functional tests performed on platelets of one patient displayed an absence of the obligate multisubunit complex BLOC-1, showing that the variant disrupts BLOC1S5 function and impairs BLOC-1 assembly. Expression of the patient-derived *BLOC1S5* deletion in nonpigmented murine *Bloc1s5*<sup>-/-</sup> melan-mu melanocytes failed to rescue pigmentation, the assembly of a functional BLOC-1 complex, and melanosome cargo trafficking, unlike the wild-type allele.

## Conclusion

Mutation of *BLOC1S5* is disease-causing, and we propose that *BLOC1S5* is the gene for a new form of Hermansky–Pudlak syndrome, HPS-11.

## INTRODUCTION

Hermansky–Pudlak syndrome (HPS) comprises a group of rare recessive genetic diseases (estimated incidence ~1 in 10<sup>6</sup>) in which patients suffer from oculocutaneous albinism (OCA), excessive bleeding, and in some cases lethal pulmonary fibrosis, immunodeficiency, and/or granulomatous colitis.<sup>1</sup> These symptoms result primarily from defects of cell type–specific lysosome-related organelles (LROs) (melanosomes in pigment cells and dense granules in platelets).<sup>2,3</sup> Pathogenic variants in ten different genes have been shown to cause distinct HPS isoforms. These genes encode subunits of four multisubunit protein complexes—adapter protein-3 (AP-3) and biogenesis of lysosome-related organelles complex (BLOC)-1, -2 and -3—that mediate intracellular membrane transport to maturing LROs.<sup>3</sup> However, at least some patients lack variants in known HPS genes.<sup>4</sup> Moreover, because of the multisystemic nature of

the disorder and the variable severity of the symptoms, HPS is often undiagnosed. Thus, there likely exist additional forms of the disorder with variants in additional genes. Indeed, among the many mouse models of HPS are pathogenic variants in genes encoding BLOC-1 subunits not yet identified among HPS patients.

Albinism patients may have variable hypopigmentation of the skin, hair, and eyes, ranging from a total lack of melanin to residual or even near normal melanin production. However, all albinism patients suffer from ophthalmological anomalies including nystagmus, foveal hypoplasia, chiasmatic misrouting of the optic nerves, iris transillumination, retinal hypopigmentation, and reduced visual acuity. Pathogenic variants in any of 19 genes, including the 10 HPS genes, have been identified as causative for various forms of albinism or the closely related foveal hypoplasia and optic nerve misrouting without albinism (FHONDA)<sup>5,6,7,8</sup> ([Table S1](#)). Because of the high phenotypic heterogeneity among albinism patients, establishment of genotype–phenotype correlations and clinical diagnoses can be difficult to achieve, leading to underdiagnosis of the disease.<sup>9</sup>

Despite a thorough search for both single nucleotide variants and copy-number variants of all 19 genes, our recent screening left 27% of patients without a molecular diagnosis.<sup>8</sup> Missing variants may reside either in the introns or regulatory elements of known genes, which are not commonly analyzed in clinical laboratories, or in genes other than those identified so far.

To search for new albinism genes, we screened the genomes of 230 undiagnosed patients for variants in candidate genes. We focused on genes coding for subunits of AP-3 and BLOC-1, -2, and -3, in which variants have not been described so far, and on orthologues of additional genes known to control cargo trafficking to and from melanosomes and regulate melanosomal maturation<sup>2</sup> (see [Table S2](#)). We describe the identification in two patients with oculocutaneous albinism and mild bleeding diathesis of homozygous pathogenic variants of the *BLOC1S5* gene encoding a BLOC-1 subunit not previously identified as mutated in HPS patients.

## MATERIALS AND METHODS

### Ethics statement

This study was approved by the local authority (Comité de Protection des Personnes Sud Ouest et Outre Mer III). Informed consent was obtained from the patients and/or their parents before genetic analysis was performed. Authorization for publication and for the inclusion of photographs was obtained from the participants.

### Platelet investigations

Platelet rich plasma (PRP) was obtained from blood collected into buffered 3.2% sodium citrate.

Light transmission aggregometry (LTA) was evaluated within 4 hours of blood collection using a SD-Soderel aggregometer or APACT-4004 aggregometer (Elitech, France) and different specific agonists that included 1.25 and 5 µg/ml collagen; 3, 5, and 10 µM adenosine diphosphate (ADP); 1 mM arachidonic acid; and 0.75 and 1.25 mg/l ristocetin or thrombin receptor agonist peptide (TRAP). Percentage maximal amplitude was evaluated using an internal reference interval.

Adenosine triphosphate (ATP) secretion from platelets was tested by a lumiaggregometer assay as recommended by the instrument manufacturer (Chrono-Log Corporation, USA) using PRP, firefly luciferase reagent, and 10 µmol/l TRAP, ADP, or collagen 14 as agonists.

High-performance liquid chromatography (HPLC) with electrochemical and amperometric detection was used to measure intraplatelet serotonin (5-HT) concentration in PRP samples.

### **Electron microscopy**

For whole mount preparation, a few microliters of platelet rich plasma (PRP) were deposited on formvar-coated, carbon-stabilized grids for 1–5 minutes, rinsed in a drop of distilled water (10–15 seconds), dried from the edge with pieces of filter paper and air dried for 1 minute with gentle shaking without further chemical fixation or poststaining with contrasting agents. Samples were imaged and electron micrographs acquired with a transmission electron microscope (Tecnai Spirit G2; ThermoFisher Scientific, Eindhoven, The Netherlands) equipped with a 4k charge-coupled device (CCD) camera (Quemesa, EMSIS, Muenster, Germany) for patient 1, and JEOL 1400 (100 keV) equipped with a Gatan ORIUS SC600 camera for patient 2.

### **Sequencing of the candidate genes**

DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using an automated procedure as recommended by the manufacturer (Tecan EVO-ReliaPrep, Promega).

Next-generation sequencing (NGS) was performed using the ionTorrent technology on a S5XL instrument (Life Technologies, ThermoFisher Scientific, USA) (AmpliSeq panel) and bioinformatics analysis of variants were as previously described.<sup>8</sup> See [Supplementary Data](#) for more details.

Amplification of *BLOC1S5* exons 2 to 5 was performed as described in [Supplementary Data](#).

### **Characterization of the *BLOC1S5* gene deletion**

The *BLOC1S5* deletion was analyzed by high-resolution array comparative genomic hybridization (CGH) according to a procedure already described.<sup>8,10</sup> One hundred forty-three probes were placed along *BLOC1S5* with a median probe spacing of 173 bp.

Sequencing of the intron 2–4 deletion breakpoint was performed as described in [Supplementary Data](#).

### **Cloning of control and mutant BLOC1S5 complementary DNA and generation of recombinant retroviral expression constructs**

*BLOC1S5* isoforms were amplified from RNA extracted from patient and control blood leukocytes by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using primers located in exons 1 and 5 of the gene, based on the reference sequence NM\_201280.3 (<http://www.ensembl.org>). RT-PCR products were first subcloned in the pCS2+ vector, and then inserted into pBMN-IRES-Hygro for retroviral transduction as described.<sup>11</sup> See [Supplementary Materials and Methods](#) for detailed procedures.

### **Other procedures**

A brief description of additional procedures is provided here. See [Supplementary Materials and Methods](#) for detailed procedures.

The melan-mu3<sup>11</sup> and wild-type melan-Ink4a were maintained in culture as described.<sup>12</sup> Retrovirus production from transiently transfected Plat-E cells<sup>13</sup> and retroviral transduction of melan-mu cells were carried out as described previously.<sup>11,14</sup>

Expression of the transgenes in melan-mu3 cells was evaluated by RT-PCR directed to the hygromycin resistance gene.

Immunofluorescence microscopy (IFM) analyses of fixed cells, image deconvolution with Microvolution software, and quantification of the area of marker overlap in double labeling experiments using ImageJ (<http://fiji.sc/Fiji>; National Institutes of Health) were done as described.<sup>15</sup>

Analysis of HA, Dysbindin, Pallidin, and Tubulin proteins in patients' platelets and melan-mu3 melanocytes before and after transduction with the recombinant retroviral expression constructs was performed by western blot analysis.

Spectrophotometric assay on melanocyte lysates was done as described.<sup>16</sup>

### **Statistical analyses**

Statistical data are presented as mean ± SEM. Statistics were calculated in GraphPad Prism using ordinary one-way analysis of variance (ANOVA) or one-way ANOVA with nonparametric distribution (Kruskal–Wallis test by ranks) when specified. Significant differences between control or treated samples are indicated (\*\*\*\* $P < 0.0001$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.01$ ;  $P < 0.05$ ). Only  $P < 0.05$  was considered as statistically significant.

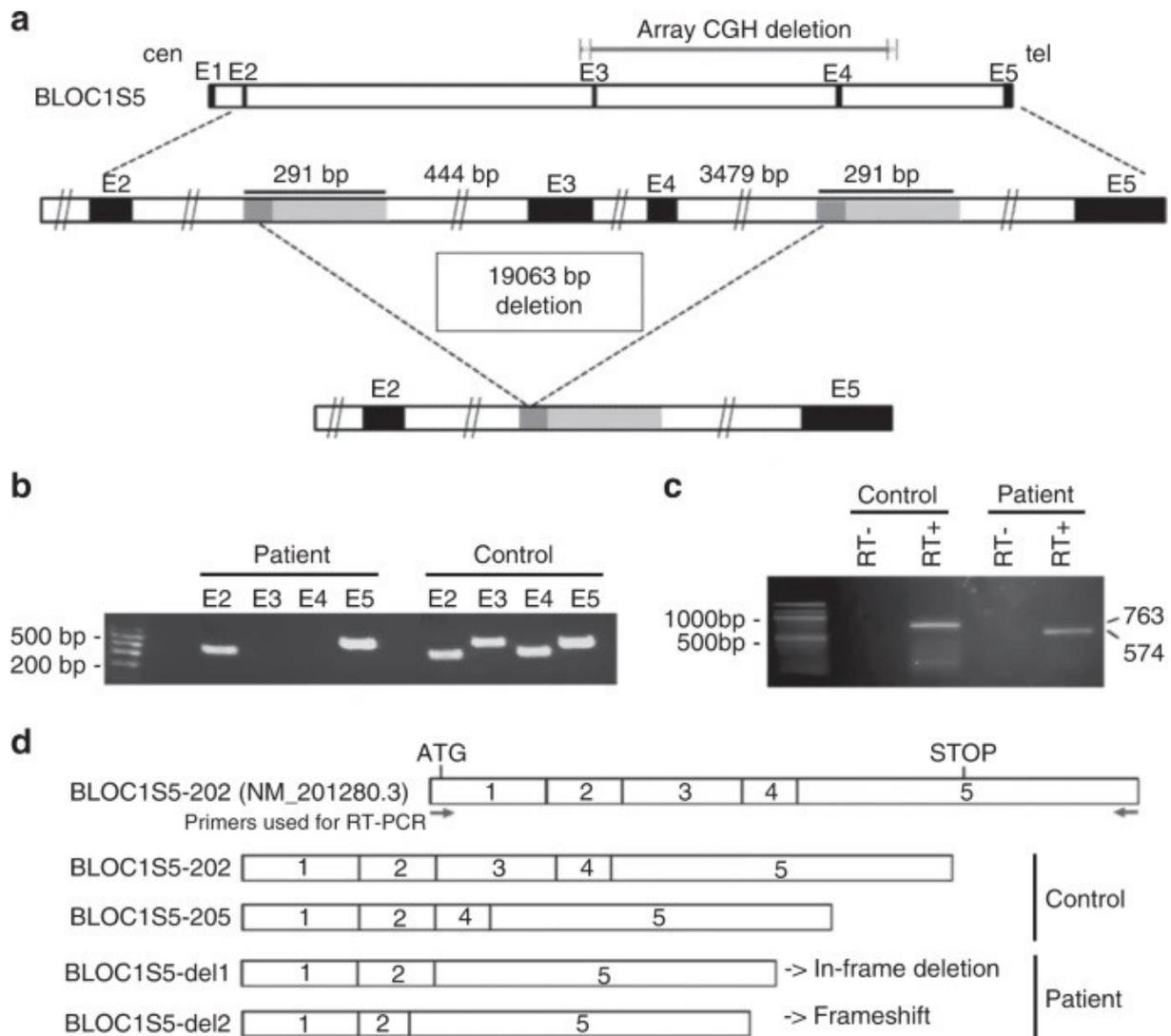
## RESULTS

### Identification of *BLOC1S5* variants

Among our cohort of more than 1500 albinism patients, 25–30% remain without a molecular diagnosis despite a thorough analysis of all 19 albinism-related genes ([Table S1](#)).<sup>7,8</sup> We hypothesized that some of these patients have pathogenic variants in candidate gene(s) selected for their potential involvement in the pathophysiology of albinism ([Table S2](#)). Therefore, 230 unsolved patients were screened for pathogenic variants of these genes using NGS. In two patients, we identified homozygous variants of the *BLOC1S5* gene (NM\_201280.2). *BLOC1S5* is one of the eight subunits of the obligate multisubunit protein complex BLOC-1, which facilitates cargo transport to melanosomes and other lysosome-related organelles in specialized cell types.<sup>3</sup> Pathogenic variants in the genes encoding three other BLOC-1 subunits (*DTNBPI*, *BLOC1S3*, and *BLOC1S6*) underlie Hermansky–Pudlak syndrome types 7, 8, and 9 respectively,<sup>17,18,19,20</sup> and *Bloc1s5* is mutated in the *muted* mouse model of HPS.<sup>21</sup> Patient 1 harbored a *BLOC1S5* deletion that was visualized in NGS data using an in-house bioinformatics plugin based on NGS read depth ([Supplementary Materials and Methods](#)). Further analysis showed that the deletion covered a 19,063-bp segment encompassing *BLOC1S5* exons 3 and 4 (Fig. 1a, b). Detailed characterization of the deletion and of the molecular mechanism involved is provided in [Supplementary Data](#). The deletion is referred to as NC\_000006.11(*BLOC1S5\_v002*):c.196–678\_384+3483del and g.8023117\_8042179del (Hg19) (ClinVar, [https://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/clinvar/submission number SUB6791269](https://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/clinvar/submission%20number%20SUB6791269)). The patient's parents were both heterozygous for the deletion, as demonstrated by array-CGH ([Figure S1A](#)). Unaffected brother and sister were not tested.

A second patient (patient 2) harbored a homozygous 1-bp deletion in exon 4 of *BLOC1S5*, NM\_201280.2:c.345del p.(Val116Serf19\*), predicted to generate a reading-frameshift and protein truncation (ClinVar submission number SUB7267982). Biparental transmission of the variant could not be proven because the patient's parents were unavailable for analysis. However, quantitative PCR analysis indicated the presence of two copies of exon 4 (data not shown), thus proving that the NM\_201280.2:c.345del variant was homozygous.

American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) classification<sup>22</sup> was in favor of patient 1's and patient 2's variants being pathogenic (patient 1: PVS1, PS3, PM2, PM3; patient 2: PVS1, PM2, PM3). Of note, these variants were not found in the GnomAD public database (<https://gnomad.broadinstitute.org/>) in either the homozygous or heterozygous state.

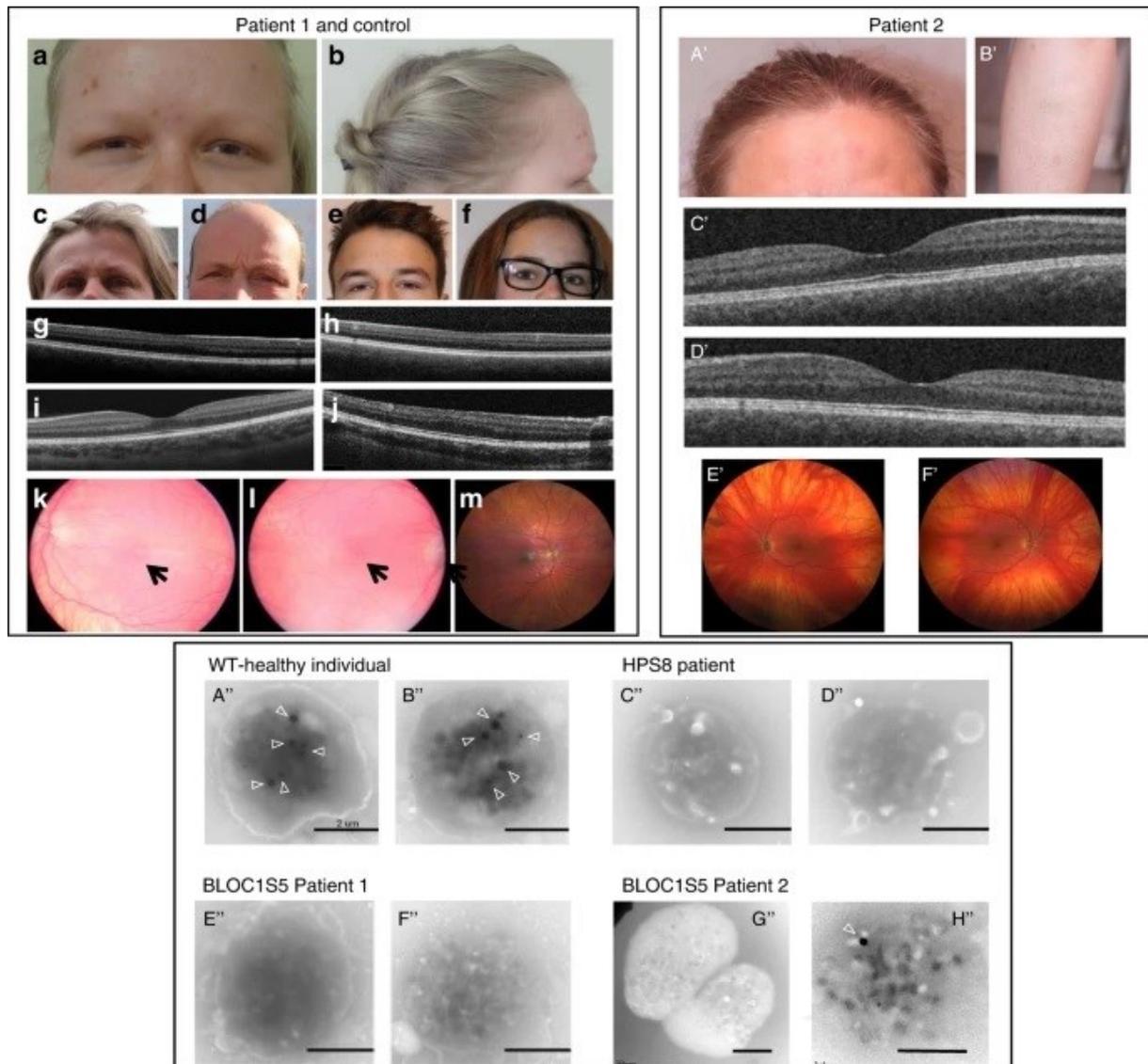


**Fig. 1: Characterization of the *BLOC1S5* deletion present in patient 1.** (a) Schematic representation of the deletion. Top: genomic representation of the *BLOC1S5* gene (approximately to scale). The five exons are represented as black boxes. *cen* centromeric side, *tel* telomeric side. Middle: The region spanning exons 2–5 of the *BLOC1S5* gene is expanded. The light gray boxes represent the 291-bp highly homologous segments (see [Supplementary Data](#) for details). The dark gray boxes represent the 57-bp perfectly homologous segment where nonallelic homologous recombination appears to have taken place in patient 1. Bottom: Deleted allele resulting from nonallelic homologous recombination, showing that the region between the two 291-bp highly homologous segments is missing. (b) Polymerase chain reaction (PCR) amplification of exons 2, 3, 4, and 5 of *BLOC1S5* in genomic DNA from a control individual and from patient 1. A size marker (100 bp ladder) is shown on the left. Exons 3 and 4 are not amplified from the patient’s DNA. (c) Reverse-transcription PCR from leukocytes’ RNA of a control individual and patient 1. Reverse-transcription PCR (RT-PCR) primers were derived from *BLOC1S5* exons 1 and 5, as shown in (d). RT- denotes without reverse transcriptase. RT+ denotes with reverse transcriptase. Bands at 763 bp (corresponding to complementary DNA [cDNA] BLOC1S5–202) and at 574 bp (corresponding to cDNA BLOC1S5–del1) are observed in the control and the patient, respectively. (d) Schematic representation of the messenger RNA (mRNA) isoforms identified in the control individual and in patient 1, as described in the main text. BLOC1S5–202 represents the theoretical wild-type isoform. Sizes of the cDNAs corresponding to the different isoforms are BLOC1S5–202 (763 bp) and BLOC1S5–205 (633 bp), BLOC1S5–del1 (574 bp), and BLOC1S5–del2 (542 bp).

## Clinical cases

Patient 1, aged 2 months at the time of diagnosis and now 20 years old, was born to parents originating from French Flanders. She was referred to our laboratory with a clinical diagnosis of mild oculocutaneous albinism. Her creamy skin and blond hair (Fig. 2a, b) were lighter than observed in her mother, father, sister, and brother (Fig. 2d–f). Ophthalmological features included nystagmus, foveal hypoplasia (Fig. 2g–j), retinal hypopigmentation with increased visibility of choroid vessels (Fig. 2k–m, and [Figure S2](#)), iris transillumination, and visual acuity of 4/10 and 5/10 in the right and left eyes, respectively.

Mild signs of bleeding diathesis were not reported initially by the patient. After the *BLOC1S5* homozygous deletion and its potential link to HPS were identified, the patient's history was found to include the following: bruises appeared easily in infancy but were not large and did not spread, episodes of epistaxis occurred once or twice a year and lasted for about a week, gingival bleeding was observed but there was no history of postsurgical hemorrhage, menorrhagia was absent. Platelet aggregation in response to a low concentration of collagen (1.25  $\mu\text{g/ml}$ ) was reduced and delayed in the patient relative to controls, with a latency of 54 seconds (33 seconds for the control), velocity of 22%/30 seconds (65%/30 seconds for the control) and maximal amplitude of 30% (83% for the control) ([Figure S3A](#)). Platelet aggregation was normal in response to a high concentration of collagen (5  $\mu\text{g/ml}$ ) and to other agonists, including ADP (3, 7, or 10  $\mu\text{M}$ ), arachidonic acid (1 mM), and ristocetin (0.75 mg/ml or 1.5 mg/ml; [Figure S3A](#)). The weak aggregation in response to low levels of collagen but normal responses to ADP (which may complement reduced ADP release from dense granules) and ristocetin (which bypasses activation pathways) are consistent with a mild defect in dense granule secretion.<sup>23</sup> Consistently, lumiaggregometry assay indicated that patient's platelets had low ATP release after TRAP activation (0.19 nM/ $10^8$  platelets; normal values > 0.30 nM/ $10^8$  platelets), and platelet serotonin storage, quantified by HPLC, was very low (9 ng/ $10^9$  platelets; normal values, 350–980 ng/ $10^9$  platelets) (not shown).



**Fig. 2: Clinical and platelet phenotype of patients 1 and 2.** Upper left and right panel: cutaneous and ocular phenotype. Photographs show hypopigmentation of hair and skin of patient 1 (a, b), compared with her unaffected mother (c), father (d), brother (e), and sister (f), and of patient 2 (a', b'). Bilateral foveal hypoplasia is seen in patient 1 (g: left eye; h: right eye), compared with a normal control (i) and a positive control (OCA1 patient) (j). Patient 2 does not have foveal hypoplasia (c': left eye; d': right eye). Retinal hypopigmentation is seen in patient 1 (k: left eye; l: right eye) compared with a normal control (m). Arrows point to hypoplasia of the macula. Patient 2 has low grade retinal hypopigmentation (e': left eye; f': right eye). Lower panel: whole mount electron microscopy of platelets. Platelets in healthy individuals displayed dense granules typically observed as round electron-dense structures (arrowheads) (a''–b''). Platelets from a HPS8 patient were used as a positive control for the absence of platelet dense granules (c''–d''). Platelets from the BLOC1S5 patient 1 harbored no round electron-dense structures (e''–f''). Most platelets from the BLOC1S5 patient 2 harbored no round electron-dense structures (g''–h''). Scale bar: 2 μm.

Platelets from patient 1, as well as from a healthy donor and a well-characterized HPS patient as controls, were analyzed by whole mount electron microscopy for dense granule content. In the healthy control, platelet dense granules appeared as 3–8 electron-dense round structures (arrowheads in Fig. 2a'', b''). By contrast, platelets from a HPS-8 patient (Fig. 2c'', d'') and from patient 1 (Fig. 2e'', f'') contained almost no dense granules (<0.1 granule per platelet). These

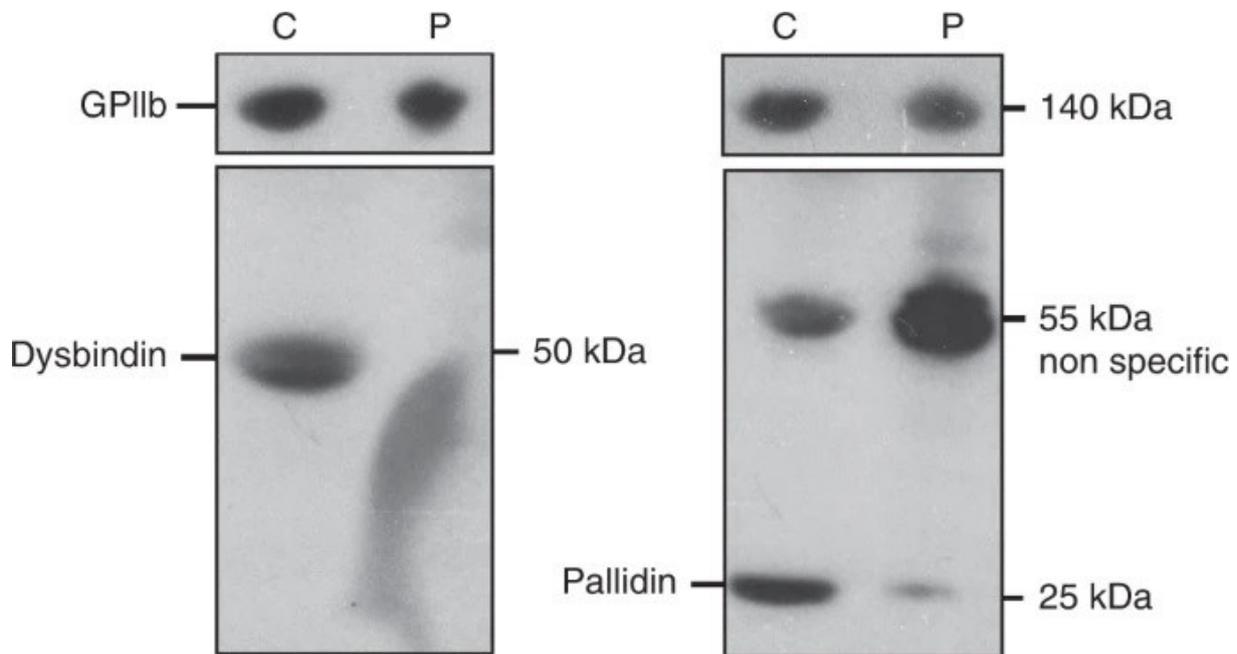
data are consistent with the mild platelet aggregation deficiency and serotonin storage pool defect observed in the patient. The data suggest that Patient 1 has a mild form of Hermansky–Pudlak syndrome, consistent with a BLOC-1 deficiency.

Patient 2 was born to nonconsanguineous parents originating from the same village of Slovenia, both with black hair. She is the only one affected of a sibship of five. She presented at birth with yellow skin and white platinum hair. At the age of 39 years she had pigmented skin, blond hair, brown iris, and numerous pigmented naevi. Mild ocular albinism included nystagmus, grade 1 retinal hypopigmentation, iris transillumination, optic nerve decussation anomalies on visual evoked potentials, strabismus, photophobia, visual acuity of 6/10 on both eyes, and normal fovea (Fig. 2a'–f'). Clinical report indicated important epistaxis, mostly in childhood, easy or unexplained bruising, menorrhagia improved by contraception, excessive blood loss after deliveries, surgery and dental extraction, as well as abdominal pain, dyspnea, and recurrent infections (pneumonia, herpes, conjunctivitis). These features suggested a syndromic form of albinism.

Further investigations showed that patient 2 had normal platelet counts ( $139\text{--}197 \times 10^9$  platelets/L) and von Willebrand factor (VWF: RCo = 60% [50–150]). Platelet aggregation tested using different agonists showed abnormal profiles upon collagen, arachidonic acid, and TRAP stimulation (Figure S3B). ATP release was also recorded by measuring luminescence from firefly luciferin-luciferase reaction using 10  $\mu\text{M}$  ADP, 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  collagen or 50  $\mu\text{M}$  TRAP-6, only revealing a slight decrease after stimulation with collagen (0.34 nmol; normal value  $>0.49$  nmol). Electron microscopy of whole mount platelets showed a strong reduction of  $\delta$ -granules numbers (mean  $\pm$  SD =  $0.2 \pm 0.5$  granule per platelet; normal values = 4.14–7.74) (Fig. 2g'–h'). Altogether these data were compatible with a quantitative defect of dense bodies.

#### **Impact of the BLOC1S5 deletion on BLOC-1 assembly and function**

BLOC-1 is an obligate multisubunit complex that is unstable in the absence of any of its subunits. Hence, expression of a subunit that is incapable of assembling into the complex results in the degradation of the other BLOC-1 subunits.<sup>24,25,26</sup> To test whether the *BLOC1S5* deletion impacted BLOC-1 stability, western blot analysis was performed on lysates of patient 1 platelets for the BLOC-1 subunits Pallidin (BLOC1S6) and Dysbindin (DTNBP1). The results showed that relative to lysates from controls, levels of both Pallidin and Dysbindin are reduced or absent in the patient's platelets (Fig. 3). We were unable to detect a specific band in control platelets with available antibodies to Muted/BLOC1S5 (not shown).



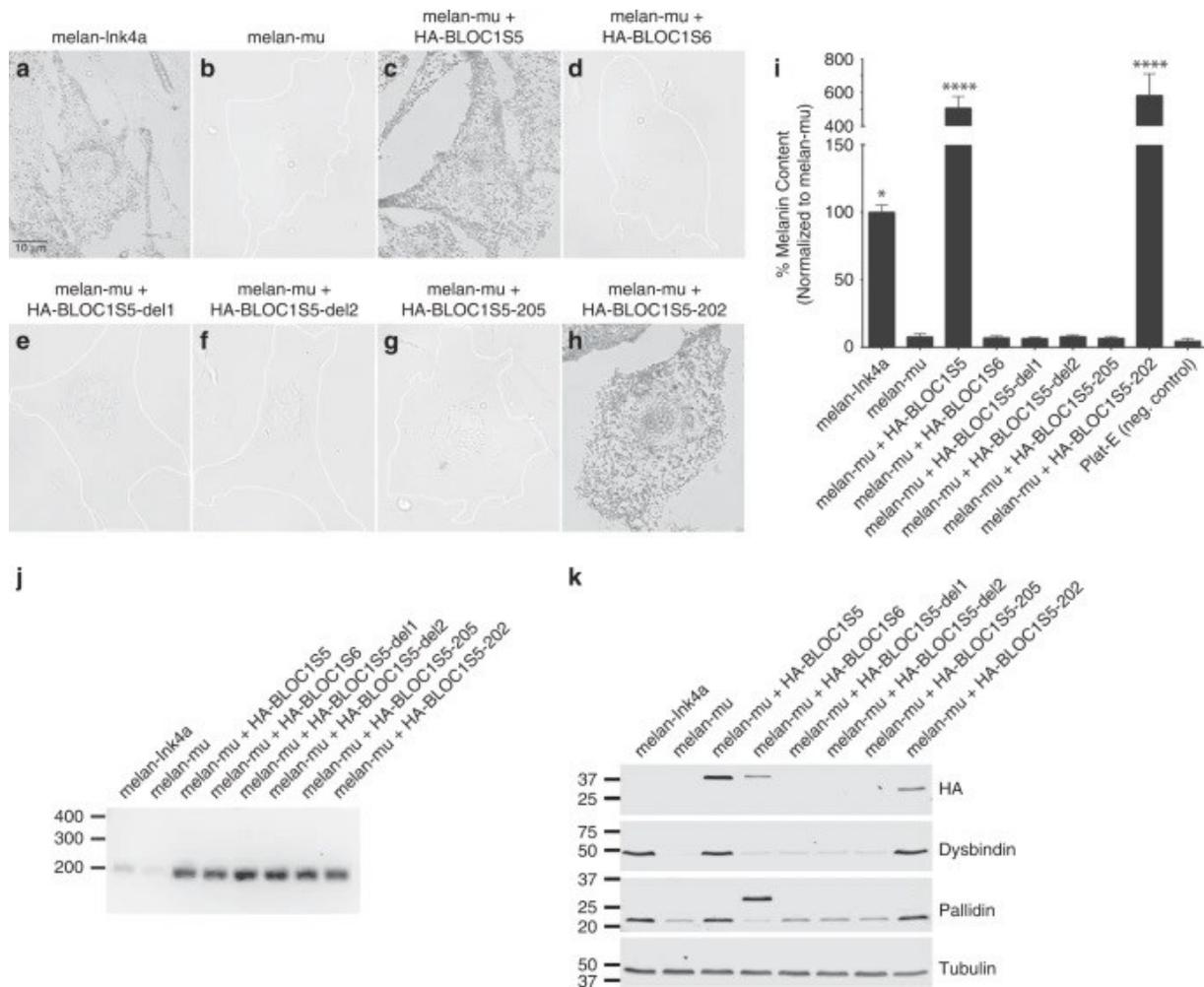
**Fig. 3: Western blots of platelet protein extracts from patient 1 (P) and a healthy control (C).** Platelet lysates were analyzed with anti-Dysbindin (left), anti-Pallidin (right) antibodies. An anti-GPIIb antibody was used as a reference. Sizes of detected proteins are indicated in kDa.

The instability of BLOC-1 in patient 1 platelets suggested that BLOC-1 function might be impaired. To definitively test whether the patient 1–derived *BLOC1S5* intragenic homozygous deletion impairs BLOC-1 function and might be causal for the HPS phenotype, we tested whether this allele was capable of rescuing the pigmentation and trafficking defects in murine *Bloc1s5<sup>mu/mu</sup>* melanocytes that lack a functional Muted/BLOC1S5 protein because of a retrotransposon insertion in the *Bloc1s5* locus.<sup>21</sup> Immortalized melan-mu melanocytes derived from these mice lack melanin and misaccumulate BLOC-1-dependent melanosome proteins, such as TYRP1, in early endosomes.<sup>11</sup> Stable “rescue” of these cells by expression of the epitope-tagged wild-type human BLOC1S5 protein restores pigmentation and normal cargo localization.<sup>11</sup> Thus, to evaluate the activity of patient 1–derived isoforms, we expressed them or control alleles as HA.11 epitope-tagged proteins by retroviral transduction in melan-mu cells, and assessed both pigmentation and TYRP1 localization.

The gene rearrangement identified in patient 1 was predicted to result in the in-frame deletion of exons 3 and 4 of the *BLOC1S5* gene (NM\_201280.2 transcript). Accordingly, RT-PCR of full-length *BLOC1S5* complementary DNA (cDNA) from the patient amplified a product containing exons 1, 2, and 5, but not exons 3 and 4 (574-bp band in Fig. 1c, corresponding to BLOC1S5-del1 represented in Fig. 1d). The patient’s cDNA also contained a shorter fragment lacking 32 bp of exon 2 (BLOC1S5-del2, Fig. 1d) that did not correspond to any alternative transcript reported in Ensembl (<http://www.ensembl.org>) and that was expected to induce a translation frameshift. In contrast, RT-PCR of control leukocytes’ messenger RNA (mRNA)

produced two cDNA species, one comprising exons 1–5 of *BLOC1S5* (763 bp band in Fig. 1c) corresponding to the full length NM\_201280.3 (*BLOC1S5*–202) (<http://www.ensembl.org>) mRNA isoform, and the other comprising exons 1, 2, 4, and 5 of *BLOC1S5*, corresponding to isoform NM\_001199323 (*BLOC1S5*–205) and predicted to be out of frame (see Fig. 1d) (the band at 633 bp is indistinguishable from the smear observed in Fig. 1c). All *BLOC1S5* cDNA species, control or patient-derived, are schematically presented in Fig. 1d.

Whereas immortalized wild-type melan-*Ink4a* melanocytes from *C57BL/6J-Ink4a-Arf<sup>-/-</sup>* mice contain pigmented melanosomes detected by bright field microscopy (Fig. 4a), melan-*mu* melanocytes are unpigmented (Fig. 4b). Pigmentation of melan-*mu* was rescued by stable expression of wild-type HA-tagged human *BLOC1S5*<sup>25</sup> (Fig. 4c) or of HA-*BLOC1S5*–202 (full-length *BLOC1S5* isoform isolated from a control donor; Fig. 4h) but not of HA-tagged *BLOC1S6* (Fig. 4d), a distinct human BLOC-1 subunit. By contrast, the expression of any of the truncated *BLOC1S5* isoforms—HA-*BLOC1S5*-del1 and HA-*BLOC1S5*-del2 from the patient or HA-*BLOC1S5*–205 from the control—was unable to rescue pigmentation (Fig. 4e–g). These results were confirmed by a quantitative melanin content assay of cell lysates (Fig. 4i). Expression of the hygromycin resistance gene from the internal ribosome entry site of the retroviral backbone confirmed stable mRNA expression of all constructs (Fig. 4j). These data indicate that neither the patient-derived *BLOC1S5* mRNA species (HA-*BLOC1S5*-del1 and HA-*BLOC1S5*-del2) nor the truncated alternative physiological allele (HA-*BLOC1S5*–205) are functional.

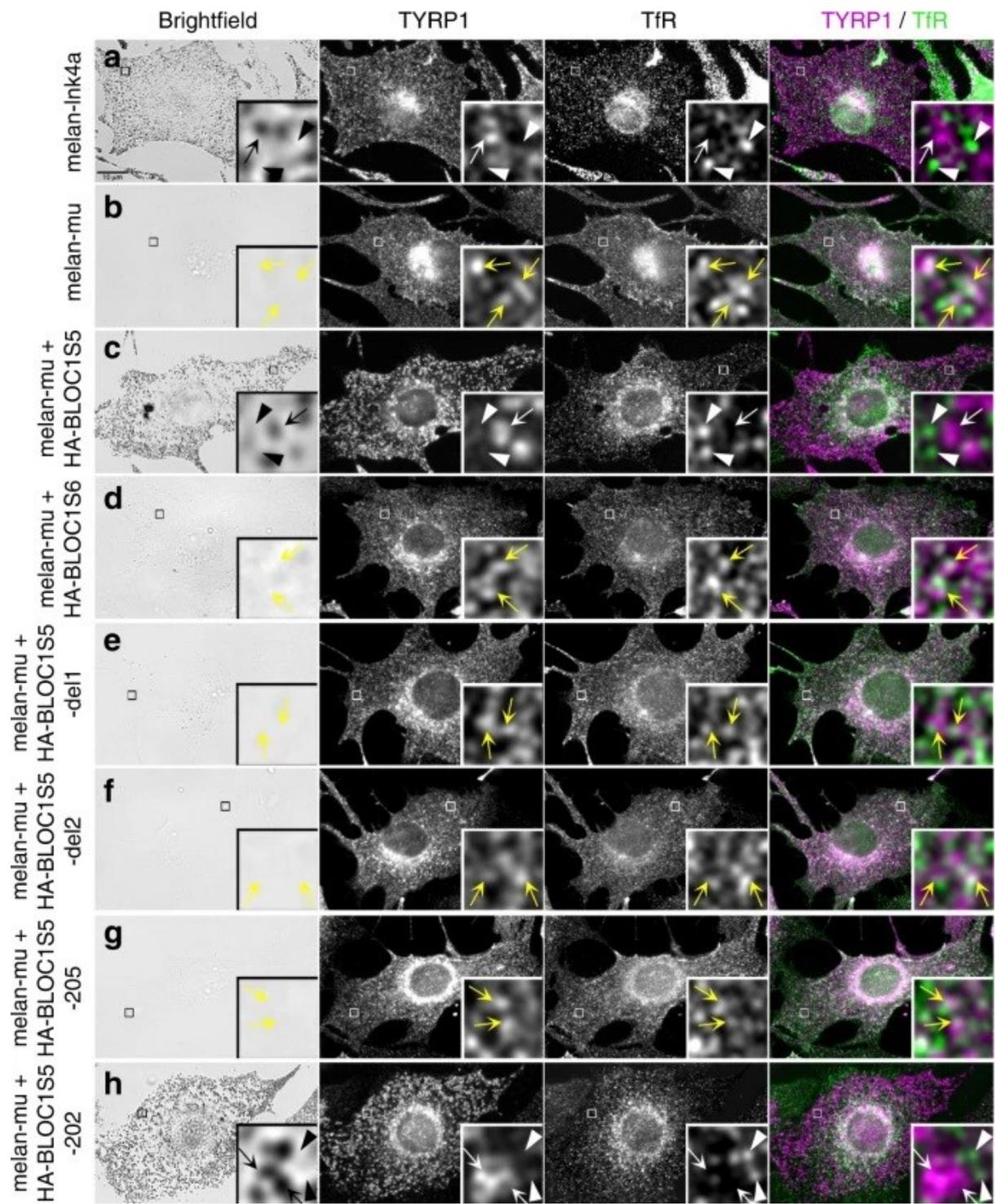


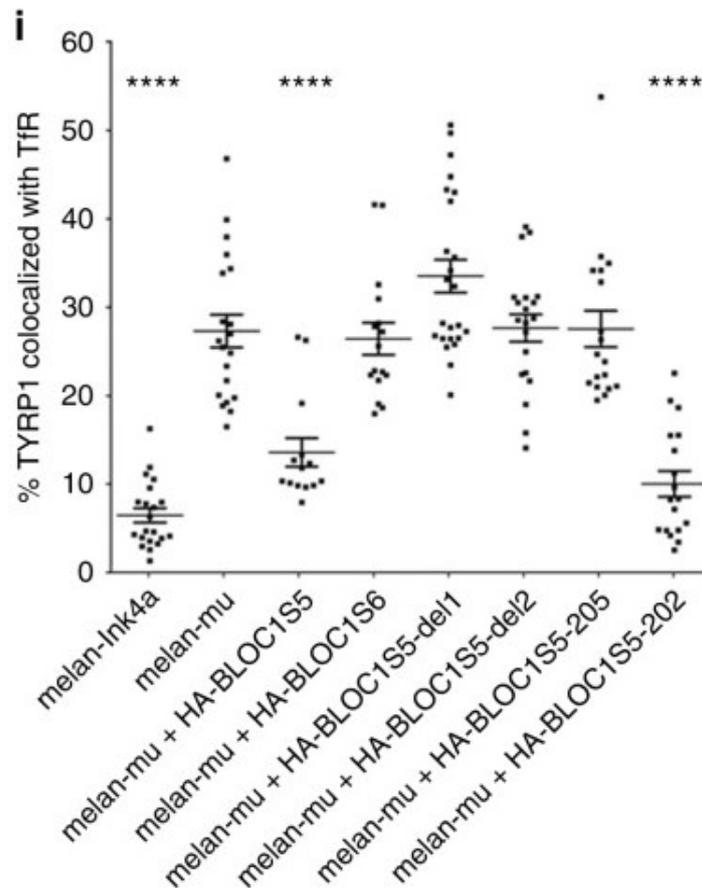
**Fig. 4: Patient 1-derived *BLOC1S5* transgenes do not restore pigmentation to mouse *Bloc1s5<sup>mu/mu</sup>* melanocytes.** (a–h) Melanin content of fixed mouse melanocyte cell lines melan-Ink4a (wild-type), melan-mu (from *Bloc1s5<sup>mu/mu</sup>* mice) or melan-mu stably expressing the indicated HA.11-tagged Muted (*BLOC1S5*) or Pallidin (*BLOC1S6*) transgenes was assessed by bright field microscopy. Unpigmented cells are outlined in white. Scale: 10  $\mu$ m. (i) Melanin content in lysates from the indicated cell lines was assayed by spectrophotometry. Plat-E is a nonpigmented cell line used as a negative control. Data are normalized to values from melan-mu and represent mean  $\pm$  SEM from at least three experiments. Statistical analysis was performed using the Kruskal–Wallis test by ranks. \* $P < 0.05$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ . (j) Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis to confirm transgene expression. Complementary DNA (cDNA) was amplified from each of the indicated cell lines using primers for the hygromycin resistance gene expressed from the internal ribosome entry site of the pBMN-Hygro-IRES retroviral backbone, and products were fractionated by agarose gel electrophoresis. Shown is a representative of two experiments. Positions of DNA markers (bp) are shown at left. (k) Whole-cell lysates of indicated cell lines fractionated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) were immunoblotted for the HA.11 epitope tag, BLOC-1 subunits Dysbindin and Pallidin, or  $\gamma$ -tubulin as a control. Shown is a representative of three experiments. Relevant bands (right) and positions of molecular weight markers (kDa, left) are indicated. Note that the higher molecular weight band in the Pallidin blot is HA-tagged Pallidin, whereas the lower molecular weight band represents endogenous Pallidin.

Consistent with the BLOC-1 instability observed in patient 1 platelets relative to controls, the levels of endogenous Dysbindin and Pallidin subunits were dramatically reduced in melan-mu cells relative to their levels in lysates of wild-type melan-Ink4a melanocytes (Fig. 5k, lanes 1 and 2). Expression of either HA-tagged wild type<sup>24</sup> or HA-tagged full-length isoform HA-BLOC1S5–202 isolated from a control donor rescued Dysbindin and Pallidin expression to levels similar to those in melan-Ink4a cells (Fig. 4k, lanes 1, 3, and 8), indicating BLOC-1

stabilization. In contrast, neither HA-tagged Pallidin nor the HA-tagged truncated patient or control isoforms rescued Dysbindin and Pallidin expression (Fig. 4k, lanes 4–7). Moreover, the HA-tagged truncated isoforms of *BLOC1S5* were not detected by immunoblotting, despite expression of the hygromycin resistance marker from the same mRNA (Fig. 4j). These data indicate that the patient's truncated *BLOC1S5* isoforms and the alternative truncated transcript from controls are unstable and unable to assemble with other BLOC-1 subunits.

To test whether patient 1–derived *BLOC1S5* isoforms could partially rescue BLOC-1 function in protein transport in melan-mu cells, we used immunofluorescence microscopy and image deconvolution (dIFM) to visualize TYRP1 localization relative to pigment granules visualized by bright field microscopy and to an early endosome marker, Transferrin receptor (TfR). In melan-Ink4a melanocytes, most TYRP1 localized to pigment granules at steady state and only 7% of the total TYRP1-containing structures (by area) colocalized with TfR (Fig. 5a, i). In contrast, in melan-mu cells, 27% of TYRP1 colocalized with TfR (Fig. 5b, i). Stable expression of full-length *BLOC1S5* mRNA (HA-BLOC1S5 or HA-BLOC1S5–202) rescued TYRP1 localization, significantly decreasing TYRP1 localization to TfR-containing compartments to 14% or 10%, respectively (Fig. 5c, h, i). In contrast, stable expression of BLOC1S6 or of truncated isoforms BLOC1S5-del1, HA-BLOC1S5-del2, or HA-BLOC1S5–205 did not significantly decrease the percentage of TYRP1 that colocalized with TfR (Fig. 5d–g, i). These data indicate that the patient-derived isoforms (HA-BLOC1S5-del1 and HA-BLOC1S5-del2) and the normal truncated form (HA-BLOC1S5–205) of *BLOC1S5* are not functional for melanosome cargo trafficking.





**Fig. 5: Patient 1–derived *BLOC1S5* transgenes do not restore *BLOC-1*-dependent cargo transport in mouse *Bloc1s5<sup>mu/mu</sup>* melanocytes.** (a–h) Mouse melanocyte cell lines melan-Ink4a, melan-mu, or melan-mu stably expressing the indicated HA.11-tagged Muted or Pallidin transgenes were fixed, immunolabeled for TYRP1 (magenta) and transferrin receptor (TfR, green), and analyzed by immunofluorescence microscopy and image deconvolution (dIFM) and by bright field microscopy to detect melanin. Scale: 10  $\mu$ m. Insets of boxed regions are magnified ten times. TYRP1 localized on TfR-positive compartments (yellow arrowheads) or TYRP1 (white arrow) and TfR (white arrowhead) localized on discrete compartments are indicated. (i) Percent area of overlap between TYRP1 and TfR in melanocyte cell lines. Data are shown as dot plots with mean  $\pm$  SEM from at least 14 cells representing three independent experiments. Statistical analysis was performed using a one-way analysis of variance (ANOVA). \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

Similar investigations were not conducted on the patient 2–derived allele, because this patient was identified at a later stage, and the nature of the reading frameshift 1-bp deletion suggested it was very likely pathogenic. It was therefore expected that this allele would display the same behavior as the exon 3–4 deletion in the melan-mu cells complementation assays.

## DISCUSSION

We identified two patients with variants of the *BLOC1S5* gene (NM\_201280.2). Patient 1 (20 years old) was initially diagnosed only with oculocutaneous albinism, but secondarily reported mild bleeding diathesis characterized by easy bruising and infrequent episodes of epistaxis and gingival bleeding. Patient 2 (39 years old) reported menorrhagia and excessive blood loss after

deliveries and surgery. Further analyses documented in both patients a lack of detectable platelet dense granules, concomitant with mildly impaired activation-induced ATP release and platelet aggregation in vitro. These features are consistent with a diagnosis of HPS<sup>20</sup> (see [Table S3](#) for a comparison of the main clinical features observed in different HPS forms).

BLOC1S5 is a subunit of BLOC-1, and pathogenic variants in the genes encoding three other BLOC-1 subunits cause HPS types 7–9. BLOC-1 was severely destabilized in lysates from patient 1–derived platelets, as demonstrated by the absence of the Dysbindin and Pallidin subunits by immunoblotting. Moreover, the patient’s *BLOC1S5* allele was unable to restore BLOC-1 stability or function in melanogenesis and protein sorting in murine melanocytes lacking the orthologous BLOC1S5/Muted protein. These data strongly suggest this represents a loss of function variant.

NGS analysis of patients 1 and 2 DNA did not detect pathogenic variants in any of the 19 known albinism genes in either homozygous or heterozygous state. Since it is unlikely that our analyses would have missed two variants in the same gene, we reject the possibility that one of these genes is involved in the disease in these patients.

Laboratory analyses of platelet aggregation and delta storage disease were not as severe as in the more common HPS-1 patients. This is typical of HPS-7, -8, and -9 patients with BLOC-1 subunit variants,<sup>18,20,27</sup> in contrast to the more dramatic platelet disorder observed in corresponding mouse HPS models.<sup>28,29,30</sup> However, it should be noted that these are rare forms of HPS, since only a few patients have been reported so far (8 for HPS-7, 9 for HPS-8, 4 for HPS-9).<sup>20</sup> Bleeding diathesis and mild albinism were described in all of these patients. Pulmonary disease, associated with all BLOC-3- and AP-3-deficient patients, and granulomatous colitis, associated with some BLOC-3 and BLOC-2-deficient patients, were reported in only one patient with HPS-7, whereas one patient with HPS-9 had recurrent cutaneous infections and a prolonged episode of fever with seizures (similar to HPS-2 and -10 patients with AP-3 deficiency). Our patients’ symptoms are thus consistent with the majority of BLOC-1-deficient patients with a mild form of HPS ([Table S3](#)). Of note, HPS patients may show either an absence or a reduced number of delta granules and mild platelet storage pool disease. Screening of all HPS genes in individuals with a bleeding diathesis with or without recognized oculocutaneous albinism may therefore yield additional HPS patients.

It was expected that alterations in genes encoding other BLOC-1 subunits might cause additional forms of HPS. Indeed, mouse mutants in genes encoding five BLOC-1 subunits are associated with hypopigmentation phenotypes and features of syndromic forms of albinism. These are *cappuccino* (*Bloc1s4*), *reduced pigmentation* (*Bloc1s3*), *muted* (*Bloc1s5*), *pallid* (*Bloc1s6*), and *sandy* (*Dtnbp1/Bloc1s8*). Note that the three additional BLOC-1 subunits,

BLOC1S1, BLOC1S2, and BLOC1S7, are shared with a separate protein complex called BORC that is essential in mice and possibly also in humans.<sup>31,32</sup> Of the BLOC-1-specific subunits, variants in the human orthologs of *pallid/Bloc1s6*, *reduced pigmentation/Bloc1s3*, and *sandy/Bloc1s8* underlie HPS-7, -8, and -9, respectively. We now demonstrate that pathogenic variants in the human ortholog of *muted/Bloc1s5* underlie a novel form of HPS. Based on our observations in two patients, we recommend that *BLOC1S5* should now be included among the panel of genes tested for variants as a molecular diagnosis for all patients with albinism or a HPS-like phenotype. We also predict that variants in *BLOC1S4* may underlie another form of HPS. Because of the additional complications of HPS relative to nonsyndromic albinism and the difficulty in their diagnosis, all HPS genes should be included in screens of albinism patients.

Our data demonstrate the pathogenicity of *BLOC1S5* homozygous variants identified in two patients with syndromic oculocutaneous albinism corresponding to HPS. We propose that this form of HPS should be considered as HPS-11.

## REFERENCES

1. Seward SL Jr, Gahl WA. Hermansky-Pudlak syndrome: health care throughout life. *Pediatrics*. 2013;132:153-160.
2. Delevoeye C, Marks MS, Raposo G. Lysosome-related organelles as functional adaptations of the endolysosomal system. *Curr Opin Cell Biol*. 2019;59:147-158.
3. Bowman SL, Bi-Karchin J, Le L, Marks MS. The road to LROs: insights into lysosome-related organelles from Hermansky-Pudlak syndrome and other rare diseases. *Traffic*. 2019;20:404-435.
4. Nazarian R, Huizing M, Helip-Wooley A, Starcevic M, Gahl WA, Dell'Angelica EC. An immunoblotting assay to facilitate the molecular diagnosis of Hermansky-Pudlak syndrome. *Mol Genet Metab*. 2008;93:134-144.
5. Montoliu L, Marks MS. A new type of syndromic albinism associated with mutations in AP3D1. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2017;30:5-7.
6. Montoliu L, Grønskov K, Wei AH, et al. Increasing the complexity: new genes and new types of albinism. *Pigment Cell Melan. Res*. 2014;27:11-18.
7. Arveiler B, Lasseaux E, Morice-Picard F. Clinical and genetic aspects of albinism. *Presse Med*. 2017;46:648-654.
8. Lasseaux E, Plaisant C, Michaud V, et al. Molecular characterization of a series of 990 index patients with albinism. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2018;31:466-474.
9. Arveiler B, Michaud V, Lasseaux E. Albinism: an underdiagnosed condition. *J Dermatol Invest*. 2019 Dec 26. doi: 10.1016/j.jid.2019.12.010.
10. Morice-Picard F, Lasseaux E, Cailley D, et al. High-resolution array-CGH in patients with oculocutaneous albinism identifies new deletions of the TYR, OCA2, and SLC45A2 genes and a complex rearrangement of the OCA2 gene. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2014;27:59-71.
11. Setty SRG, Tenza D, Truschel ST, et al. BLOC-1 is required for cargo-specific sorting from vacuolar early endosomes toward lysosome-related organelles. *Mol Biol Cell*. 2007;18:768-780.
12. Sviderskaya EV, Hill SP, Evans-Whipp TJ, et al. p16(Ink4a) in melanocyte senescence and differentiation. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94:446-454.
13. Morita S, Kojima T, Kitamura T. Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther*. 2000;7:1063-1066.
14. Meng R, Wang Y, Yao Y, et al. SLC35D3 delivery from megakaryocyte early endosomes is required for platelet dense granule biogenesis and is differentially defective in Hermansky-Pudlak syndrome models. *Blood*. 2012;120:404-414.
15. Dennis MK, Delevoeye C, Acosta-Ruiz A, et al. BLOC-1 and BLOC-3 regulate VAMP7 cycling to and from melanosomes via distinct tubular transport carriers. *J Cell Biol*. 2016;214:293-308.
16. Delevoeye C, Hurbain I, Tenza D, et al. AP-1 and KIF13A coordinate endosomal sorting and positioning during melanosome biogenesis. *J Cell Biol*. 2009;187:247-264.
17. Li W, Zhang Q, Oiso N, et al. Hermansky-Pudlak syndrome type 7 (HPS-7) results from mutant dysbindin, a member of the biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 (BLOC-1). *Nature Genet*. 2003;35:84-89.

18. Morgan NV, Pasha S, Johnson CA, et al. A germline mutation in BLOC1S3/reduced pigmentation causes a novel variant of Hermansky-Pudlak Syndrome (HPS8). *Am J Hum Genet.* 2006;78:160-166.
19. Badolato R, Prandini A, Caracciolo S, et al. Exome sequencing reveals a pallidin mutation in a Hermansky-Pudlak-like primary immunodeficiency syndrome. *Blood.* 2012;119:3185-3187.
20. Huizing M, Malicdan MCV, Wang JA, et al. Hermansky-Pudlak Syndrome: Mutation update. *Hum Mutat.* 2020;41:543-580.
21. Zhang Q, Li W, Novak EK, et al. The gene for the muted (mu) mouse, a model for Hermansky-Pudlak syndrome, defines a novel protein which regulates vesicle trafficking. *Hum Mol Genet.* 2002;11:697-706.
22. Richards, S., Aziz, N., Bale, S., et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine* 2015;17, 405-424.
23. Dawood BB, Lowe GC, Lordkipanidze M, et al. Evaluation of participants with suspected heritable platelet function disorders including recommendation and validation of a streamlined agonist panel. *Blood.* 2012;120: 5041-5049.
24. Falcon-Perez JM, Starcevic M, Gautam R, Dell'Angelica EC. BLOC-1, a novel complex containing the pallidin and muted proteins involved in the biogenesis of melanosomes and platelet dense granules. *J Biol Chem.* 2002;277:28191-28199.
25. Moriyama K, Bonifacino JS. Pallidin is a component of a multi-protein complex involved in the biogenesis of lysosome-related organelles. *Traffic.* 2002;3:666-677.
26. Starcevic M, Dell'Angelica EC. Identification of snapin and three novel proteins (BLOS1, BLOS2 and BLOS3/reduced pigmentation) as subunits of biogenesis of lysosome-related organelles complex-1 (BLOC-1). *J Biol Chem.* 2004;279:28393-28401.
27. Bryan MM, Tolman NJ, Simon KL, et al. Clinical and molecular phenotyping of a child with Hermansky-Pudlak syndrome-7, an uncommon genetic type of HPS. *Mol Genet Metab.* 2017;120:378-383.
28. Meng R, Wu J, Harper DC, et al. Defective release of a granule and lysosome contents from platelets in mouse Hermansky-Pudlak syndrome models. *Blood.* 2015;125:1623-1632.
29. Novak EK, Hui SW, Swank RT. Platelet storage pool deficiency in mouse pigment mutations associated with seven distinct genetic loci. *Blood.* 1984;63:536-544.
30. Reddington M, Novak EK, Hurley E, Medda C, McGarry MP, Swank RT. Immature dense granules in platelets from mice with platelet storage pool disease. *Blood.* 1987;69:1300-1306.
31. Pu J, Schindler C, Jia R, Jarnik M, Backlund P, Bonifacino JS. BORC, a multisubunit complex that regulates lysosome positioning. *Dev Cell.* 2015;33:176-188.
32. Snouwaert JN, Church RJ, Jania L, et al. A mutation in the Borcs7 subunit of the lysosome regulatory BORC complex results in motor deficits and dystrophic axonopathy in mice. *Cell Rep.* 2018;24:1254-1265.

## Acknowledgements

The authors are grateful to the patients, and to the parents and siblings of patient 1 for participating in this study, and to the French Albinism Association Genespoir, French Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-LBX-0038, ANR-10-IDEX-0001-02 PSL, PICT-IBiSA ANR10-INBS-04), and US National Institutes of Health grant R01 EY015625 from the National Eye Institute, for financial support.

## SUPPLEMENTARY INFORMATION

### SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

#### **Sequencing of the candidate genes, bioinformatics analysis, and characterization of the *BLOC1S5* gene deletion.**

DNA samples were quantified using the Qubit™ dsDNA HS Assay Kit on the Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies) and diluted to a final concentration of 10 ng/μL. Amplicons (libraries) were generated with the Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 and then quality-checked and quantified on the 2200 TapeStation (Agilent, U.S.A.). Emulsion PCR and enrichment were performed on the Ion CHEF™ System (Life Technologies) using the Ion 520/530 Kit Chef. Two Ion 530 chips (Life Technologies), each containing 24 patients, were sequenced per run. Pathogenicity of single nucleotide variants was evaluated using bioinformatics tools Cartagenia BenchLab NGS (Agilent Technologies) and Alamut Visual (Interactive BioSoftware, Rouen, France) based on criteria including allele frequency (gnomAD <http://gnomad.broadinstitute.org>, ESP [evs.gs.washington.edu/EVS](http://evs.gs.washington.edu/EVS), dbSNP [www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP)), description in database (HGMD Professional [www.biobase-international.com/product/hgmd](http://www.biobase-international.com/product/hgmd)), conservation, pathogenicity prediction algorithms (Polyphen [genetics.bwh.harvard.edu/pph2](http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2), SIFT [sift.bii.a-star.edu.sg](http://sift.bii.a-star.edu.sg), Mutation Taster [www.mutationtaster.org](http://www.mutationtaster.org), GVDG [agvgd.iarc.fr](http://agvgd.iarc.fr)) and effect on splicing (SSF [www.genet.sickkids.on.ca/~ali/splicesitefinder.html](http://www.genet.sickkids.on.ca/~ali/splicesitefinder.html), HSF [www.umd.be/HSF3](http://www.umd.be/HSF3), MaxEntScan [genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan\\_scoreseq.htm](http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.htm), NNSplice [www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html), GeneSplicer [ccb.jhu.edu/software/genesplicer](http://ccb.jhu.edu/software/genesplicer)).

Intragenic rearrangements were visualized in NGS data using an in-house plug-in based on NGS read depth. The strategy used a mathematical model to highlight regions with abnormal depth compared to the overall mean depth of all other patients on the same NGS run (Zhao M, Wang Q, Wang Q, Jia P, Zhao Z. Computational tools for copy number variation (CNV)

detection using next-generation sequencing data: features and perspectives. BMC Bioinformatics. 2013;14 Suppl 11:S1.).

Amplification of *BLOC1S5* exons 2 to 5 was performed by polymerase chain reaction (PCR) using the following primers (F, forward; R, reverse). Exon 2: F-TGCAAGGACTCTGGGATGAT, R-TCCCAGCTTTTCCCTCCTTT; Exon 3: F-CTGGATGTGATGGCGGGAG, R-GGCAACACACATTAATCACTAGA; Exon 4: F-TTTTCCCCTTCTGGCCATCC, R-GACCACACCTCCTCAACACA; Exon 5: F-GTGCCCAGCCCACCTTTTAAA, R-GCTAAACGGTCTGGTGGGAA. PCR was performed with 2X Multiplex Mix (Qiagen). The PCR program was as follows: 1 cycle with 7 min at 95°C; 40 cycles with 30 sec at 95°C, 30 sec at 60°C and 45 sec at 72°C; and 1 cycle with 5 min at 72°C.

Amplification of the intron 2-4 deletion breakpoint was performed by polymerase chain reaction (PCR) in the Qiagen 2X Multiplex Mix (Qiagen) with primers located in introns 2 and 4 (F-AATATGTGGCAATCTGGACCA, R-AAAGTGCCAACAGTGCTGAG). The PCR program was as follows: 1 cycle with 7 min at 95°C; 40 cycles with 30 sec at 95°C, 30 sec at 60°C, and 60 sec at 72°C; and 1 cycle with 5 min at 72°C. Sanger sequencing of the PCR product was performed using the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®, ThermoFischer Scientific) on a 3500xL Dx Sequencer (Life Technologies, ThermoFischer Scientific).

### **Cloning of control and mutant *BLOC1S5* cDNA and generation of recombinant retroviral expression constructs.**

Total RNA was extracted from the patient and from control blood. Briefly, blood was sampled in a PAXgene™ Blood RNA Tube for subsequent total RNA extraction using the PAXgene™ Blood RNA kit (Pre-analytiX, Qiagen/BD, Hombrechtikon Switzerland). RNA quality was assessed by agarose gel electrophoresis and Midori Green Advanced DNA Stain (Nippon Genetics EuropeGmbH) staining, and quantity was assessed using a Nanodrop (NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Labtech France). Five hundred nanograms were then reverse-transcribed using SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Thermofisher Scientific) following the manufacturer's instructions.

Based on the reference sequence NM\_201280.3 (<http://www.ensembl.org>), two primers were designed to amplify the full coding sequence (F-AACTGGTCGGGATGAGTGG, R-GGAAAAATGTGGCACCCCTTC). The expected size of the wild-type amplicon is 763 bp and that of the patient sample with the deletion is 575 bp. RT-PCR amplification was performed using the Q5® High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs) following the

manufacturer's instructions with 10 sec of annealing at 60°C and 1 min of elongation. RT-PCR fragments were purified using the Monarch® Genomic DNA Purification Kit (New England Biolabs) and cloned in the pMiniT vector using the NEB® PCR Cloning Kit (New England Biolabs). Clones were sequenced and those of interest were subcloned in the pCS2+ plasmid using the In-Fusion® HD Cloning Plus CE kit following the manufacturer's instructions (Takara). A specific primer pair was designed for this application

(F-CCATCGATTCTGAATCAACTGGTTCGGGATGAGTG, R-  
GAGAGGCCTTGAATTCGGAAAAATGTGGCACCCCTT).

Retroviral constructs encoding HA.11-epitope tagged forms of human Pallidin (HA-Pa) and human BLOC1S5 (HA-Mu) (kindly provided by Juan S. Bonifacino, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) in the pBMN-IRES-Hygro vector were previously described<sup>11</sup>. To generate retroviral constructs encoding HA-epitope-tagged forms of BLOC1S5-202 (HA-BLOC1S5-202), BLOC1S5-205 (HA-BLOC1S5-205), BLOC1S5-Del1 (HA-BLOC1S5-Del1), and BLOC1S5-Del2 (HA-BLOC1S5-Del2) in pBMN-IRES-Hygro, inserts were amplified from pCS2+ backbones by PCR with GoTaq polymerase (Promega) using the following primers to add a 5' XhoI restriction site, a Kozak consensus start site and N-terminal HA.11 epitope tag, and a 3' NotI restriction site: F-CCGCTCGAGCCATGGGCTACCCTTACGACGTTCCAGATTACGCTGAATTCATGAGTGGCGGAGGGACAGA, R-TTTCCTTTTGCGGCCGCTTTTTTTCCTTTTAAAAGGTTGAAAATTCGCTAGGTCC. Products of XhoI/NotI digestion were subcloned into similarly digested pBMN-IRES-Hygro. Sequences of all constructs were verified by Sanger sequencing.

### **Mouse melanocyte cell culture and transduction.**

The immortalized melanocyte cell line melan-mu3<sup>11</sup> (referred to as melan-mu) derived from B6.CHMU/Le-*Bloc1s5*<sup>mu/mu</sup>*Ink4a-Arf*<sup>f/-</sup> (muted) mice, and "wild-type" melan-Ink4a cells derived from C57BL/6J-*Ink4a-Arf*<sup>f/-</sup> mice were maintained as described<sup>12</sup> in RPMI 1640 medium (Corning) supplemented with 10% FBS (Atlanta Biologicals) and 200 nM tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA; Sigma-Aldrich). Retrovirus production from transiently transfected Plat-E cells<sup>13</sup> and retroviral transduction of melan-mu cells were carried out as described previously<sup>11,14</sup>. Briefly, Plat-E cells were transfected with retroviral DNA constructs using Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher), and the medium was replaced the next day. Retrovirus-containing supernatants were collected 24 h later, filtered, and added to melan-mu cells in a 1:1 ratio with fresh medium and 200 nM TPA. The medium was replaced the next day, and pools of stable transductants were selected 24 h later by adding 300 µg/ml hygromycin

B to the medium. Stable transductants were occasionally treated with 200 µg/ml hygromycin B for 2–3 d to maintain selective pressure for the transgene.

#### **Reverse-transcriptase PCR analysis in the melan-mu3 cell line.**

RNA was purified from melanocytes using the RNeasy Plus Mini kit (Qiagen) and treated with DNase. mRNA was reverse transcribed using the Applied Biosystems High-Capacity RNA-to-cDNA kit (ThermoFisher Scientific, 4387406), and PCR amplification was performed with 250 µg cDNA, 500 nM forward and reverse primers, and GoTaq Green Master Mix (Promega) for 35 cycles. Primers to amplify the hygromycin resistance gene were: F-TGGCAAACCTGTGATGGACGA, R- GGCGACCTCGTATTGGGAAT. PCR products were fractionated on a 2% agarose gel and visualized by staining with SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen, S33102).

#### **Immunoblotting.**

For analyses of patient platelets, patient's blood was drawn into acid-citrate-dextrose formula A (ACDA) and platelet-rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation at 150 x g for 10 min. PRP was recovered by centrifugation at 1200 x g for 10 min, and platelets were washed three times before lysis at  $1 \times 10^6$  platelets/ mL in 10 mM Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane)–HCl (pH 7.0), 3 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 5 mM N-ethylmaleimide, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS). Protein content was quantified by the *DC*<sup>TM</sup> (detergent compatible) protein assay from BioRad (Hercules, California, United-States), and lysate containing 20 µg proteins was fractionated by SDS-PAGE under non-reducing conditions and transferred electrophoretically onto nitrocellulose membranes using Trans-Blot Transfer Medium (Amersham Life Science, Bucks, United Kingdom). Membranes were incubated for 1 h in TB-T [5% fat-free milk, 20 mM Tris-NaCl pH 8.2, 0.05% (vol/vol) Tween 20] to block non-specific binding, and then membrane strips were incubated with anti-GPIIb (CD41) mouse MoAb (R&D System, Minneapolis, Minnesota, United States), anti-dysbindin (ABCAM, ab118795; 1:1000) or anti-pallidin (Proteintech, 10891-2-AP; 1:1000) in TB-T at room temperature. After washing, the membrane was further incubated with horseradish peroxidase–conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch; diluted 1:10,000 in TB-T) and bound antibody was detected by chemiluminescence (Amersham Life Science, Little Chalfont, United Kingdom).

For analyses of melan-mu3 melanocytes, cells were collected in 5 mM EDTA/PBS, pelleted at 153 x g for 5 min at 4°C, lysed in 6X SDS sample buffer (0.4 M Tris, pH 6.8, 12% (w/v) SDS,

34% glycerol), and sonicated using a probe sonicator with 5 x 5-sec pulses. Protein concentration was determined using the Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher). Samples diluted 1:1 with 6X SDS sample buffer containing 12X bromophenol blue and 12X  $\beta$ -mercaptoethanol (0.4 M Tris, pH 6.8, 12% (w/v) SDS, 34% glycerol, 0.045% (w/v) bromophenol blue, 24%  $\beta$ -mercaptoethanol) were heated at 95°C for 5 min, resolved by centrifugation at 10,621 x g for 10 min, fractionated by SDS-PAGE on Tris-glycine gels containing 15% acrylamide, and transferred electrophoretically to PVDF membranes. Membranes were blocked for 1 hour in blocking buffer [Tris Buffered Saline (TBS), pH 7.4 with 5% (w/v) nonfat dry milk] and incubated overnight with primary antibodies diluted in TBS. Primary antibodies were: mouse monoclonal anti-HA.11 epitope (clone 16B12, Biolegend); mouse monoclonal anti- $\gamma$ -tubulin (GTU88; Sigma); and mouse monoclonal anti-Pallidin and rabbit anti-Dysbindin (gifts from Esteban Dell'Angelica; Univ. of California, Los Angeles, CA, USA). After washing with TBST (TBS, pH 7.4, 0.2% Tween-20) membranes were probed with species-specific secondary antibodies from donkey conjugated to IRDye-790CW or IRDye-680LT (Jackson Immunoresearch) diluted in blocking buffer for 1 hour, washed with TBST, and analyzed using an Odyssey infrared imaging system (LI-COR Biotechnology).

### **Immunofluorescence microscopy**

Immunofluorescence microscopy (IFM) analyses of fixed cells were done essentially as described<sup>15</sup>. Briefly, cells were plated on Matrigel (BD)-coated coverslips, fixed with 4% formaldehyde (VWR) in PBS, and labeled with primary and secondary antibodies diluted in PBS/ 0.2% saponin/ 0.1% BSA. Antibodies used were: mouse monoclonal anti-TYRP1 (TA99/Mel-5, ATCC); rat monoclonal anti-HA epitope (3F10, Sigma); and rat monoclonal anti-mouse TfR (C2F2, BD Biosciences). Species-specific secondary antibodies from donkey conjugated to Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 594 were from Jackson Immunoresearch (West Grove, PA).mounted onto slides using Prolong Gold (Thermo P36935), and analyzed on a Leica DMI-6000 microscope equipped with a 63 $\times$  objective lens (Leica; 1.4 NA), a Hamamatsu Photonics ORCA-Flash4.0 sCMOS C11440-22CU digital camera, and Leica Application Suite X (LAS X) software. Images in sequential z planes (0.2 $\mu$ m step size) were deconvolved with Microvolution software and further analyzed with ImageJ (<http://fiji.sc/Fiji>; National Institutes of Health). Quantification of the area of overlap between markers in double labeling experiments was performed in ImageJ as follows. Deconvolved, 8-bit images of cells labeled for each marker in >10 cell profiles for each comparison were thresholded using the “Auto Local Threshold” tool and made binary. A region of interest excluding the perinuclear area was chosen, and objects between 0.1 and 10  $\mu$ m were included in the analysis. The total labeled area

in each channel was calculated for included objects using the “Analyze Particles” tool, an overlap image was calculated using the “Image Calculator/Multiply” tool, and the total area of overlap was calculated using the “Analyze Particles” tool. The percentage of overlap was defined as the total area of overlap divided by the total area labeled in the reference channel.

#### **Quantitative melanin content assay.**

The assay was done essentially as described<sup>16</sup>. Briefly, melanocytes seeded on 6-cm dishes were trypsinized, pelleted, and sonicated in melanin buffer (50 mM Tris, 2 mM EDTA, and 150 mM NaCl, pH 7.4) supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche). Melanin was pelleted for 15 min at 16,000 g (4°C), rinsed in ethanol/diethyl ether (1:1), and dissolved in 2 M NaOH/ 20% DMSO at 60°C. The optical density at 492 nm was measured to estimate melanin content and normalized to protein concentration as determined by BCA protein determination kit (Thermo Fisher).

#### **SUPPLEMENTARY DATA.**

##### **Characterization of the *BLOC1S5* exon 3-4 deletion in patient 1.**

Patient 1 harbored a *BLOC1S5* deletion that was visualized in NGS data using an in-house bioinformatics plugin based on NGS read depth (see Supplementary Materials and Methods). Targeted array-Comparative Genomic Hybridization (array-CGH) allowed us to precisely characterize the deletion Arr[GRCh37] 6p24.3(8023237\_8041535)x0, and to pinpoint the deletion breakpoints to restricted genomic intervals. The proximal and distal breakpoints are located between nucleotides g.8022700 and g.8023237 (537 bp interval) and between g.8041535 and g.8042179 (644 bp interval), respectively (see Figure 1A in the main manuscript and Supplementary Figure 1A). The homozygous deletion encompasses exons 3 and 4 of *BLOC1S5*, as confirmed by the lack of amplification of these exons from genomic DNA, whereas exons 2 and 5 were detected (see Figure 1B in the main manuscript). Sanger sequencing of a junction fragment amplified using primers located in introns 2 and 4 of the gene (Supplementary Figure 1B) showed that the deletion extended over 19063 base pairs and revealed the presence of a segment of 291 nucleotides with global 91% homology in introns 2 and 4, of which 57 contiguous nucleotides are 100%-homologous (dark grey box in Figure 1A of the main manuscript and Supplementary Figure 1B). The deletion breakpoint was located within this 100%-homologous segment, strongly suggesting that the deletion occurred following a non-allelic homologous recombination mechanism<sup>22</sup> [Sasaki M, Lange J, Keeney S. Genome destabilization by homologous recombination in the germline. *Nat Rev Mol Cell*

Biol. 2010;11(3):182-195] between introns 2 and 4 (Supplementary Figure 1C). The deletion is referred to as NC\_000006.11(BLOC1S5\_v002):c.196-678\_384+3483del and g.8023117\_8042179del (Hg19) (ClinVar <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/> submission number SUB6791269).

**Supplementary Table 1: List of human genes associated with albinism**

<b>Gene</b>	<b>Classification</b>	<b>Albinism type</b>
<i>TYR</i>	OCA1	Oculocutaneous albinism Type 1
<i>OCA2</i>	OCA2	Oculocutaneous albinism Type 2
<i>TYRP1</i>	OCA3	Oculocutaneous albinism Type 3
<i>SLC45A2</i>	OCA4	Oculocutaneous albinism Type 4
<i>Unknown*</i>	OCA5	Oculocutaneous albinism Type 5
<i>SLC24A5</i>	OCA6	Oculocutaneous albinism Type 6
<i>LRMDA/C10orf11</i>	OCA7	Oculocutaneous albinism Type 7
<i>GPR143</i>	OA1	Ocular albinism Type 1 (X-linked)
<i>LYST</i>	CHS1	Chediak–Higashi Syndrome Type 1
<i>HPS1</i>	HPS1	Hermansky–Pudlak Syndrome Type 1
<i>AP3B1</i>	HPS2	Hermansky–Pudlak Syndrome Type 2
<i>HPS3</i>	HPS3	Hermansky–Pudlak Syndrome Type 3
<i>HPS4</i>	HPS4	Hermansky–Pudlak Syndrome Type 4
<i>HPS5</i>	HPS5	Hermansky–Pudlak Syndrome Type 5
<i>HPS6</i>	HPS6	Hermansky–Pudlak Syndrome Type 6
<i>DTNBP1</i>	HPS7	Hermansky–Pudlak Syndrome Type 7
<i>BLOC1S3</i>	HPS8	Hermansky–Pudlak Syndrome Type 8
<i>BLOC1S6</i>	HPS9	Hermansky–Pudlak Syndrome Type 9
<i>AP3D1</i>	HPS10	Hermansky–Pudlak Syndrome Type 10
<i>SLC38A8</i>	FHONDA	Foveal Hypoplasia, Optic Nerve Decussation defects and Anterior segment dysgenesis

\* The OCA5 locus was mapped to chromosome 4q24, but the gene has not been identified. Kausar T et al. OCA5, a novel locus for non-syndromic oculocutaneous albinism, maps to chromosome 4q24. Clin Genet. 2013 ;84(1):91-93

**Supplementary Table 2 : Candidate genes tested in this study.**

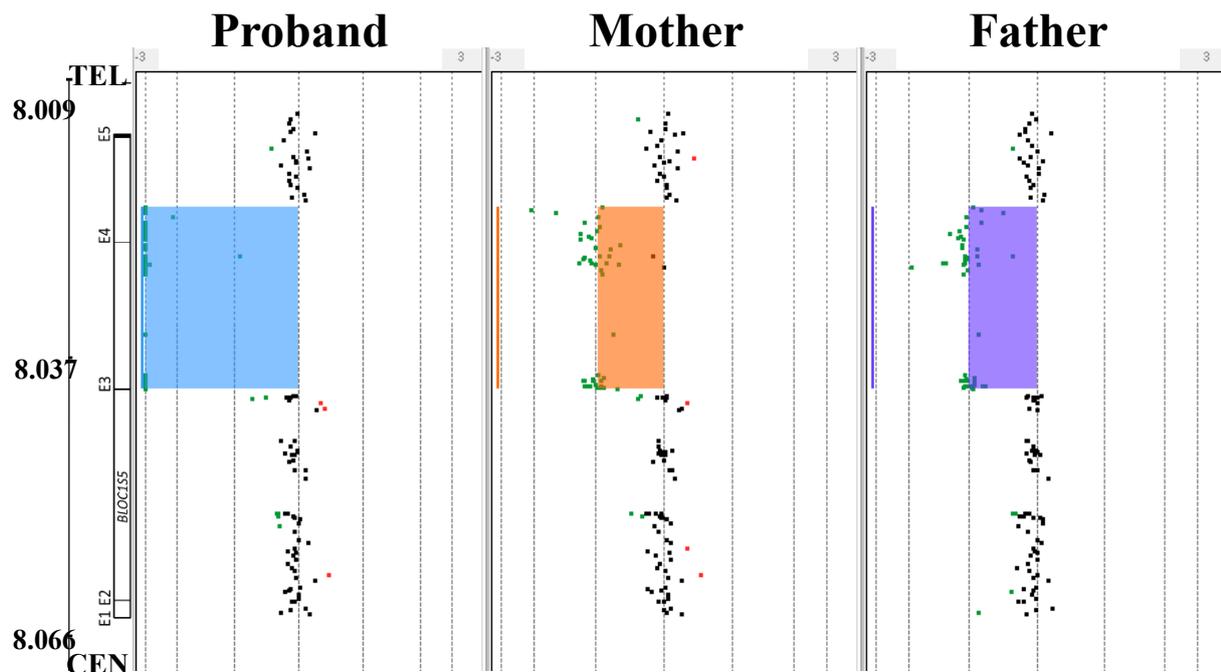
<b>GENE</b>	<b>PROTEIN</b>	<b>MOUSE MUTANT</b>
<i>AP1B1</i>	Adaptor Protein 1 complex subunit beta-1	
<i>AP1G1</i>	Adaptor Protein 1 complex subunit gamma-1	
<i>AP1G2</i>	Adaptor Protein 1 complex subunit gamma-2	
<i>AP1M1</i>	Adaptor Protein 1 complex subunit mu-1	
<i>AP1M2</i>	Adaptor Protein 1 complex subunit mu-2	
<i>AP1S2</i>	Adaptor Protein 1 complex subunit sigma-2	
<i>AP1S3</i>	Adaptor Protein 1 complex subunit sigma-3	
<i>KIF13A</i>	Kinesin Family Member 13A	
<i>AP3B2</i>	Adaptor Protein 3 complex subunit beta-2	
<i>AP3M1</i>	Adaptor Protein 3 complex subunit mu-1	
<i>AP3M2</i>	Adaptor Protein 3 complex subunit mu-2	
<i>AP3S1</i>	Adaptor Protein 3 complex subunit sigma-1	
<i>AP3S2</i>	Adaptor Protein 3 complex subunit sigma-2	
<i>BLOC1S1</i>	Biogenesis of lysosome-related organelles complex subunit 1	
<i>BLOC1S4</i>	Biogenesis of lysosome-related organelles complex subunit 4	cappuccino
<i>BLOC1S5</i>	Biogenesis of lysosome-related organelles complex subunit 5	muted
<i>DOCK7</i>	Dedicator of cytokinesis 7	misty
<i>RAB38</i>	Ras-related protein RAB38	chocolate
<i>RAB27A</i>	Ras-related protein RAB27A	ashen
<i>SLC7A11</i>	Solute carrier family member 11	subtle gray
<i>VPS33A</i>	Vacuolar protein sorting-associated protein 33A	buff

**Supplementary Table 3: Clinical Phenotypes of the different forms of Hermansky-Pudlak Syndrome**

Protein complex	HPS type	Gene (Subunit)	Cutaneous albinism	Ocular albinism	Bleeding diathesis	Gastrointestinal function	Pulmonary function	Immune system	Neurologic function
BLOC-1	HPS-7	<i>DTNBP1 (BLOC1S8)</i>	yes	yes	mild	granulomatous colitis in some patients	normal	normal	normal
BLOC-1	HPS-8	<i>BLOC1S3</i>	moderate hypopigmentation	yes	mild, excessive bleeding in some patients	normal	normal	normal	normal
BLOC-1	HPS-9	<i>BLOC1S6</i>	moderate hypopigmentation	yes	mild	normal	normal	leukopenia in two patients	normal
<b>BLOC-1</b>	<b>proposed name HPS-11</b>	<b><i>BLOC1S5</i></b>	<b>mild hypopigmentation</b>	<b>yes, mild loss of visual acuity</b>	<b>mild, excessive bleeding in one patient</b>	<b>abdominal pain in one patient</b>	<b>dyspnea in one patient</b>	<b>recurrent infections in one patient</b>	<b>normal</b>
BLOC-2	HPS-3	<i>HPS3 (BLOC2S1)</i>	mild hypopigmentation	mild loss of visual acuity	mild	granulomatous colitis in some patients	normal	normal	normal
BLOC-2	HPS-5	<i>HPS5 (BLOC2S2)</i>	mild hypopigmentation	mild loss of visual acuity	mild	granulomatous colitis in some patients	normal	normal	normal
BLOC-2	HPS-6	<i>HPS6 (BLOC2S3)</i>	mild hypopigmentation	mild loss of visual acuity	mild	granulomatous colitis in some patients	normal	normal	normal
BLOC-3	HPS-1	<i>HPS1 (BLOC3S1)</i>	severe	severe	severe	granulomatous colitis	pulmonary fibrosis	normal	normal
BLOC-3	HPS-4	<i>HPS4 (BLOC3S2)</i>	severe	severe	severe	granulomatous colitis in some patients	pulmonary fibrosis	normal	normal
AP-3	HPS-2	<i>AP3B1</i>	yes	yes	yes	normal	interstitial lung disease, pulmonary fibrosis in some patients	Immuno-deficiency, neutropenia	normal
AP-3	HPS-10	<i>AP3D1</i>	yes	yes	no	normal	interstitial lung disease	Immuno-deficiency, neutropenia	Neuro-developmental delay, generalized seizures, impaired hearing

## SUPPLEMENTARY FIGURES

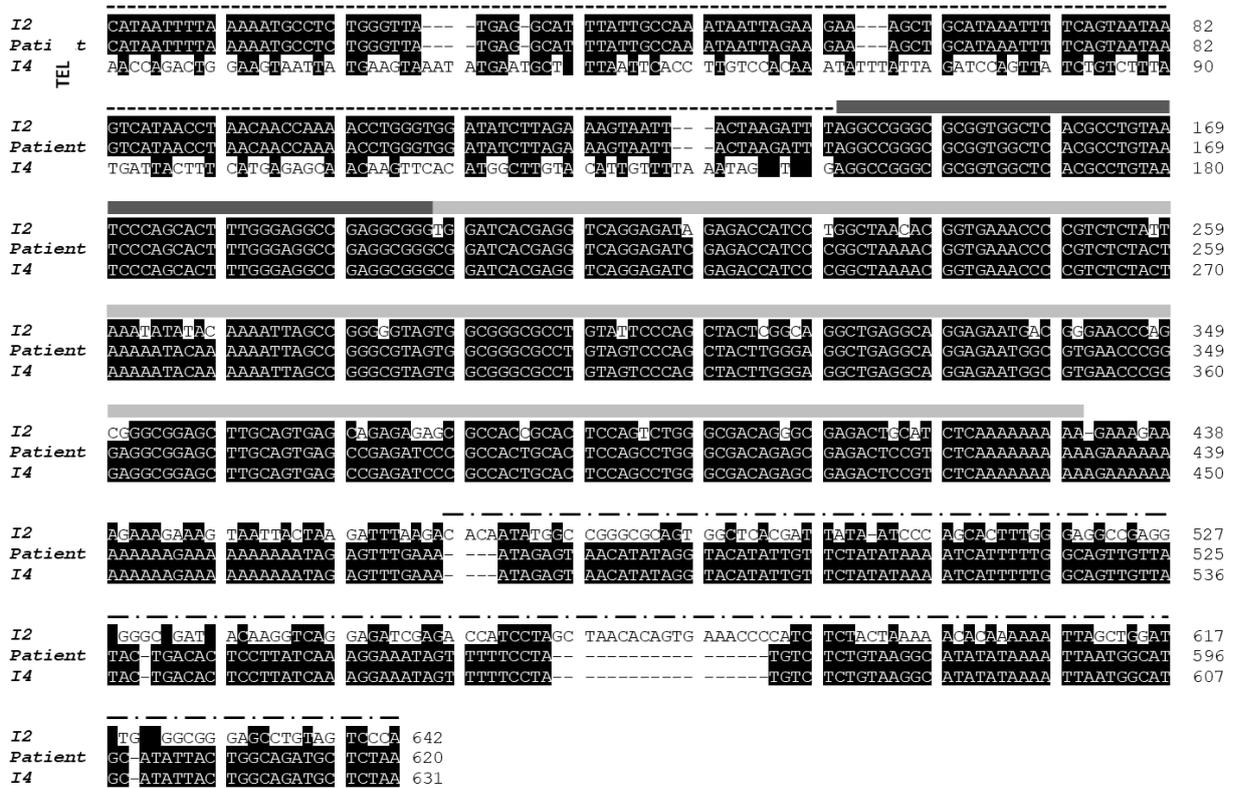
Figure S1A



**Supplementary Figure 1A: Array-CGH profiles of the patient (left), her mother (center) and father (right).** Microarray analysis of the patient's DNA shows a homozygous loss in *BLOC155/MUTED* (Log2Ratio  $-\infty$ ) Arr[GRCh37] 6p24.3(8023237\_8041535)x0 (ISCN 2016). Both parents have a heterozygous deletion (Log2Ratio = -1) with the same coordinates Arr[hg19] 6p24.3(8023237\_8041535)x1 (ISCN 2016). Green spots represent probes with a Log2Ratio < -0.3 (loss of copies), black spots are probes with  $-0.29 < \text{Log2Ratio} < 0.29$  (normal), red spots are probes with Log2Ratio > 0.3 (gain of copies). TEL: telomeric side. CEN: centromeric side.

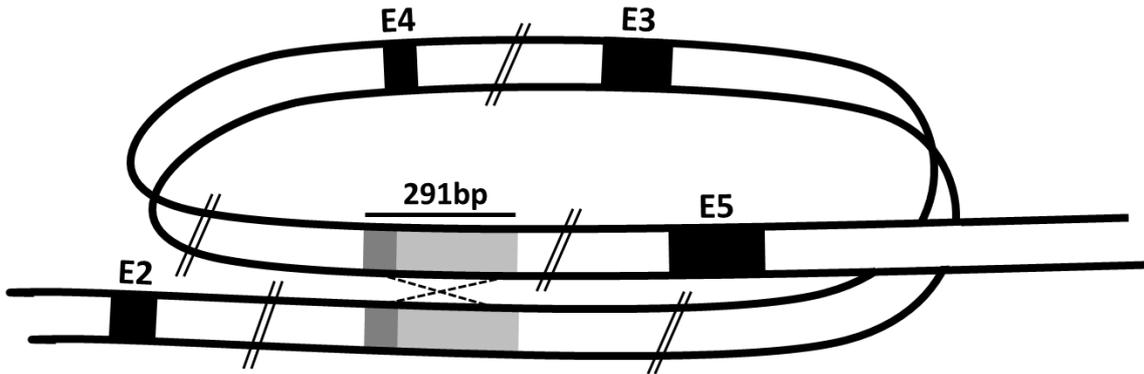
Detailed ISCN2 016 nomenclature for the patient: Arr[GRCh37] 6p24.3(8022700x2,8023237\_8041535x0,8042179x2). First deleted probe on telomeric side is at coordinate g.8023237. First deleted probe on centromeric side is at coordinate g.8041476. First telomeric probe that does not show a loss is at coordinate g.8022641. First centromeric probe that does not show a loss is at coordinate g.8042179. The minimal deletion interval is 18298 bp, and the maximal deletion interval is 19479 bp.

**Figure S1B**



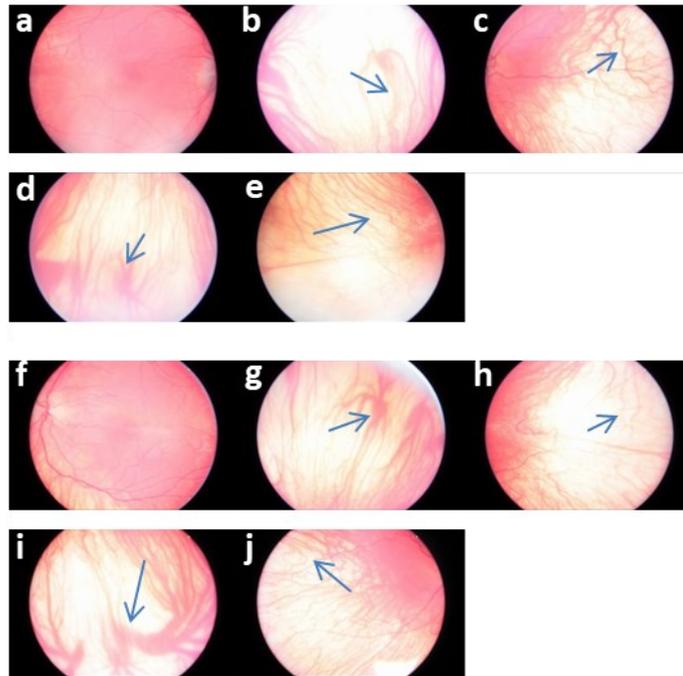
**Supplementary Figure 1B: Alignment of the deletion breakpoint sequence amplified from the patient's DNA with the reference sequences of *BLOC1S5* intron 2 (I2, g.8035877-8036519) and intron 4 sequences (I4, g.8054928-8055559).** The dashed and dotted lines above the sequence indicate the parts of the patient's sequence strictly homologous to introns 2 and 4, respectively. The thick dark grey line indicates the segment of 57 nucleotides presenting 100% homology between intron 2 and intron 4. The thick light grey line indicates the adjacent segment of 234 nucleotides presenting 90% homology between intron 2 and intron 4. It can be observed that the patient's sequence corresponds specifically to the intron 4 sequence.

Figure S1C



**Supplementary Figure 1C. Schematic representation of a proposed mechanism of Non Allelic Homologous Repair (NAHR) between highly homologous sequences in intron 2 and intron 4 of *BLOCIS5*.** This representation is consistent with intrachromatid pairing of non-allelic homologous regions of 291bp located in introns 2 and 4 during meiosis, the most likely mechanism leading to intragenic rearrangement between highly homologous sequences. *Other scenarios, not represented here, are also possible with inter-chromosomal and inter-sister chromatid exchanges (See Sasaki et al. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010;11(3):182-195).* Black boxes represent exons (E); dark grey box represents the 100% identical 57 bases in introns 2 and 4; light grey box represents the 90% homologous 234 base pair element shared by introns 2 and 4. Dotted lines represent cross over recombination leading to the deletion of the in-between segment.

Figure S2

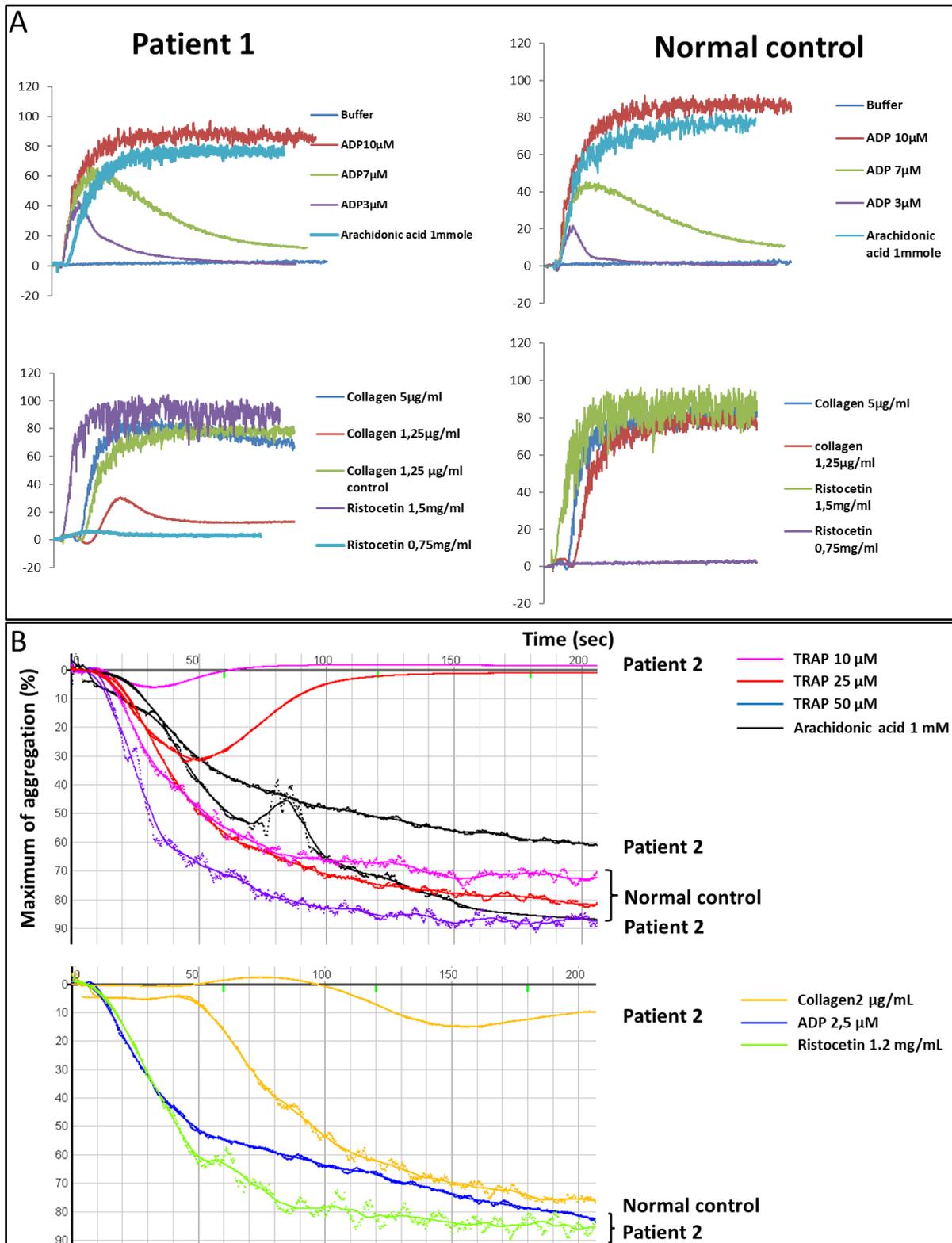


**Supplementary Figure 2: Patient's eye fundus.**

**Upper part - Right eye:** a: posterior pole (macular hypoplasia); b: upper peripheral; c: temporal peripheral retina; d: lower peripheral retina; e: nasal peripheral retina. In b, c, d and e: retinal hypopigmentation is more pronounced than at the posterior pole (a); arrow points to abnormally visible choroidal vessels.

**Lower part - Left eye:** f: posterior pole (macular hypoplasia); g: upper peripheral; h: temporal peripheral retina; i: lower peripheral retina; j: nasal peripheral retina. In g, h, i and j: retinal hypopigmentation is more pronounced than at the posterior pole (f); arrow points to abnormally visible choroidal vessels.

Figure S3



Supplementary Figure 3: Platelet aggregation studies.

A. Patient 1 and normal control

B. Patient 2 and normal control

Platelet light transmission aggregometry patterns showing mild to moderate aggregation defects in response to the different agonists tested.

## II.2 Dopachrome tautomerase variants in patients with oculocutaneous albinism

*Genetics in Medicine* (2020) – Online ahead of print

(E-)Published : October 2020, PMID: 33100333 DOI: 10.1038/s41436-020-00997-8

### Authors and affiliations

Perrine Pennamen (1,2)\*, Angèle Tingaud-Sequeira (1)\*, Iveta Gazova (3)\*, Margaret Keighren (3), Lisa McKie (3), Sandrine Marlin (4), Souad Gherbi Halem (4), Josseline Kaplan (5), Cédric Delevoye (6), Didier Lacombe (1), Claudio Plaisant (2), Vincent Michaud (2), Eulalie Lasseaux (2), Sophie Javerzat (1), Ian Jackson (3,7), Benoit Arveiler (1,2).

\* these authors contributed equally to the work.

1) Rare Diseases, Genetics and Metabolism, INSERM U1211, University of Bordeaux, Bordeaux, France.

2) Molecular Genetics Laboratory, Bordeaux University Hospital, Bordeaux, France.

3) MRC Human Genetics Unit, University of Edinburgh, Edinburgh, UK.

4) Laboratory of Embryology and Genetics of Human Malformation, Imagine Institute, Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité University, Paris, France

5) Laboratory of Genetics in Ophthalmology, Imagine Institute, Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité University, Paris, France.

6) Institut Curie, PSL Research University, CNRS, UMR144, Structure and Membrane Compartments, 75005 Paris, France.

7) Roslin Institute, University of Edinburgh, Edinburgh, UK

*Submitted 26 June 2020; revised 24 September 2020; accepted: 24 September 2020*

### Résumé

#### Objectif

L'albinisme est une affection cliniquement et génétiquement hétérogène. Malgré une analyse exhaustive des 20 gènes connus, environ 30% des patients restent sans confirmation moléculaire. Notre objectif était d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans l'albinisme.

#### Méthodes

Nous avons séquencé un panel de gènes connus ou prédits comme impliqués dans la mélanogénèse chez 230 patients avec albinisme non résolu.

## Résultats

Nous avons identifié des variants dans le gène *Dopachrome tautomerase (DCT)* chez deux patientes. L'une était hétérozygote composite pour une délétion de 14 paires de bases dans l'exon 9 et le variant c.118T>A p.(Cys40Ser). La seconde était homozygote pour le variant c.183C>G p.(Cys61Trp). Ces deux patientes présentaient une hypopigmentation cutanéophanérienne modérée et une atteinte ophtalmologique caractéristique. La technique CRISPR-Cas9 a été utilisée sur des souris C57BL/6J pour créer des mutations identiques aux variants faux-sens des patientes, ainsi qu'un variant perte de fonction de type indel (insertion-délétion). Les descendants homozygotes pour chacun des trois variants présentaient une hypopigmentation de leur fourrure, plus discrète pour la Cys40Ser que la Cys61Trp ou l'indel. L'analyse histologique a montré une hypopigmentation significative de l'épithélium pigmenté rétinien (RPE) indiquant qu'une mélanogenèse du RPE déficient pourrait être associée au déficit oculaire et visuel. La perte de fonction de *dct* dans les embryons de poisson zèbre a par ailleurs révélé une hypopigmentation des mélanophores et du RPE.

## Conclusion

*DCT* est le gène impliqué dans un nouveau type d'albinisme oculocutané que nous proposons de nommer OCA8.

## Abstract

### Purpose

Albinism is a clinically and genetically heterogeneous condition. Despite analysis of the 20 known genes, ~30% patients remain unsolved. We aimed to identify new genes involved in albinism.

### Methods

We sequenced a panel of genes with known or predicted involvement in melanogenesis in 230 unsolved albinism patients.

### Results

We identified variants in the *DopaChrom Tautomerase (DCT)* gene in two patients. One was compound heterozygous for a 14-bp deletion in exon 9 and c.118T>A p.(Cys40Ser). The second was homozygous for c.183C>G p.(Cys61Trp). Both patients had mild hair and skin hypopigmentation, and classical ocular features. CRISPR-Cas9 was used in C57BL/6J mice to create mutations identical to the missense variants carried by the patients, along with one loss-of-function indel. When bred to homozygosity the three mutations revealed hypopigmentation of the coat, milder for Cys40Ser compared with Cys61Trp or the frameshift mutation.

Histological analysis identified significant hypopigmentation of the retinal pigmented epithelium (RPE) indicating that defective RPE melanogenesis could be associated with eye and vision defects. *DCT* loss of function in zebrafish embryos elicited hypopigmentation both in melanophores and RPE cells.

### Conclusion

*DCT* is the gene for a new type of oculocutaneous albinism that we propose to name OCA8.

## INTRODUCTION

In humans, albinism defines a group of genetic diseases commonly subdivided into three main types: oculocutaneous albinism (OCA), ocular albinism (OA), and syndromic albinism (Hermansky–Pudlak syndrome [HPS] and Chediak–Higashi syndrome [CHS]).<sup>1,2</sup> Generalized hypopigmentation of the skin and hair is highly variable among patients, ranging from total absence of melanin to undetectable defects in pigmentation. On the other hand, ophthalmological anomalies are more consistently detected and are therefore considered to be central in the definition of human albinism. These include iris and/or retinal hypopigmentation, nystagmus, foveal hypoplasia, chiasm misrouting of the optic nerves, and overall reduced visual acuity. Kruijt et al. described major and minor criteria and proposed that patients should display three major criteria or two major criteria and two minor criteria for the diagnosis of albinism to be ascertained.<sup>3</sup>

Albinism is also genetically heterogeneous since 20 genes are so far known to be involved (6 for OCA, 1 for OA, 1 for the closely related *FHONDA*, 11 for HPS, 1 for CHS).<sup>2,4,5,6</sup> Despite a systematic search for both single-nucleotide variants and copy-number variants in 19 of these genes, 27% of patients remain without a molecular diagnosis.<sup>5</sup>

We and others have shown that over 50% of OCA patients with molecular diagnosis have pathogenic variants in *TYR* (OCA1) encoding tyrosinase while around 2–3% have a defective *TYRP1* (OCA3) encoding tyrosinase-related protein 1.<sup>1,5,7,8,9</sup> Both enzymes are well known to control pigment synthesis.<sup>10</sup> Of note, a third enzyme, dopachrome tautomerase, (*DCT*) acts downstream of *TYR* but upstream of *TYRP1* on the *DHICA* melanin synthesis pathway<sup>11,12</sup> making the corresponding gene (*DCT/TYRP2*) an obvious candidate for human albinism. However, pathogenic variants in *DCT/TYRP2* have not yet been reported.

In the present study, we screened a series of 230 unsolved patients for pathogenic variants among a selection of candidate genes including *DCT/TYRP2*. We describe two patients with classical ocular albinism and mild hypopigmentation of the skin, hair, and eyes who both have

potential pathogenic *DCT/TYRP2* genotypes. We further validate these variants by analyzing the phenotypes of genetically modified mice lines and zebrafish embryos.

This work provides evidence that pathogenic variants in *DCT/TYRP2* can cause oculocutaneous albinism in humans. We therefore propose that *DCT/TYRP2* is now associated to a new OCA subgroup, OCA type 8 (OCA8).

## MATERIALS AND METHODS

### Ethics statement

This study was approved by the Comité de Protection des Personnes Sud-Ouest et Outre-Mer III. Informed consent was obtained from the patients and/or their parents in the case of minors before genetic analysis was performed. Authorization for publication, including the publication of photographs, was obtained from patient 1.

### Sequencing of candidate genes

DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using an automated procedure (Tecan EVO-ReliaPrep, Promega). Next-generation sequencing (NGS) was performed using the ionTorrent technology on a S5XL instrument (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, USA) (AmpliSeq panel) and bioinformatics analysis of variants were as previously described.<sup>5</sup> *DCT* variants (NM\_001129889.2) were confirmed by Sanger sequencing. See [Supplementary Data](#) for more details.

### CRISPR modeling of *Dct* variants in the mouse

#### Mouse lines

All mouse work was carried out in compliance with United Kingdom Home Office regulations under a United Kingdom Home Office project license. To create the *Dct*118 A/A, *Dct*183 G/G, and *Dct*<sup>-/-</sup> alleles, the CRISPR design site <https://chopchop.cbu.uib.no/> (in the public domain) was used to design guides with default settings (g1 for *Dct*118 A/A and g2 for *Dct*183 G/G and *Dct*<sup>-/-</sup>, Supplementary Materials). Genetic engineering of CRISPR-Cas9 lines with each of the Cys substitutions was performed as already described<sup>13</sup> and detailed in Supplementary Materials and Methods.

#### Direct spectrophotometry of *Dct* mice

Coat color of live mice, aged between 1 and 2 months, was measured by direct spectrophotometry using Konica Minolta CM-2600d, as already described<sup>14</sup> and detailed in [Supplementary Materials and Methods](#). Between five and nine animals were studied, depending on the strain.

### **Eye histology**

Mice were sacrificed by cervical dislocation and eyes enucleated and processed as detailed in [Supplementary Materials and Methods](#).

Randomization was not required, since comparison was between genotypes not treatments. Spectrometric measurements were carried out blind to genotype.

### ***dct* knockdown in *Danio rerio***

#### ***dct* targeting**

Zebrafish (*D. rerio*) were produced in accordance with the French Directive (Ministère de l'Agriculture) and in conformity with the European Communities Council Directive (2010/63/EU). The zebrafish homolog of *DCT* was identified by searching in the genome sequence database at [http://www.ensembl.org/Danio\\_rerio](http://www.ensembl.org/Danio_rerio) taking into account the synteny with the human genome. Morpholinos (MOs) were designed by and obtained from GeneTools, LLC and embryo injection is detailed in [Supplementary Materials and Methods](#).

Melanin assay was based on already described methods<sup>15</sup> and detailed in Supplementary Materials and Methods.

Histological analysis was performed as described in Supplementary Materials and Methods.

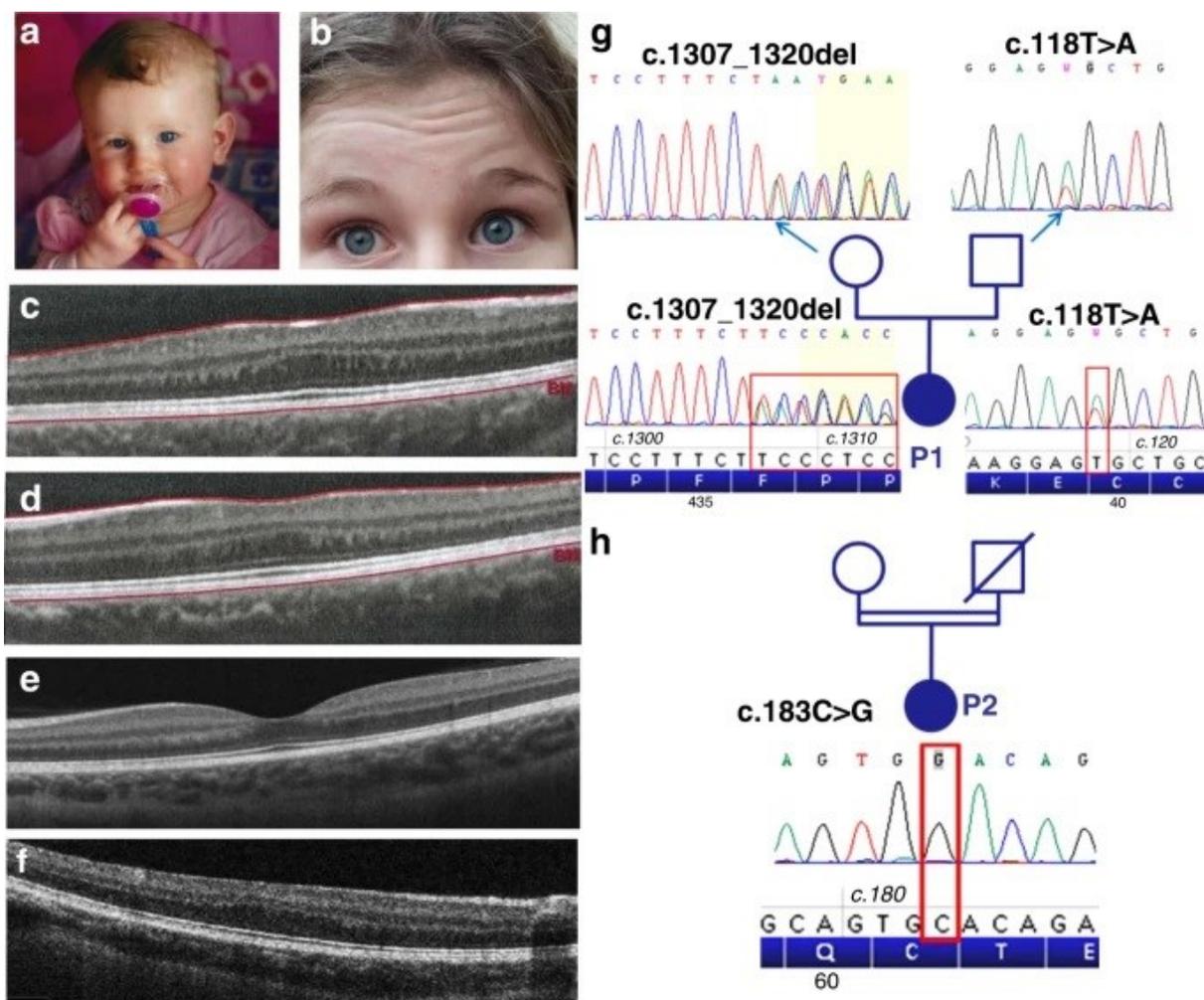
## **RESULTS**

### **Identification of *DCT* variants in patients with oculocutaneous albinism**

We recently described the analysis of 990 index cases with albinism and showed that a molecular diagnosis could be obtained after analysis of the 19 albinism genes known at that time in 72% of patients.<sup>5</sup> Our cohort nowadays comprises more than 1500 patients, among whom the proportion of patients remaining without a molecular diagnosis is in the 25–30% range. Following the hypothesis that some of these patients may have pathogenic variants in genes other than the 19 already identified, we screened the genomes of 230 undiagnosed patients for variants in candidate genes selected for their known or predicted involvement in melanogenesis, including orthologues of mouse mutants with pigmentary defects (see [Supplementary Table 1](#)). We recently described the finding of *BLOC1S5* variants in two patients with Hermansky–Pudlak syndrome (HPS11).<sup>6</sup>

Here, we identified homozygous or compound heterozygous variants of the *DCT* gene (NM\_001129889.2), also called *TYRP2*, in two patients.

Patient 1, a 12-year-old girl born to unrelated parents of French origin, was diagnosed at the age of 3 years, and presented with moderate hypopigmentation of the skin and hair, congenital nystagmus, moderate foveal hypoplasia grade I,<sup>16</sup> iris transillumination, and hypopigmentation of the retina (Fig. 1). Her visual acuity was 5/10 in both eyes. She harbored a single-nucleotide variant in exon 1 of *DCT*, c.118T>A p.(Cys40Ser) (ClinVar submission number SUB7603838), that was inherited from her heterozygous father, and a 14-bp deletion in exon 9, c.1406\_1419del p.(Phe469\*) (ClinVar submission number SUB7603850), inherited from her heterozygous mother. Patient 2 (age at diagnosis not known) is a woman aged 36 at the time of consultation who was born to consanguineous parents originating from Northern Africa. She had cream-colored skin, light brown hair, nystagmus, photophobia, iris transillumination, hypopigmentation of the retina, and reduced visual acuity (4/10 and 5/10). Morphology of the fovea was not investigated. Patient 2 was homozygous for variant c.183C>G p.(Cys61Trp) (ClinVar submission number SUB7603854) in *DCT* exon 1 (Fig. 1). Segregation analysis could not be completed and no further information on her phenotype could be gathered, as she was lost from contact after DNA sampling. All three variants were predicted to be deleterious by several prediction softwares (see “Materials and Methods”) taking into account parameters such as allele frequency in public genome databases, conservation, as well as effect on protein structure and physicochemical properties. All three variants are classified as likely pathogenic according to American College of Medical Genetics and Genomics criteria:<sup>17</sup> c.118T>A p.(Cys40Ser) (PS3, PM2, PP3, PP4), c.1406\_1419del p.(Phe469\*) (PM2, PM4, PP3, PP4), c.183C>G p.(Cys61Trp) (PS3, PM2, PP3, PP4).

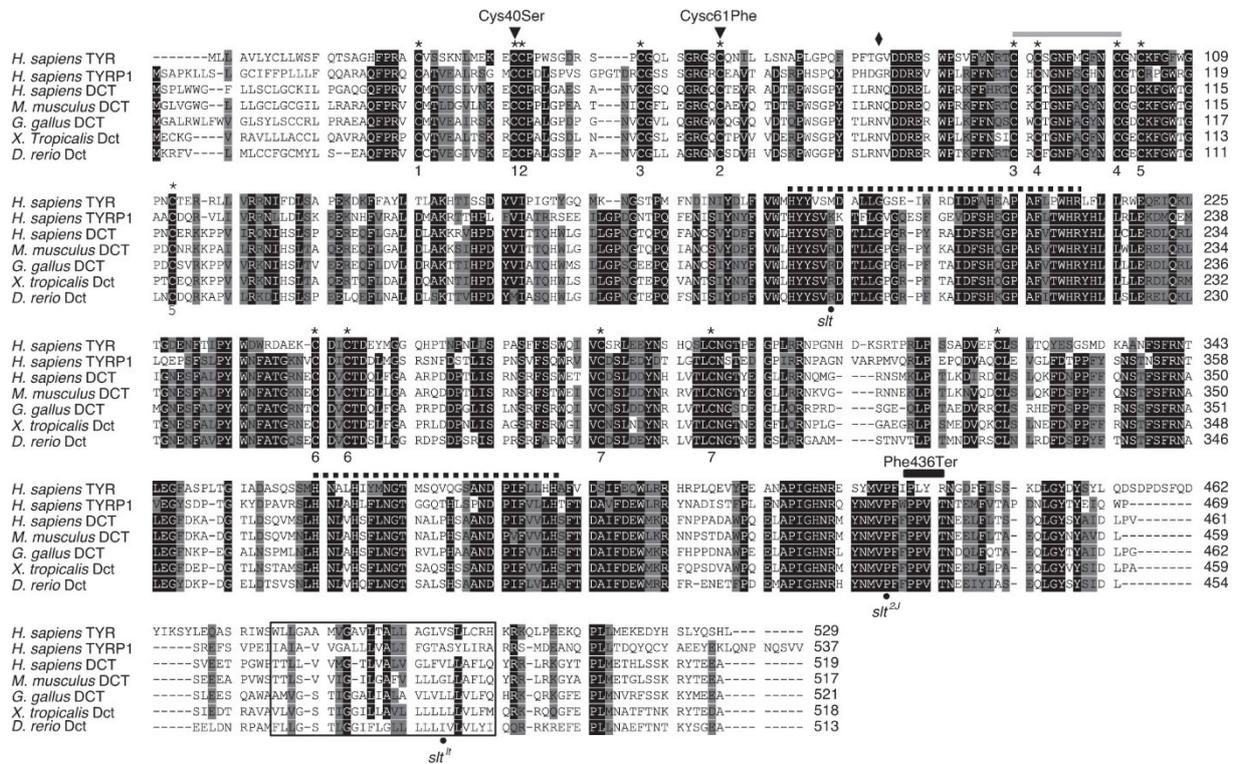


**Fig. 1: Phenotype and genotype of patients 1 and 2.** Photographs show the hypopigmentation of hair and skin of patient 1 (a, b). Bilateral foveal hypoplasia is seen in patient 1: (c) right (d) left eye), compared with a normal control (e) and a positive control (OCA1 patient) (f). Pedigree of patient 1 shows inheritance of the two variants from heterozygous parents (g). Pedigree of patient 2 is shown in (h). The patient's consanguineous parents could not be tested because they were not available.

The c.1406\_1419del p.(Phe469\*) out-of-frame deletion present in patient 1 is predicted to result either in a truncated *DCT* protein lacking the transmembrane domain, which is necessary for anchoring the protein in the melanosomal membrane, or in messenger RNA (mRNA) nonsense-mediated decay.

Notably, both single-nucleotide variants found in the two patients, c.118T>A p.(Cys40Ser) and c.183C>G p.(Cys61Trp), affect highly conserved cysteine residues located in exon 1 of the gene and belonging to a Cys-rich domain that is part of an EGF-like domain with five potential disulfide bonds (Fig. 2).

These findings suggest that the three *DCT* variants identified are pathogenic and responsible for the albinism phenotype of the two patients described here. To further evaluate their pathogenicity, the two missense variants were introduced in mouse by CRISPR-Cas9 engineering.



**Fig. 2: Amino acid sequences alignment for the human tyrosinase family and DCT sequences of other species.** In addition to *Homo sapiens* protein sequences of tyrosinase family including TYR, TYRP1, and TYRP2 (DCT), DCT protein sequences of *Mus musculus*, *Gallus gallus*, *Xenopus tropicalis*, and *Danio rerio* were aligned. Black shaded residues indicate more than 80% of identity whereas gray shaded residues indicate more than 80% of similarity. Black stars (\*) highlight conserved cysteine residues. Black diamond indicates the position of the fortuitous out-of-frame 5-bp deletion in the knockout mouse model produced in the present study (p.Asn78\*). Above the sequence alignment, the gray line indicates the EGF-like domain whereas the black dotted lines indicate the metal ion-binding domains. The black lined box represents the transmembrane domain. Black dots under the alignment indicate the previously reported *slaty* mutations in mouse (slt: R194Q; slt<sup>2J</sup>: P434L; slt<sup>L</sup>: G486R). Numbering under alignment indicates the cysteine binds.

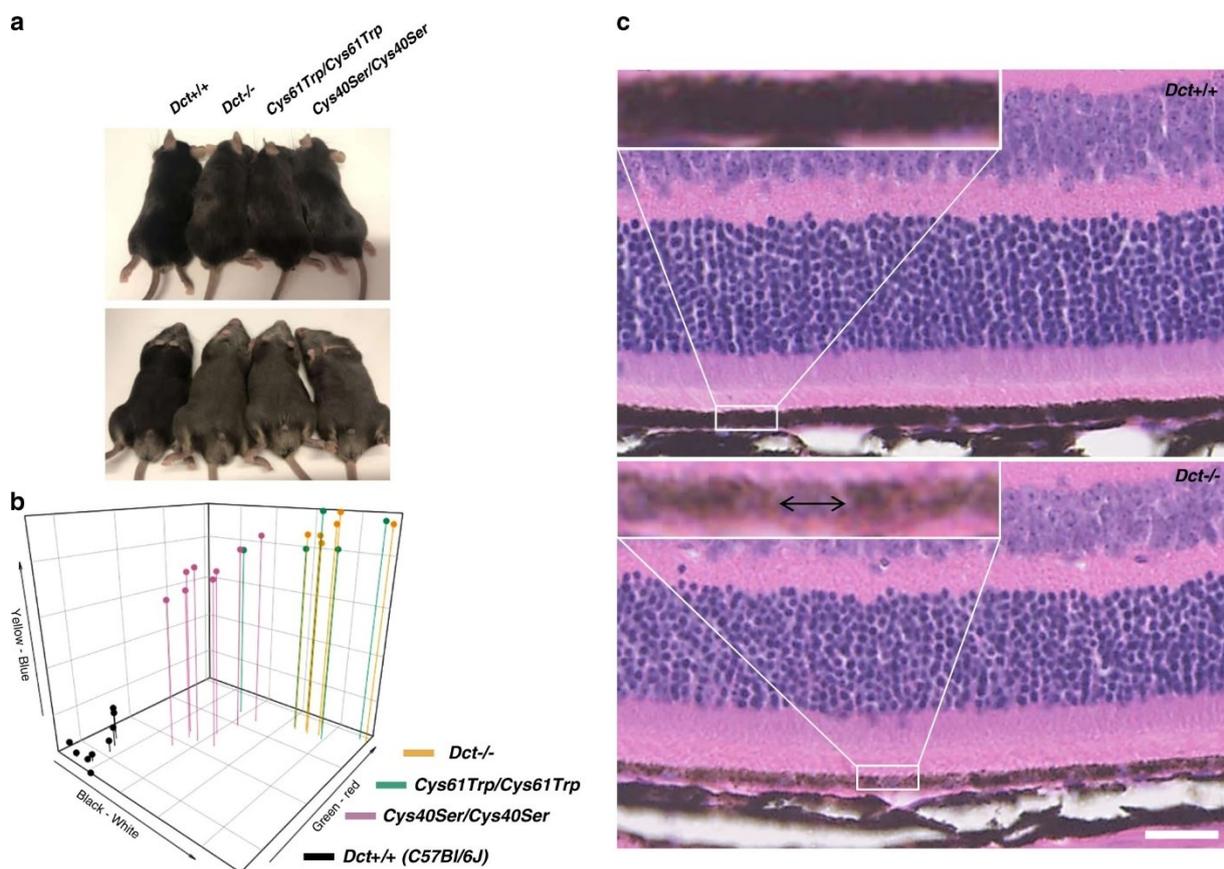
### CRISPR modeling of *Dct* variants in the mouse

In addition to the *Dct* mouse knockout line that was described by Guyonneau et al.,<sup>18</sup> three different missense variants have been shown to be responsible for the grayish (*slaty*) color of mouse hair.<sup>12,19</sup> As indicated in Fig. 2, none of these mutations are equivalent to the patients' variants identified in this study. We therefore decided to genetically engineer CRISPR-Cas9 lines with each of the Cys substitutions.

Two lines were obtained with the exact equivalent changes to human p.(Cys40Ser) (mouse c.118T>A p.(Cys40Ser)) and human p.(Cys61Trp) [mouse c.183C>G p.(Cys61Trp)]. Targeting of base pair 183 also led to a fortuitous out-of-frame 5-bp deletion (c.171\_175del) in one founder that was brought to homozygosity as a loss-of-function control *Dct*<sup>-/-</sup> (frameshift results in premature stop codon at position 78, see Supplementary Data).

Mice heterozygous for any of the three mutations had a normally pigmented (black, nonagouti) fur. We crossed each line to produce homozygous mice that were grown to adulthood and all mice displayed dark gray hair, apparently identical to that seen in the previously described

mutations of *Dct* (Fig. 3a). The color difference between mutant and control was much clearer in the ventral hair. The mouse ventrum is often paler than the dorsum, even in nonagouti mice such as these. Nonhairy skin (pinna and tail) of mutants are not obviously paler than control. To more precisely quantify the pigmentary changes, we colorimetrically assayed the dorsal coat of the mutants in three-dimensional CIELAB color space, measuring along light–dark, blue–yellow, and red–green axes (Fig. 3b). All three lines were very different from the parental C57BL6/J mice. In addition, the *Cys61Trp* mice and the deletion mice were indistinguishable in all three dimensions. Interestingly, although not apparently different by eye, the mice homozygous for *Cys40Ser* were consistently less severely affected than the *Cys61Trp* and deletion mice in all three dimensions.



**Fig. 3: Patient variants have a visible effect on pigmentation of the coat and eyes in mice.** (a) Dorsal (upper panel) and ventral (lower panel) view of *Dct* mutant mice compared with C57BL/6J controls. Male mice are shown, approximately 3 months old. (b) Three-dimensional CIELAB color measurement along light–dark, blue–yellow, and red–green axes as indicated for *Cys40Ser*, *Cys61Trp*, *Dct*<sup>-/-</sup>, and C57BL/6J. For each measurement, the difference between any of the mutated strain and control was highly significant (*t*-test, *p* values < 10<sup>-6</sup>), no significant difference was found between *Cys61Trp* and *Dct*<sup>-/-</sup> whereas *Cys40Ser* was significantly less affected than *Cys61Trp* (especially in the red–green pigment contents, *p* value < 5.10<sup>-4</sup>). (c) Histology of 2-month-old retinas from *Dct*<sup>-/-</sup> and age-matched C57BL/6J control mice. Fields were photographed at mid-distance between the optic nerve and ciliary body for both samples; scale bar 25 μm. One field is magnified to illustrate the significant difference in retinal pigment epithelium (RPE) pigmentation. Hematoxylin stained nuclei are clearly visible in *Dct*<sup>-/-</sup> (double arrow line) whereas nuclei are masked by intense pigmentation in control.

These observations in mice strongly suggest that the missense variants identified in both patients cause loss or partial loss of function of *DCT* and that this is the cause of their hypopigmentation of the hair and skin.

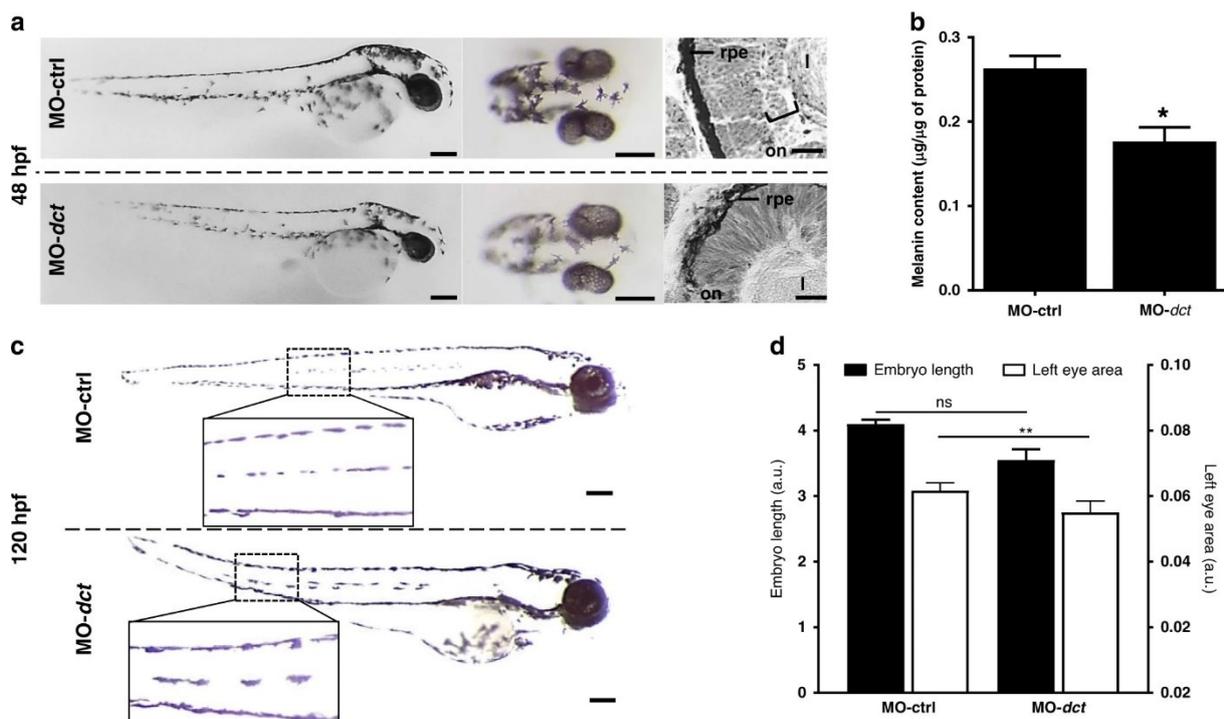
*Dct* knockout and *slaty* mice have hardly been investigated for ophthalmological anomalies. We conducted histological analysis of eyes from adult *Dct*<sup>-/-</sup> mice. Gross anatomy of the eye was not modified in these mice compared with wild-type (C57Bl/6J) age-matched controls although we cannot rule out that the outer nuclear layer was slightly thinner and disorganized in some *Dct*<sup>-/-</sup> retinas (not shown). Melanocytes in the choroidal layer appeared normally pigmented. However, careful examination of the outer retina evidenced that the retinal pigmented epithelium (RPE) in *Dct*<sup>-/-</sup> mice was significantly less pigmented than in wild-type retinas. As illustrated in Fig. 3c, dark melanin in the control eye completely masks the RPE cell membranes and contents whereas in *Dct*<sup>-/-</sup> eyes, pigmentation of the RPE is light enough that hematoxylin stained nuclei can be visualized in most of the RPE cells.

Altogether, these results show that when introduced in mice, Cys40Ser and Cys61Trp mutations result in hypopigmentation of the coat, the latter being undistinguishable from complete loss of function. Furthermore, RPE melanin content is reduced in *Dct*<sup>-/-</sup> mice, which may cause eye and vision anomalies in mice, and, in a similar way, in *DCT* patients.

#### ***dct* knockdown in *Danio rerio***

Loss of function of *dct* was also investigated in zebrafish (*D. rerio*) embryos in which development and pigmentation of skin melanophores and RPE can be followed in vivo. Of note, only one *DCT* homolog is found in *D. rerio* genome and *D. rerio* protein sequences are highly conserved with 62% identity and more than 85% similarity (Fig. 2). The expression of *dct* was transiently knocked down using a morpholino (MO). Compared with embryos injected with MO-ctrl, MO-*dct* injected embryos did not show macroscopic phenotype disruption and no obvious disruption of skin melanophores pattern at neither 48 hpf nor 120 hpf (Fig. 4a, c). However, melanophores dorsally localized at the head level of 48 hpf MO-*dct* appeared lighter and wider than those of controls (Fig. 4a). Eye pigmentation was also slightly lighter in *dct* knocked-down embryos (Fig. 4a). To quantify a visible hypopigmentation, a whole-embryo melanin assay was performed, confirming a  $\approx 30\%$  significant decrease of total melanin in *dct*-knockdown embryos versus control embryos (Fig. 4b). Later in development at 120 hpf, MO-*dct* embryos still presented with a normal pattern of skin melanophores. However, their intracellular pigmentation was different from controls. In control embryos, pigmentation of melanophores appeared highly packed as expected whereas pigmentation in MO-*dct* embryos melanophores was consistently weaker and showed an abnormal stellar pattern (Fig. 4c). In

addition to general pigmentation disruption, significant microphthalmia was noticed possibly due to off-target effect or toxicity, although other indicators for toxicity, e.g., shape and size of the embryos, were not significantly affected<sup>20</sup> (Fig. 4d). Histological sectioning of 48 hpf embryos (Fig. 4a) evidenced eye developmental defects. In MO-Ctrl injected embryos, stratification of the neural retina into outer and inner layers was achieved by 48 hpf whereas at the same stage, MO-*dct* eyes still displayed only one homogeneous layer of neurons. The RPE in morphants was clearly hypopigmented, but in addition instead of the normal organization as a heavily pigmented cobblestoned single cell layer, the RPE showed disheveled cells and wavy contours.



**Fig. 4: *dct* is required for skin melanophores and retinal pigment epithelium (RPE) development preservation in zebrafish *D. rerio*.** (a) Representative lateral views of whole embryos (scale bar, 100 μm), dorsal views of heads (scale bar, 100 μm) and histological cross sections of eyes (scale bar, 20 μm) from representative 48 hpf zebrafish embryos injected with MO-ctrl or MO-*dct*. Bracket shows inner retina that has differentiated from outer retina in control but not in Mo-*dct*. (b) Melanin was quantified in 48 hpf zebrafish embryos injected with MO-ctrl or MO-*dct*. Means were calculated from the data collected from three independent experiments, Mann–Whitney test, \* $p < 0.05$ . (c) Representative lateral views of whole embryos at 120 hpf injected with MO-ctrl or MO-*dct*. Insets represent enlarged views of skin melanophores laterally localized in the trunk. (d) Embryo length (reported on left y-axis) and left eye area (right y-axis) were measured from one representative experiment on MO-ctrl group ( $n = 12$ ) and MO-*dct* group ( $n = 28$ ). Mann–Whitney test was applied for length data whereas unpaired  $t$ -test was performed for left area data. *ns* nonsignificant. \*\* $p < 0.01$ .

Altogether, these data are complementary to the observations made in mice, and confirm that loss of function of *Dct* impairs melanin metabolism in both melanophores and in RPE cells of early embryos in *D. rerio* with possible consequences on eye development and/or function.

## DISCUSSION

We report the identification of pathogenic variants in the *DCT* gene in two unrelated patients with oculocutaneous albinism. Two of them are missense variants affecting highly conserved cysteine residues that belong to a Cys-rich domain (c.118T>A p.(Cys40Ser) and c.183C>G p.(Cys61Trp)). The third variant is a 14-bp out-of-frame deletion (c.1406\_1419del p.(Phe469\*)), a likely null allele. Both patients presented with a creamy skin and light brown hair, thus indicating that melanin is produced to a significant level. Visual acuity was moderately reduced (4/10–5/10) in both patients. The ocular phenotype included nystagmus, hypopigmentation of the retina and iris transillumination. Foveal hypoplasia was of low grade in patient 1 and not investigated in patient 2.

Here we report *DCT* variants have been shown to cause oculocutaneous albinism in human. Dopachrome Tautomerase (DCT), formerly known as Tyrosinase-Related Protein 2, is one of three members of the tyrosinase protein family, along with TYR and TYRP1. All three are enzymes catalyzing reactions in the melanogenesis pathway, and are located within melanosomes, a pigment cell-specific organelle.<sup>10</sup> In this series of reactions as previously reviewed,<sup>10</sup> Tyrosinase (TYR) catalyzes the initial conversion of tyrosine to dihydroxyphenylalanine (DOPA) and DOPA to DOPAquinone, which spontaneously cyclizes to DOPACHrome. DCT catalyzes the tautomerization of DOPACHrome to dihydroxyindole carboxylic acid (DHICA). DOPACHrome can also spontaneously lose the carboxyl group to produce dihydroxyindole (DHI). The function of the third member of the family, Tyrosinase-related Protein 1 (TYRP1), is still not completely certain and may vary depending upon species and/or cell type. It probably acts, maybe in conjunction with TYR, to oxidize DHICA and DHI, by removing the two hydroxyl groups to the indole derivatives, which ultimately polymerize to form melanin on a protein matrix within the melanosome. The melanins formed from DHICA and DHI are eumelanins, which range in color from brown to black.

As TYR is the key limiting enzyme in melanogenesis, its absence results in complete lack of melanin, as seen in mutant mice and humans with OCA1. Absence of TYRP1 in mice results in the production of brown eumelanin, which appears to be less polymerized than black eumelanin. The human *TYRP1* gene is altered in patients with OCA3. The effect on pigmentation, and ocular defects, are relatively mild with bright copper-red coloration of the skin and hair, both in African and European patients.<sup>5,21</sup> Curiously, despite being upstream of TYRP1, the absence of DCT in mice results in a darker eumelanin than the brown eumelanin that lacks end-products generated in the presence of TYRP1. This is most likely due to

DOPAchrome being converted to DHI, which produces a dark eumelanin. Absence of TYRP1 in presence of DCT means that DHICA, rather than its oxidized derivative, is polymerized to produce the brown eumelanin observed. A milder phenotype than the average OCA3 type is therefore expected in humans with a loss of DCT function.

The two missense variants identified in this study are located in the N terminal Cys-rich subdomain of DCT, which is strikingly conserved in its two paralogs TYR and TYRP1 and across species (Fig. 2). Localization of the ten cysteine residues (C1 to C10) in each enzyme is indicated in Table 1 as well as their participation in the five disulfide bonds that stabilize the domain.<sup>10</sup>

EGF-LIKE SIGNATURE										
CYS	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
DCT	29	<b>40<sup>a</sup></b>	41	52	<b>61<sup>b</sup></b>	95	97	107	109	119
TYR	<b>24 (3)<sup>a</sup></b>	<b>35 (1)<sup>a</sup></b>	<b>36 (1)<sup>b</sup></b>	<b>46 (2)</b>	<b>55 (3)<sup>b</sup></b>	<b>89 (4)</b>	<b>91 (3)</b>	<b>100 (2)</b>	<b>103 (2)</b>	<b>112 (1)</b>
TYRP1	<b>30 (1)<sup>a</sup></b>	41	42	56	65	99	101	110	113	122
DiS	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup>	3	2 <sup>b</sup>	3	4	4	5	5

**Table 1. Conserved cysteine residues across the TYR/TYRP1/DCT family.** Cysteines in the Cys-rich domain are renumbered C1 to C10 to facilitate correspondence between the 3 enzymes. C3 to C8 are part of the EGF-like signature. The DCT/TYRP2 patients' variants are therefore in C2 (Cys40Ser) involved in Disulfide bond (DiS) 1 for patient 1, and C5 (Cys61Trp) involved in DiS 2 for patient 2. Cys residues that have been seen altered in OCA1 (TYR) or OCA3 (TYRP1) patients are indicated in bold and the number of different allelic variants described in the Human Gene Mutation Database (HGMD) are indicated in parentheses. Variants in TYR and TYRP1 that affect the same DiS bond and are therefore likely to result in a same functional consequence as DCT Cys40Ser<sup>a</sup> or Cys61Trp<sup>b</sup>.

Note that C3 to C8 (involved in disulfide bonds 2, 3, 4) belong to the highly conserved EGF-like signature. According to the Human Gene Mutation Database, among 354 missense and nonsense pathogenic variants in *TYR*, substitutions in all of the C1 to C10 cysteine residues are found associated with OCA1. Of particular interest, C2 (patient 1 variant p.(Cys40Ser)) is substituted in two unrelated OCA1 Pakistani patients,<sup>22</sup> and C5 (patient 2 variant p.(Cys61Trp)) is also substituted in OCA1 patients with three identified variants.<sup>23,24,25</sup> Interestingly one of the OCA1 patients with a C2 substitution described by Jaworek et al.<sup>22</sup> is homozygote for a Cys to Arg change and has a somewhat mild phenotype (fair blond hair and pinkish skin) compared with known complete loss of function. Moreover, the resulting TYR has a temperature-sensitive behavior likely due to slight protein misfolding. Whether this is due to loss of disulfide bond 1 and is therefore to be expected whatever amino acid is substituted at C1 or C2 would require further structural or functional investigations. Interestingly, the only

allele involving a cysteine change of the Cys-rich domain in OCA3 patients affects C1 of TYRP1 and has also been associated with impairment of traffic to the melanosomes.<sup>26</sup>

Altogether, these data suggest that disruption of disulfide bond 1 in TYR and/or TYRP1 is likely to result in less severe and possibly temperature-sensitive misfolding of the protein. Ablation of bond 2 on the other hand may have a more detrimental effect on the structure of the whole enzyme as it is essential to stabilize the EGF-like domain.

Given the high degree of conservation of tyrosinase-related proteins between them and among species, we speculated that substitution of C2 and C5 in our *DCT* patients could have similar effects and investigated the corresponding phenotypes in mice. Supporting the relevance of this model for our comparative functional analysis, the two classical mutations of mouse in *Tyr* (albino) and *Tyrp1* (brown) are also in conserved cysteines of the Cys-rich domain, in tyrosinase at C9, Cys103Ser,<sup>27,28</sup> and in *Tyrp1* at C8, Cys110Tyr.<sup>29</sup> We show that mutation of *Dct* C2 in mice appears to be less severe than either C5 or the null frameshift that was produced. Although the difference is not readily detectable visually, the subtle variation is clearly seen when the fur is analyzed spectrophotometrically. It is tempting to attribute these differences to only a slight conformation change as in TYR and TYRP1. However, structural models of DCT/TYRP2 are speculative at this point as no crystallographic data have been so far generated.

Altogether these observations indicate a causal role of the C2 and C5 substitutions in our patients. The mild phenotype of patient 1 may be explained by a partial and possibly thermosensitive loss of function of DCT.

Previous studies<sup>18</sup> have reported no effect of *Dct* mutations on mouse eye pigmentation. However, our close examination of mice with the null frameshift reveals a significant decrease in pigmentation of the RPE, although the choroid appears only mildly affected or not affected at all. How can this be related to some or all of the ophthalmic anomalies seen in the patients? Since our original demonstration that the RPE plays a key role in early development of the mammalian neural retina,<sup>30</sup> a considerable amount of work has been performed, including in the albino *Tyr*<sup>-/-</sup> mouse, that sheds light on the primary cause for visual deficiency in OCA1 patients (for review see<sup>31</sup>). In particular it was shown that the lack of melanin and/or intermediates along the melanogenesis pathway leads to retinal developmental defects, especially in the neurogenesis of ganglion cells, and that defective guidance of their axons along the optic tracts results in optic chiasm misrouting and impairment of binocular vision (for review see<sup>32</sup>). Despite extensive investigation,<sup>33,34</sup> it is still not clear which factors in the pigment synthesis pathway are involved and if they directly signal from the RPE to the neural retina or if they primarily affect RPE integrity. The fact that the RPE of both *Dct*<sup>-/-</sup> mice and

zebrafish *dct* morphants is hypopigmented, together with typical ophthalmological defects diagnosed in our two DCT patients supports the hypothesis that the fully functional melanin pathway in the early RPE is instrumental to retinal neurogenesis.

The zebrafish embryo is a useful experimental model to study both skin and eye pigmentation as well as early eye development. Models for OCA1 and OCA3 have been described.<sup>35,36,37</sup> Although *dct* expression pattern in zebrafish embryo has been used as a molecular marker of pigmented cells,<sup>38</sup> its knockdown has not been previously described. Here we show that it results in hypopigmentation of both melanophores and RPE. In addition, instead of harboring their usual pigmentation pattern, melanophores of the skin resemble those of wild-type embryos responding to hormone-driven adaptation to surrounding darkness by melanin dispersion,<sup>36</sup> suggesting that *dct* knockdown may impair melanin aggregation or that MO treatment has affected intracellular signaling. In the RPE, in addition to hypopigmentation, cell integrity was obviously affected. Such a pleiotropic effect has been described previously.<sup>39</sup> Further investigations will aim at confirming and studying these changes at the cellular and molecular levels during development both in mouse and zebrafish embryos.

In conclusion, we report here evidence of *DCT* variants causing OCA in two unrelated patients. It is notable that both patients had mild hypopigmentation of the skin, hair, and eyes and moderate loss of visual acuity. Albinism is clinically heterogeneous, and DCT patients seem to fall in the mild range of the phenotypical spectrum. These mild phenotypes may be overlooked by clinicians and lead to underdiagnosis of albinism. As we recently discussed,<sup>40</sup> we advocate that minimal signs, both dermatologic and ophthalmologic, sometimes of atypical presentation, should be systematically given consideration and lead to genetic investigations to establish a precise diagnosis. The *DCT* gene should now be included in albinism diagnostic gene panels. We propose that the corresponding form of OCA is called OCA8.

## REFERENCES

1. Grønskov K, Ek J, Brøndum-Nielsen K. Oculocutaneous albinism. *Orphanet J Rare Dis.* 2007;2:43–51.
2. Montoliu L, Grønskov K, Wei AH, et al. Increasing the complexity: new genes and new types of albinism. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014; 27:11–18.
3. Kruijt CC, de Wit GC, Bergen AA, Florijn RJ, Schalijs-Delfos NE, van Genderen MM. The phenotypic spectrum of albinism. *Ophthalmology.* 2018;125:1953–1960.
4. Poulter JA, Al-Araimi M, Conte I, et al. Recessive mutations in *SLC38A8* cause foveal hypoplasia and optic nerve misrouting without albinism. *Am J Hum Genet.* 2013;93:1143–1150.
5. Lasseaux E, Plaisant C, Michaud V, et al. Molecular characterization of a series of 990 index patients with albinism. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2018;31:466–474.
6. Pennamen P, Le L, Tingaud-Sequeira A, et al. *BLOC1S5* pathogenic variants cause a new type of Hermansky–Pudlak syndrome. *Genet Med.* 2020. <https://doi.org/10.1038/s41436-020-0867-5> [Epub ahead of print].
7. Gargiulo A, Testa F, Rossi S, et al. Molecular and clinical characterization of albinism in a large cohort of Italian patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:1281–1289.
8. Hutton SM, Spritz RA. Comprehensive analysis of oculocutaneous albinism among non-Hispanic caucasians shows that *OCA1* is the most prevalent *OCA* type. *J Invest Dermatol.* 2008;128:2442–2450.
9. Zhong Z, Gu L, Zheng X, et al. Comprehensive analysis of spectral distribution of a large cohort of Chinese patients with non-syndromic oculocutaneous albinism facilitates genetic diagnosis. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2019;32:672–686.
10. Lai X, Wichers HJ, Soler-Lopez M, Dijkstra BW. Structure and function of human tyrosinase and Tyrosinase-related proteins. *Chemistry.* 2018;24: 47–55.
11. Murisier F, Beermann F. Genetics of pigment cells: lessons from the tyrosinase gene family. *Histol Histopathol.* 2006;21:567–578.
12. Budd PS, Jackson IJ. Structure of the mouse tyrosinase-related protein-2/ dopachrome tautomerase (*Tyrp2/Dct*) gene and sequence of two novel slaty alleles. *Genomics.* 1995;29:35–43.
13. Cross SH, Mckie L, Keighren M, et al. Missense mutations in the human nanophthalmos gene *TMEM98* cause retinal defects in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2019;60:2875–2887.
14. Mengel-From J, Wong TH, Morling N, Rees JL, Jackson IJ. Genetic determinants of hair and eye colours in the Scottish and Danish populations. *BMC Genet.* 2009;10:1–13.
15. Manga P, Sheyn D, Yang F, Sarangarajan R, Boissy RE. A role for tyrosinase-related protein 1 in 4-tert-butylphenol-induced toxicity in melanocytes: Implications for vitiligo. *Am J Pathol.* 2006;169:1652–1662.
16. Thomas MG, Kumar A, Mohammad S, et al. Structural grading of foveal hypoplasia using spectral-domain optical coherence tomography: a predictor of visual acuity? *Ophthalmology.* 2011;118:1653–1660.
17. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17:405–424.
18. Guyonneau L, Murisier F, Rossier A, Moulin A, Beermann F. Melanocytes and pigmentation are affected in dopachrome tautomerase knockout mice. *Mol Cell Biol.* 2004;24:3396–3403.
19. Jackson IJ, Chambers DM, Tsukamoto K, et al. A second tyrosinase-related protein, *TRP-2*, maps to and is mutated at the mouse slaty locus. *EMBO J.* 1992;11:527–535.
20. Bedell VM, Westcot SE, Ekker SC. Lessons from morpholino-based screening in zebrafish. *Brief Funct Genomics.* 2011;10:181–188.

21. Rooryck C, Roudaut C, Robine E, Müsebeck J, Arveiler B. Oculocutaneous albinism with TYRP1 gene mutations in a Caucasian patient. *Pigment Cell Res.* 2006;19:239–242.
22. Jaworek TJ, Kausar T, Bell SM, et al. Molecular genetic studies and delineation of the oculocutaneous albinism phenotype in the Pakistani population. *Orphanet J Rare Dis.* 2012;7:44–63.
23. King RA, Mentink MM, Oetting WS. Non-random distribution of missense mutations within the human tyrosinase gene in type I (tyrosinase-related) oculocutaneous albinism. *Mol Biol Med.* 1991;8:19–29.
24. Urtatiz O, Sanabria D, Lattig MC. Oculocutaneous albinism (OCA) in Colombia: first molecular screening of the TYR and OCA2 genes in South America. *J Dermatol Sci.* 2014;76:260–262.
25. Shahzad M, Yousaf S, Waryah YM, et al. Molecular outcomes, clinical consequences, and genetic diagnosis of Oculocutaneous Albinism in Pakistani population. *Sci Rep.* 2017;7:44185. <https://doi.org/10.1038/srep44185>.
26. Yamada M, Sakai K, Hayashi M, et al. Oculocutaneous albinism type 3: a Japanese girl with novel mutations in TYRP1 gene. *J Dermatol Sci.* 2011; 64:217–222.
27. Yokoyama T, Silversides DW, Waymire KG, Kwon BS, Takeuchi T, Overbeek PA. Conserved cysteine to serine mutation in tyrosinase is responsible for the classical albino mutation in laboratory mice. *Nucleic Acids Res.* 1990;18:7293–7298.
28. Jackson IJ, Bennett DC. Identification of the albino mutation of mouse tyrosinase by analysis of an in vitro revertant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:7010–7014.
29. Zdarsky E, Favor J, Jackson IJ. The molecular basis of brown, an old mouse mutation, and of an induced revertant to wild type. *Genetics.* 1990; 126:443–449
30. Raymond SM, Jackson IJ. The retinal pigmented epithelium is required for development and maintenance of the mouse neural retina. *Curr Biol.* 1995;5:1286–1295.
31. Mason C, Guillery R. Conversations with Ray Guillery on albinism: linking Siamese cat visual pathway connectivity to mouse retinal development. *Eur J Neurosci.* 2019;49:913–927.
32. Prieur DS, Rebsam A. Retinal axon guidance at the midline: chiasmatic misrouting and consequences. *Dev Neurobiol.* 2017;77:844–860.
33. Roffler-Tarlov S, Liu JH, Naumova EN, Bernal-Ayala MM, Mason CA. LDopa and the albino riddle: content of L-Dopa in the developing retina of pigmented and albino mice. *PLoS One.* 2013;8:e57184.
34. Lavado A, Jeffery G, Tovar V, De La Villa P, Montoliu L. Ectopic expression of tyrosine hydroxylase in the pigmented epithelium rescues the retinal abnormalities and visual function common in albinos in the absence of melanin. *J Neurochem.* 2006;96:1201–1211.
35. Richardson R, Tracey-White D, Webster A, Moosajee M. The zebrafish eye-a paradigm for investigating human ocular genetics. *Eye.* 2017;31: 68–86.
36. Logan DW, Burn SF, Jackson IJ. Regulation of pigmentation in zebrafish melanophores. *Pigment Cell Res.* 2006;19:206–213.
37. Braasch I, Liedtke D, Volf JN, Schartl M. Pigmentary function and evolution of tyrp1 gene duplicates in fish. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2009;22:839–850.
38. Lamason RL, Mohideen MAPK, Mest JR, et al. Genetics: SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. *Science.* 2005;310:1782–1785.
39. Gross JM, Perkins BD, Amsterdam A, et al. Identification of Zebrafish insertional mutants with defects in visual system development and function. *Genetics.* 2005;170:245–261.
40. Arveiler B, Michaud V, Lasseaux E. Albinism: an underdiagnosed condition. *J Invest Dermatol.* 2020;140:1449–1451.

## Acknowledgements

The authors are grateful to the French Albinism Association Genespoir for financial support and for timeless action in favor of patients with albinism. I.G., L.M., M.K., and I.J.J. were funded by the MRC University Unit award to the MRC Human Genetics Unit, grant number MC\_UU\_00007/4. The authors also thank the patients for participating in this study and Angus Reid for assisting with colorimetric measurements.

## SUPPLEMENTARY INFORMATION

### SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

#### **Sequencing of the candidate genes, bioinformatics analysis.**

DNA samples were quantified using the Qubit™ dsDNA HS Assay Kit on the Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies) and diluted to a final concentration of 10 ng/μL. Amplicons (libraries) were generated with the Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 and then quality-checked and quantified on the 2200 TapeStation (Agilent, U.S.A.). Emulsion PCR and enrichment were performed on the Ion CHEF™ System (Life Technologies) using the Ion 520/530 Kit Chef. Two Ion 530 chips (Life Technologies), each containing 24 patients, were sequenced per run. Pathogenicity of single nucleotide variants was evaluated using bioinformatics tools Cartagenia BenchLab NGS (Agilent Technologies) and Alamut Visual (Interactive BioSoftware, Rouen, France) based on criteria including allele frequency (gnomAD <http://gnomad.broadinstitute.org>, ESP [evs.gs.washington.edu/EVS](http://evs.gs.washington.edu/EVS), dbSNP [www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP)), description in database (HGMD Professional [www.biobase-international.com/product/hgmd](http://www.biobase-international.com/product/hgmd)), conservation, pathogenicity prediction algorithms (Polyphen [genetics.bwh.harvard.edu/pph2](http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2), SIFT [sift.bii.a-star.edu.sg](http://sift.bii.a-star.edu.sg), Mutation Taster [www.mutationtaster.org](http://www.mutationtaster.org), GVDG [agvgd.iarc.fr](http://agvgd.iarc.fr)) and effect on splicing (SSF [www.genet.sickkids.on.ca/~ali/splicesitefinder.html](http://www.genet.sickkids.on.ca/~ali/splicesitefinder.html), HSF [www.umd.be/HSF3](http://www.umd.be/HSF3), MaxEntScan [genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan\\_scoreseq.htm](http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.htm), NNSplice [www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html), GeneSplicer [ccb.jhu.edu/software/genesplicer](http://ccb.jhu.edu/software/genesplicer)).

*DCT* variants (NM\_001129889.2) found by NGS were confirmed by Sanger sequencing (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems®, ThermoFischer Scientific) on a 3500xL Dx Sequencer (Life Technologies, ThermoFischer Scientific) using primers AGGAGAAAAGTACGACAGAGACA and TCCGACCAAACCATCATTG (exon 1) and ACAGTCAGGTTGGTGTGATC and TCAGCTCATTAGTCCCTTTCTGA (exon 9).

#### **CRISPR modelling of *Dct* variants in the mouse.**

*Mouse lines:* To create the *Dct*118 A/A, *Dct*183 G/G and *Dct* -/- alleles the CRISPR design site <https://chopchop.cbu.uib.no/> (in the public domain) was used to design guides with default settings (g1 for *Dct*118 A/A : CTTGGATGGCGTGCTGAACAAGG ; g2 for *Dct*183 G/G and *Dct* -/- : GTGGATTTCTAGAGGGCAGGGGG). Guides were *in vitro* transcribed using GeneArt Precision gRNA kit (Invitrogen, A29377). Guide RNAs along with GeneArt Platinum Cas9 Nuclease (Invitrogen, B25641) and repair single stranded oligo DCT118 or DCT183 (DCT118:

GGTTGTCTGGGCTGCGGAATTCTGCTCAGAGCTCGGGCTCAGTTTCCCCGAGTCT  
GCATGACCTTGGATGGCGTGCTGAACAAAGAAAGCTGCCCGCCTCTGGGTCCCGA  
GGCAACCAACATCTGTGGATTTCTAGAGGGCAGGGGGCAGTGCGCAGAGGTGCA  
AACAGACACCAGACCCTGGAGTGGCCCTTATATCCT; DCT183:

CAGTTTCCCCGAGTCTGCATGACCTTGGATGGCGTGCTGAACAAGGAATGCTGCC  
CGCCTCTGGGTCCCGAGGCAACCAACATCTGTGGATTTCTAGAGGGCAGGGGACA  
GTGGGCAGAGGTGCAAACAGACACCAGACCCTGGAGTGGCCCTTATATCCTTCGA  
AACCAGGATGACCGTGAGCAATGGCCGAGAAAATT, synthesized by IDT), was used for pronuclear injection into C57BL/6J zygotes. The injected eggs were cultured overnight to the two-cell stage and then transferred into pseudopregnant females. Pups were screened for the mutations by sequencing PCR fragments generated using primers *Dct*1\_F and *Dct*1\_R (*Dct*\_1\_F GCCAGGCCTCCCAATTAAGA and *Dct*\_1\_R GCCCTCACCTGTGCATTG) and lines established carrying the targeted missense mutations and one 5 nucleotide deletion,

resulting in frameshift. Genotyping was done by PCR, and then Sanger sequencing, using primers Dct1\_F and Dct1\_R. All lines were maintained on the C57BL/6J mouse strain background.

*Direct spectrophotometry of Dct mice:* Coat colour of live mice, aged between 1 and 2 months, was measured by direct spectrophotometry using Konica Minolta CM-2600d. Measurement of mouse's dorsal coat colour was carried out in triplicate and the mean values of these measurements were plotted onto a 3D graph of CIELAB colour space using Rstudio with plot3D package.

*Eye histology:* Mice were sacrificed by cervical dislocation and eyes enucleated and placed into Davidson's fixative (28.5% ethanol, 2.2% neutral buffered formalin, 11% glacial acetic acid) for overnight. Prior to wax embedding, eyes were dehydrated through an ethanol series. Hematoxylin and eosin staining was performed on 5- or 10- $\mu$ m paraffin-embedded tissue sections and images captured using a Nanozoomer XR scanner (Hamamatsu, Hamamatsu City, Japan) and viewed using NDP.view2 software (Hamamatsu).

#### ***dct* knock-down in *Danio rerio*.**

*dct* targeting: Zebrafish (*D. rerio*) were produced in our facilities, in accordance with the French Directive (Ministère de l'Agriculture) and in conformity with the European Communities Council Directive (2010/63/EU). The zebrafish homolog of human *DCT* was identified by searching in the genome sequence database at [http://www.ensembl.org/Danio\\_rerio](http://www.ensembl.org/Danio_rerio) taking in account the synteny with the human genome. Morpholinos (MO) were designed by and obtained from GeneTools, LLC. A specific MO to *dct* gene, MO-DCT, was designed as complementary to the sequence flanking the translation initiation codon of *dct* (5'-GCGCTT[CAT]TTCTGCGAAAACACAG-3', brackets indicate the initiation codon complementary sequence). Standard control MO from Gene Tools LLC (5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3') was used as negative control. MOs were injected at the 1-2 cells stage with 1.5ng/embryo. Embryos were then incubated at 28°C. Embryos were

imaged under a stereomicroscope. Length and left eye area were measured using ImageJ software.

*Melanin assay:* Ten embryos at 48 hpf stage were transferred in Tris pH=7.5 50mM, EDTA pH=8 2mM, NaCl 1mM, Triton X-100 1% and incubated 5 min at 4°C for lysis. Lysates were centrifuged for 10 min, 14000 rpm, 4°C. Supernatants were processed for classical protein assay. Pellets were dissolved in 1N NaOH. Standard solutions of melanin and samples were heated at 100°C for 10 min and processed for melanin assay by absorbance determination at 490 nm. Melanin content was normalized to protein content.

*Histological analysis:* Zebrafish embryos were fixed with 4% PFA in PBS at 4 °C overnight, embedded in paraplast and sectioned at 10 µm. After rehydration, sections were stained with toluidine blue 0.2% for 1 min and mounted in Eukitt mounting medium.

**Supplementary Table 1: Candidate genes tested in this study.**

<b>GENE</b>	<b>PROTEIN</b>	<b>MOUSE MUTANT</b>
<i>AP1B1</i>	Adaptor Protein 1 complex subunit beta-1	
<i>AP1G1</i>	Adaptor Protein 1 complex subunit gamma-1	
<i>AP1G2</i>	Adaptor Protein 1 complex subunit gamma-2	
<i>AP1M1</i>	Adaptor Protein 1 complex subunit mu-1	
<i>AP1M2</i>	Adaptor Protein 1 complex subunit mu-2	
<i>AP1S2</i>	Adaptor Protein 1 complex subunit sigma-2	
<i>AP1S3</i>	Adaptor Protein 1 complex subunit sigma-3	
<i>AP3B2</i>	Adaptor Protein 3 complex subunit beta-2	
<i>AP3M1</i>	Adaptor Protein 3 complex subunit mu-1	
<i>AP3M2</i>	Adaptor Protein 3 complex subunit mu-2	
<i>AP3S1</i>	Adaptor Protein 3 complex subunit sigma-1	
<i>AP3S2</i>	Adaptor Protein 3 complex subunit sigma-2	
<i>ATP7A</i>	ATPase copper transporting alpha	<i>mottled</i>
<i>BLOC1S1</i>	Biogenesis of lysosome-related organelles complex subunit 1	
<i>BLOC1S4</i>	Biogenesis of lysosome-related organelles complex subunit 4	<i>cappuccino</i>
<i>BLOC1S5<sup>a</sup></i>	Biogenesis of lysosome-related organelles complex subunit 5	<i>muted</i>
<i>DCT</i>	Dopachrome tautomerase	<i>slaty</i>
<i>DOCK7</i>	Dedicator of cytokinesis 7	<i>misty</i>
<i>FIG4</i>	Phosphoinositide 5-Phosphatase	<i>pale tremor</i>
<i>KIF13A</i>	Kinesin Family Member 13A	
<i>PMEL</i>	Premelanosome Protein	<i>silver</i>
<i>RAB38</i>	Ras-related protein RAB38	<i>chocolate</i>
<i>RAB27A</i>	Ras-related protein RAB27A	<i>ashen</i>
<i>RABGGTA</i>	Rab geranyl geranyl transferase	<i>gunmetal</i>
<i>SLC7A11</i>	Solute carrier family member 11	<i>subtle gray</i>
<i>VPS33A</i>	Vacuolar protein sorting-associated protein 33A	<i>buff</i>

<sup>a</sup> Analysis of our cohort of patients identified pathogenic variants in *BLOC1S5* in two unrelated patients. Pennamen et al. *BLOC1S5* Pathogenic Variants Cause a New Type of Hermansky-Pudlak Syndrome. Genet Med. 2020 Jun 22. doi: 10.1038/s41436-020-0867-5.

### III. COMMENTAIRES SUR LES ARTICLES

#### III.1 Article 1

Dans cet article qui rapporte deux patientes non apparentées et leurs variants du gène *BLOCIS5*, nous avons démontré que des variants homozygotes du gène *BLOCIS5*, entraînant *a priori* une perte de fonction (une délétion de deux exons avec conservation du cadre de lecture et une délétion d'une paire de bases entraînant un décalage du cadre de lecture et un codon stop prématuré), étaient effectivement responsable d'une déstabilisation du complexe BLOC-1 et donc du phénotype d'HPS de ces patientes. Des démonstrations similaires avaient été faites pour d'autres sous-unités du complexe BLOC-1, dont des variants perte de fonctions des deux allèles entraînent un HPS chez l'humain et la souris. (40,41,140,141)

Chez la première patiente, un algorithme maison, élaboré au laboratoire, a permis rapidement, l'identification, sur les données de NGS, d'une délétion homozygote de deux exons du gène *BLOCIS5*, en montrant l'absence totale de couverture de deux amplicons. J'ai vérifié la présence de la délétion homozygote par PCR simple des deux exons délétés et des deux exons flanquants les plus proches (Fig.1b) J'ai réalisé une PCR quantitative de ces mêmes exons, chez la patiente et ses parents, confirmant la délétion et la ségrégation parentale, chaque parent étant bien porteur hétérozygote. Enfin, grâce à la CGH Array, à l'aide d'une puce ciblée de *design* à façon, chez la patiente et ses parents, les points de cassures de la délétion ont été précisés avec une zone d'incertitude de 537pb en amont et 644pb en aval (Fig.1a et Fig.S1A). Cela m'a permis de choisir des amorces de PCR et de réaliser le séquençage Sanger pour caractériser finement le point de cassure dans cette zone d'incertitude. Étonnamment, nous n'avons pas pu caractériser un point de cassure à la base près, car il existe dans les introns 2 et 4, de part et d'autre de la région délétée, une région d'homologie de 291 pb dont une partie de 57 bases parfaitement identique et une partie de 234 pb homologue à 90% (Fig.1a et Fig.S1B et C). L'hypothèse alors établie est la survenue d'une recombinaison homologue non-allélique (NAHR, *Non-Allelic Homologous Recombination*). Ce type de réarrangement est bien connu et impliqué dans de nombreux syndromes microdélétionnels ou microduplicationnels récurrents. (142)

L'identification de ce variant *a priori* perte de fonction dans un excellent gène candidat pour l'HPS a conduit à revenir vers le clinicien et la patiente, qui ne rapportait spontanément aucun signe de diathèse hémorragique. Un interrogatoire orienté a mis en évidence des signes de saignements excessifs très modérés et des analyses plaquettaires poussées par un laboratoire

spécialisé ont confirmé la présence d'un déficit d'agrégation plaquettaire lié à un déficit en granules denses plaquettaires.

Afin de démontrer la pathogénicité du variant chez cette patiente nous avons procédé à l'analyse des protéines du lysat plaquettaire (Fig. 3) et observé une diminution voire absence de détection de deux sous-unités de BLOC-1 (Pallidin et Dysbindin). En l'absence d'Anticorps spécifique de BLOC1S5 nous n'avons cependant pas pu confirmer directement l'absence de BLOC1S5. L'absence de Pallidin et Dysbindin est néanmoins un signe de déstabilisation de BLOC-1, observé lors d'un défaut de l'une ou l'autre des sous-unités. (39,143,144) Afin de conforter ces observations nous avons collaboré avec l'équipe du Pr Michael Marks (Philadelphie) qui avait déjà travaillé sur le complexe BLOC-1 et BLOC1S5/muted. (40) Nous avons pu obtenir de l'ARN issu de sang total de la première patiente et ainsi réaliser des RT-PCR du transcrite majoritaire de *BLOC1S5* entier (NM\_201280.2), conduisant à l'identification chez la patiente d'un transcrite de taille inférieure au transcrite canonique (NM\_201280.2) et correspondant à la perte des deux exons (BLOC1S5-del1, Fig. 1c). Le séquençage des bandes observées sur le gel d'électrophorèse de la RT-PCR de *BLOC1S5* pour la patiente a confirmé la délétion des deux exons conservant le cadre de lecture et mis en évidence également un transcrite additionnel avec cette fois un décalage du cadre de lecture (BLOC1S5-del2, Fig.1d). La même analyse chez un témoin a détecté la présence du transcrite entier NM\_201280.2 (BLOC1S5-202) et un transcrite alternatif connu NM\_001199323 (BLOC1S5-205) (Fig.1d). Ces différents transcrits ont été clonés dans des plasmides puis dans des vecteurs d'expressions pour être exprimés dans des cellules modèles de l'équipe du Pr Marks dont l'expertise ainsi que la disponibilité des outils et cellules adéquates a permis rapidement de réaliser des études fonctionnelles sur un modèle cellulaire éprouvé. (40) Dans des mélanocytes murin KO pour *Bloc1s5* (nommés melan-mu), ne produisant pas de pigment contrairement à des mélanocytes témoins (melan\_lnk4) (Fig. 4 a et b), l'expression du transcrite humain sauvage (HA-BLOC1S5) restaure la production de pigment (Fig 4c) tout comme le transcrite sauvage issu du clonage d'un ARN de témoin fourni par notre équipe (HA-BLOC1S5-202, Fig.4c). En revanche la restauration de la pigmentation n'a pas lieu lorsqu'on exprime les transcrits clonés à partir de l'ADNc de la patiente (HA-BLOC1S5-del1 et HA-BLOC1S5-del2), le transcrite alternatif NM\_001199323 (HA-BLOC1S5-205) ou encore un transcrite de BLOC1S6 (Fig.4d-g). Le contenu en mélanine des lysats de ces cellules évalué par spectrophotométrie (Fig.4i) confirme les observations en microscopie à lumière transmise (Fig.4a-h). L'expression des transcrits dans les cellules a été confirmée par RT-PCR ciblant le gène de résistance à l'hygromycine inclus dans le vecteur rétroviral utilisé (Fig.4j). L'expression protéique analysée par immuno-blot montre l'absence de protéines dans les cellules transfectées avec les transcrits HA-BLOC1S5-del1, HA-

BLOC1S5-del2 et HA-BLOC1S5-205, comparés aux cellules transfectées avec un transcrite sauvage (HA-BLOC1S5 et HA-BLOC1S5-202) et confirme la diminution ou l'absence des sous-unités de BLOC-1, Pallidin et Dysbindin et donc la déstabilisation du complexe BLOC-1 (Fig.4k). Une fonction de BLOC-1 est le transfert de certaines protéines de la pigmentation comme TYRP1 aux mélanosomes. Dans les cellules citées précédemment la localisation de TYRP1 a été étudiée et comparée à la localisation des granules pigmentés vues en lumière transmise et d'un marqueur des endosomes précoces, le récepteur de la Transferrine (TfR). Dans les cellules sauvages melan-lk4a, TYRP1 est localisée en regard des granules pigmentées (Fig.5a). Dans les cellules melan-mu, TYRP1 est délocalisé et observé au niveau des endosomes précoces (Fig.5b), la localisation de TYRP1 au niveau des granules pigmentés est restaurée dans les cellules exprimant le transcrite humain sauvage (Fig.5c et h) mais pas dans les cellules transfectées avec HA-BLOC1S6, HA-BLOC1S5-del1, HA-BLOC1S5-del2 ou HA-BLOC1S5-205 (Fig.5d-g). L'aire de superposition de TYRP1 et TfR calculée confirme la significativité de ces observations (Fig.5i).

Lors de la rédaction de l'article nous avons poursuivi les analyses génétiques ce qui a permis d'identifier la deuxième patiente, porteuse d'un autre variant homozygote de *BLOC1S5*, une délétion d'une paire de bases, *a priori* responsable d'une perte de fonction également, et présentant elle un phénotype bien plus caractéristique d'un HPS avec une diathèse hémorragique et un défaut d'agrégation plaquettaire préalablement confirmés. Les analyses fonctionnelles pour ce variant n'ont pas été réalisées en raison de sa découverte tardive au moment de la soumission de l'article et de la pathogénicité attendue de son variant.

Ce travail a donc permis d'identifier et de confirmer que des variants perte de fonction dans le gène *BLOC1S5* sont responsables chez l'humain d'un HPS modéré, forme que nous avons proposé de nommer HPS-11.

### III.2 Article 2

Dans ce second article, nous avons démontré que des variants du gène *DCT* (*DopaChrome Tautomerase*) également nommé *TYRP2*, sont responsables d'un albinisme oculocutané modéré chez deux patientes non apparentées. Ces deux patientes, l'une d'origine caucasienne et l'autre nord-africaine, présentent un phénotype d'AOC non syndromique très modéré (Fig.1 a-f). Notre étude a permis d'identifier 3 variants différents et rares de *DCT*, une délétion de 14 paires de bases dans l'exon 9, NM\_001129889.2 :c.1406\_1419del p.(Phe469\*), entraînant un décalage du cadre de lecture et, de ce fait, probablement une perte de fonction, ainsi que deux faux-sens

différents, situés à proximité dans l'exon 1, c.118T>A p.(Cys40Ser) et c.183C>G p.(Cys61Trp). La présence des variants a été vérifiée par séquençage Sanger et la ségrégation parentale a confirmé la présence de la délétion de 14pb hétérozygote chez la mère de la 1<sup>ère</sup> patiente tandis que le père est porteur du variant faux-sens p.(Cys40Ser) (Fig.1g). La 2<sup>ème</sup> patiente est malheureusement perdue de vue et aucune information supplémentaire ni prélèvement des parents n'est disponible. De plus, son père serait décédé mais une notion de consanguinité n'a été notée par le clinicien, ce qui est en accord avec la présence d'un variant rare homozygote p.(Cys61Trp) (Fig.1h). La présence d'une délétion hétérozygote de l'exon 1 en *trans* de ce variant a été éliminée chez cette patiente en réalisant une CGH Array ciblée sur *DCT*.

Depuis de nombreuses années, *DCT* est un excellent candidat pour l'albinisme humain sans que jusqu'ici cela ait pu être démontré.

Le gène *DCT* code une enzyme qui participe à la voie de synthèse des mélanines. (56) Il appartient à la famille des protéines liées à Tyrosinase (OCA1), à l'instar de TYRP1 dont les variants perte de fonctions sont responsables de l'OCA3. (78) Des variants de *Dct* sont responsables d'une hypopigmentation modérée chez le modèle murin *Slaty*. (145)

Les deux faux-sens rares identifiés chez nos patientes sont localisés dans un domaine riche en cystéines, très conservé dans les espèces, jusqu'au poisson Zèbre, et modifiant tous deux une cystéine très conservée. Les domaines riches en cystéines sont observés dans TYR et TYRP1, qui, avec *DCT*, partagent une similitude de séquence protéique (Fig.2). Ces cystéines contribuent aux ponts disulfures qui contribuent à la structure tridimensionnelle de ces protéines. (58) Les substitutions de ces cystéines sont donc probablement à l'origine de changements structuraux responsables de dysfonctionnement. Nous avons d'ailleurs noté la présence de variants responsables d'OCA1 dans toutes les cystéines conservées de TYR, et un variant responsable d'OCA3 dans la 1<sup>ère</sup> cystéine de TYRP1, impliquée dans le 1<sup>er</sup> pont disulfure tout comme la Cystéine 40 de *DCT*, substituée chez notre première patiente. (Table 1).

Ne disposant pas de matériel biologique autre que l'ADN issu de sang total pour ces deux patientes, nous avons dû réaliser des analyses fonctionnelles pour attester de la pathogénicité des variants. Nous nous sommes tournés vers l'équipe du Pr I. Jackson qui a décrit initialement les variants de *Dct* chez la souris *Slaty* pour obtenir des cultures de mélanocytes de souris avec variants homozygotes de *Dct*. (115) Finalement, notre collaboration s'est étendue grâce à son expertise avec les éditions génomiques par CrispR-Cas9 et nous avons décidé d'introduire les variants faux-sens de nos patientes sur les cystéines du gène homologue de la souris puisque

celles-ci y sont conservées (Fig.2). Cela a permis de montrer que la modification de ces deux cystéines entraîne une hypopigmentation du pelage de la souris (Fig.3a), très modérée mais objectivable par analyse spectrophotométrique (Fig.3b). De plus, nous avons également mis en évidence une atteinte oculaire chez la souris, avec une hypopigmentation du RPE (Fig.3c).

En parallèle, nous avons étudié le modèle poisson-zèbre *D. rerio*, dont l'atteinte de l'unique gène homologue *dct* n'était pas encore décrite dans la littérature. Nous avons réalisé une expérience de *knock-down*, par injection dans des embryons de poisson zèbre *D. rerio*, d'un ARN anti-sens, ou morpholino, de *dct* (MO-*dct*), comparé à l'injection d'un morpholino-contrôle (MO-ctrl). Nous avons observé, chez les embryons MO-*dct*, une hypopigmentation modérée des mélanophores et du RPE (Fig.4a et c), qui semble également présenter un aspect histologique différent des embryons MO-ctrl (Fig.4a). L'hypopigmentation a été objectivée par quantification de la mélanine d'embryons totaux à 48h post-fécondation (Fig.4b) montrant une baisse d'environ 30% de mélanine totale chez les MO-*dct* par rapport aux MO-ctrl. Nous avons également observé une réduction significative de la taille de l'œil chez les embryons MO-*dct* comparés au MO-ctrl, non corrélée à une diminution de longueur totale de l'embryon (Fig.4d). Cette atteinte de la taille de l'œil pourrait être liée à une toxicité du MO-*dct*. Cependant, un autre indicateur de la toxicité, la forme et la croissance globale des embryons, n'est pas différent des MO-ctrl, ce qui pourrait signifier un effet spécifique de la perte de fonction de DCT lors du développement oculaire.

Nous avons donc conclu que les variants perte de fonction de *DCT* sont responsables d'une nouvelle forme d'albinisme oculocutané modéré chez l'humain, forme que nous avons proposé de nommer OCA8.

## IV. AUTRES RESULTATS

### IV.1 Nouveaux variants du gène *BLOC1S3*

L'article ci-après décrit 3 patients et leurs variants homozygotes *a priori* perte de fonction dans le gène *BLOC1S3*, associé à l'HPS-8.

S'agissant d'une forme très rare d'HPS, avec, à l'époque, seulement deux articles rapportant deux variants et 7 patients (dont 6 d'une même famille) (140,146), nous avons jugé intéressant de rapporter les caractéristiques phénotypiques détaillées de ces 3 patients adressés au laboratoire.

Initialement, deux patients présentant le même variant très rare du gène *BLOC1S3*, une délétion de 24 pb, homozygote chez l'un (Patient F2.II.I) et hétérozygote chez l'autre, ont été identifiés. Ces deux patients étant d'origine portugaise, il a été évoqué un variant récurrent lié à un effet fondateur au Portugal. Après analyse par séquençage Sanger, aucun autre variant délétère dans la séquence codante de *BLOC1S3* n'a pu être détecté chez la patiente hétérozygote pour la délétion, qui n'a donc pas pu être intégrée à notre article et qui est restée non résolue à ce jour. Puis un nouveau patient a été adressé au laboratoire (Patient F1.II.8), par une équipe d'hématologie car il avait présenté un lymphome de Hodgkin à prédominance lymphocytaire dans un contexte d'AOC familial, une forme rare de lymphome de Hodgkin, mais rapportée chez des patients avec HPS-2. (44) Ce patient est issu d'une fratrie de 9, et un de ses frères atteint d'AOC a pu être testé et la présence de ce même variant à l'état homozygote a été confirmée.

Alors que l'article était quasiment finalisé, un troisième patient, d'origine brésilienne, a été ajouté à ce travail.

Ces trois patients ont permis de conforter les constatations faites chez les patients déjà rapportés dans la littérature avec HPS-8, et sont en accord avec les observations chez les patients atteints d'HPS par atteinte des sous-unités du complexe BLOC-1 (HPS-7, 9 et maintenant 11). (30,41,140,146–148) Les atteintes de BLOC-1 sont donc chez l'humain, comme chez les modèles murins, associés à une atteinte modérée et *a priori* sans les symptômes digestifs et respiratoires observés dans les HPS liés à BLOC-3, bien que les patients soient encore tous très jeunes.

## Novel variants in the *BLOC1S3* gene in patients presenting a mild form of Hermansky-Pudlak Syndrome.

*Pigment Cell & Melanoma Research*, Volume 34, Issue 1, Pages 132-135 – Published : January 2021. PMID: 32687635, DOI: 10.1111/pcmr.12915

### Authors and affiliations

Perrine Pennamen<sup>1,2</sup>, Angèle Tingaud-Sequeira<sup>1</sup>, Vincent Michaud<sup>1,2</sup>, Fanny Morice-Picard<sup>3</sup>, Claudio Plaisant<sup>2</sup>, Catherine Vincent-Delorme<sup>4</sup>, Fabienne Giuliano<sup>5</sup>, Saba Azarnoush<sup>6</sup>, Yline Capri<sup>7</sup>, Carolina Marçon<sup>8</sup>, Didier Lacombe<sup>1,2</sup>, Eulalie Lasseaux<sup>2</sup>, Benoît Arveiler<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Univ. Bordeaux, Maladies Rares: Génétique et Métabolisme (MRGM), INSERM U1211, F-33000, Bordeaux, France.

<sup>2</sup> CHU Bordeaux, Department of Medical Genetics, F-33000 Bordeaux, France

<sup>3</sup> Univ. Bordeaux, INSERM 1035, BMGIC, Immuno-dermatology ATIP-AVENIR, F-33000, Bordeaux, France, CHU Bordeaux, Pediatric Dermatology Unit, National Reference Center for Rare Skin Disorders, F-33000 Bordeaux, France

<sup>4</sup> Department of Clinical Genetics, CHU Lille, Lille, France.

<sup>5</sup> Unit of Medical Genetics, University Hospital of Nice, L'Archet 2 Hospital, 151 Route Saint-Antoine de Ginestière BP 3079, 06202 Nice Cedex 3, France.

<sup>6</sup> Clinical department of Immuno-hematology, CHU Robert Debré, Paris University, France

<sup>7</sup> Service de génétique médicale, AP-HP Robert-Debré, Paris, France

<sup>8</sup> Santa Casa de Misericórdia, Setor de Dermatologia, Sao Paulo, Brazil

### Résumé

Le syndrome d'Hermansky-Pudlak (HPS) associe albinisme oculocutané et des atteintes systémiques incluant déficit en granules denses plaquettaires entraînant une diathèse hémorragique, et, selon la forme, fibrose pulmonaire, déficit immunitaire et/ou colite granulomateuse. A ce jour, 11 formes d'HPS autosomiques récessives causées par des variants de 11 gènes différents ont été rapportées.

Nous décrivons trois familles consanguines avec HPS-8 et différents variants homozygotes de *BLOC1S3* (NM\_212550.3), dont l'un est inédit. Ils comprennent deux délétions entraînant un décalage du cadre de lecture (c.385\_403del, c.338\_341del), et une délétion en phase (c.444\_467del). Tous les patients ont un albinisme oculocutané modéré et une diathèse hémorragique, sans autre atteinte du HPS rapportée. Un patient HPS-8 a été atteint d'un

lymphome de Hodgkin à prédominance lymphocytaire. La sévérité modérée de l'HPS-8 est en accord avec la description clinique des autres HPS liés aux variants des gènes codant les sous-unités du complexe BLOC-1 (HPS-7 et *DTNBPI*, HPS-9 et *BLOCIS6*, HPS-11 et *BLOCIS5*).

### Abstract

Hermansky-Pudlak syndrome (HPS) associates oculocutaneous albinism and systemic affections including platelet dense granules anomalies leading to bleeding diathesis and, depending on the form, pulmonary fibrosis, immunodeficiency and/or granulomatous colitis. So far 11 forms of autosomal recessive HPS caused by pathogenic variants in 11 different genes have been reported.

We describe three HPS-8 consanguineous families with different homozygous pathogenic variants in *BLOCIS3* (NM\_212550.3), one of which is novel. These comprise two deletions leading to a reading frameshift (c.385\_403del, c.338\_341del) and one in frame deletion (c.444\_467del). All patients have moderate oculocutaneous albinism and bleeding diathesis, but other HPS symptoms are not described. One patient diagnosed with HPS-8 suffered from lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. The mild severity of HPS-8 is consistent with other HPS forms caused by variants in BLOC-1 complex coding genes (HPS-7, *DTNBPI*; HPS-9, *BLOCIS6* ; HPS-11, *BLOCIS5*).

**Keywords:** Albinism, Hermansky-Pudlak Syndrome, HPS-8, *BLOCIS3*, platelet dense granule deficiency

### Main Text

Hermansky-Pudlak Syndrome (HPS) was first described in 1959 in two patients with oculocutaneous albinism (OCA), prolonged bleeding and pigmented macrophages in the bone marrow. To date, 11 HPS sub-types are reported and associated with 11 causative genes (Huizing et al., 2020; Pennamen et al., 2020). HPS genes encode subunits of BLOC complexes (Biogenesis of Lysosome-related Organelle Complexes), and pathogenic variants of these genes induce abnormal biogenesis of lysosome-like organelles, such as melanosomes and platelet-dense granules. HPS-8 was first described in a consanguineous family where several affected members carried the homozygous *BLOCIS3* variant c.448delC p.(Gln150Argfs\*75) (Morgan et al., 2006). Later, the homozygous variant c.131C>A p.(Ser44Ter) was identified in one patient born to related parents (Cullinane et al., 2012). Clinical features of all patients are summarized in Table 1.

In the present study, patients were referred to our laboratory for syndromic or non-syndromic OCA molecular diagnosis. Molecular studies were approved by the institutional review board of the University Hospital of Bordeaux (Comité de Protection des Personnes Sud Ouest et Outre Mer III). Informed consent was obtained from all patients to perform genetic analyses.

Among a cohort of more than 1500 patients molecularly tested for the first 19 known genes of albinism, three patients presented different homozygous variants in the *BLOC1S3* gene. Two out of three variants were reported by Lasseaux et al. (2018), but detailed clinical data were not described.

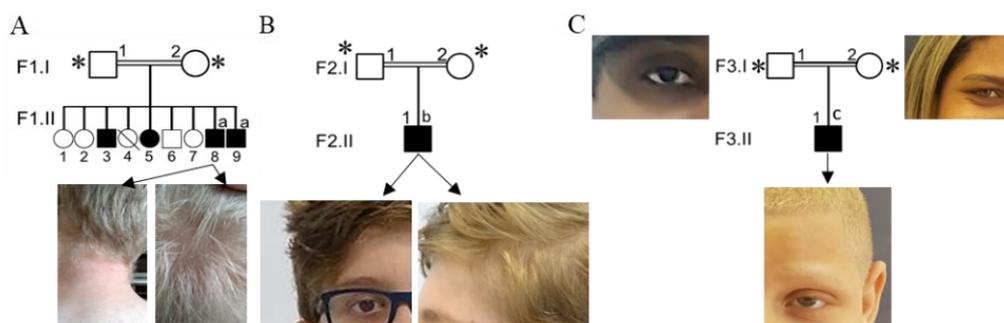
For all three patients, genomic DNA extracted from peripheral blood leukocytes was analyzed using a targeted next-generation sequencing (NGS) panel including the first 19 albinism genes, as previously described (Lasseaux et al., 2018). The presence of all variants and parental segregation were confirmed by Sanger sequencing using the forward and reverse primers 5'-AGGAGCTGTACCTGGGTCCT-3' and 5'-AGCCACGATGTCCAGACG-3' that allowed amplification of the unique coding exon of *BLOC1S3*. The amplification reactions were carried out using Taq Gold DNA Polymerase following the manufacturer's instructions (ThermoFisher). Due to the high GC content (77%), amplification was improved by the addition of 8% DMSO and 4mM betaine.

**Patient F1.II.8.** This young male patient originating from North Africa was born to second degree related parents, both with white skin and brown hair. Like three siblings among nine, he presented with ophthalmological signs of albinism including congenital nystagmus, and a visual acuity around 20/200 (Snellen) (see clinical features in Table 1). At 15 years, he had light pink skin, pale blond hair and blue eyes. He suffered from recurrent otitis causing hearing impairment and from excessive post-surgical bleeding. He presented with lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma, with cervical involvement as already described in three HPS2 patients (Lorenzi et al., 2013). The neck lymph node dissection was hemorrhagic. The patient received a chemotherapy-based treatment (3 cycles of cyclophosphamide, steroids and vincristine) with good tolerance and complete remission for at least 2.5 years. Genomic DNA extracted from peripheral blood leukocytes was analyzed using a targeted next-generation sequencing (NGS) panel including the 19 albinism genes, as previously described (Lasseaux et al., 2018). A homozygous 19bp frameshift deletion in *BLOC1S3* NM\_212550.3:c.385\_403del p.(Ser129Glnfs\*90) was identified, absent from GnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>) and EVS (<https://evs.gs.washington.edu/EVS/>) databases (ACMG Classification : pathogenic

variant (PVS1, PM2, PP1, PP4)) (Richards et al., 2015). Platelet aggregation tests showed low aggregation due to platelet dense granule deficit. Parental segregation was confirmed by Sanger sequencing. An affected brother (F1.II.9) was found to carry the same homozygous deletion (Figure 1A,B). This variant was reported by Lasseaux et al. (2018). The variant is reported in ClinVar (SCV001192837).

**Patient F2.II.1.** This male patient was born to related parents from Portuguese descent, both with brown hair. Ocular albinism was suspected due to ocular amblyopia, visual acuity of 20/50 (Snellen), bilateral iris transillumination and foveolar shaking on the Optical Coherence Tomography (OCT). His hair was golden and his eyes pale brown. He showed no sign of excessive bleeding although platelet aggregation was low (Table 1). NGS analysis identified a homozygous 24bp in frame deletion in BLOC1S3, NM\_212550.3:c.444\_467del p.(Gln150\_Ala157del) (ACMG Classification: likely pathogenic (PM2, PM4, PP3, PP4)). This deletion is reported once, at heterozygous state, in GnomAD, absent from EVS. It involves two highly conserved amino acids, Leu146 and Gln150 within a domain of unknown function (Figure1.C,D). This variant was reported by Lasseaux et al. (2018). The variant is reported in ClinVar (SCV001192838).

**Patient F3.II.1.** This male patient was born to related parents from Brazil who both have brown hair and brown skin. He was born with white hair and white skin and at 10 years of age had blond hair, creamy skin and blue eyes. He presented with congenital nystagmus and low visual acuity among other signs (Table 1, Figure 1.E,F)). He described signs of bleeding diathesis but no signs of lung or digestive tract disease or immune defect. NGS found a homozygous 4bp frameshift deletion in BLOC1S3, NM\_212550.3:c.338\_341del p.(Leu113Argfs\*15). This deletion was reported once, at heterozygous state, in the GnomAD database (ACMG Classification: pathogenic variant (PVS1, PM2, PP4)). The variant is reported in ClinVar (SCV001192839).



**Figure 1. Pedigrees and phenotype of HPS-8 Patients**

A. Family1. a= [p.(Ser129Glnfs\*90);p.(Ser129Glnfs\*90)]  
 B. Family2. b= [p.(Gln150\_Ala157del);p.(Gln150\_Ala157del)]  
 C. Family3. c= [p.(Leu113Argfs\*15); p.(Leu113Argfs\*15)]

\*Heterozygous parent

Owing to the small number of patients described so far, it is difficult to draw formal conclusions regarding the HPS-8-associated phenotype. However, HPS-8 seems to be a mild form of HPS (Cullinane et al., 2012; Morgan et al., 2006). In addition to mild hypopigmentation and ocular affections, additional features involve mainly the platelets. All HPS-8 patients have pauci or even asymptomatic low platelet aggregation and low platelet dense granules, as seen in other forms of HPS caused by BLOC-1 deficiency (Bryan et al., 2017; Pennamen et al., 2020). Some patients describe excessive bleeding or bruising, but these symptoms are often not initially reported. Some but not all patients show signs of dysimmunity and patient F1.II.8 suffered from lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. This association was previously described in three HPS2 patients (Lorenzi et al., 2013). None of the HPS-8 patients show signs of pulmonary fibrosis or colitis, but these symptoms can occur at a later age and therefore may have not occurred yet in our young patients.

Moreover, we note that patients from families F1 and F3 have a more severe phenotype (excessive bleeding) than patient F2.II.1. This is probably due to the presence of homozygous frameshift deletions in Families F1 and F3, as it is the case in the previously reported patients, carrying truncating variants (Cullinane et al., 2012; Morgan et al., 2006), compared to the in frame deletion identified in Family F2.

In conclusion we describe three patients with clinically and molecularly diagnosed HPS-8, bringing the total of reported families to 5 and increasing the molecular knowledge on HPS-8. HPS-8 stands out as a mild form of syndromic OCA characterized by a platelet dysfunction inconstantly associated with excessive bleeding and bruising. This molecular diagnosis helps to organize the patients' follow-up and to prevent undesirable side effect such as post-surgical bleeding, and allows genetic counseling.

### **Acknowledgments**

The authors are grateful to the patients for their participation in this study, and to the French Albinism Association Genespoir for their financial support.

### **Conflict of Interest statement**

The authors declare no conflicts of interest.

## References

- Bryan, M. M., Tolman, N. J., Simon, K. L., Huizing, M., Hufnagel, R. B., Brooks, B. P., Speransky, V., Mullikin, J. C., Gahl, W. A., Malicdan, M. C. V., & Gochuico, B. R. (2017). Clinical and molecular phenotyping of a child with Hermansky-Pudlak syndrome-7, an uncommon genetic type of HPS. *Molecular Genetics and Metabolism*, 120(4), 378-383. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2017.02.007>
- Cullinane, A. R., Curry, J. A., Golas, G., Pan, J., Carmona-Rivera, C., Hess, R. A., White, J. G., Huizing, M., & Gahl, W. A. (2012). A BLOC-1 mutation screen reveals a novel BLOC1S3 mutation in Hermansky-Pudlak Syndrome type 8. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 25(5), 584-591. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2012.01029.x>
- Huizing, M., Malicdan, M. C. V., Wang, J. A., Pri-Chen, H., Hess, R. A., Fischer, R., O'Brien, K. J., Merideth, M. A., Gahl, W. A., & Gochuico, B. R. (2020). Hermansky-Pudlak syndrome : Mutation update. *Human Mutation*, 41(3), 543-580. <https://doi.org/10.1002/humu.23968>
- Lasseaux, E., Plaisant, C., Michaud, V., Pennamen, P., Trimouille, A., Gaston, L., Monfermé, S., Lacombe, D., Rooryck, C., Morice-Picard, F., & Arveiler, B. (2018). Molecular characterization of a series of 990 index patients with albinism. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 31(4), 466-474. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12688>
- Lorenzi, L., Tabellini, G., Vermi, W., Moratto, D., Porta, F., Notarangelo, L. D., Patrizi, O., Sozzani, S., Basile, G. de S., Latour, S., Pace, D., Lonardi, S., Facchetti, F., Badolato, R., & Parolini, S. (2013). Occurrence of Nodular Lymphocyte-Predominant Hodgkin Lymphoma in Hermansky-Pudlak Type 2 Syndrome Is Associated to Natural Killer and Natural Killer T Cell Defects. *PLOS ONE*, 8(11), e80131. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080131>
- Morgan, N. V., Pasha, S., Johnson, C. A., Ainsworth, J. R., Eady, R. A. J., Dawood, B., McKeown, C., Trembath, R. C., Wilde, J., Watson, S. P., & Maher, E. R. (2006). A Germline Mutation in BLOC1S3/Reduced Pigmentation Causes a Novel Variant of Hermansky-Pudlak Syndrome (HPS8). *The American Journal of Human Genetics*, 78(1), 160-166. <https://doi.org/10.1086/499338>
- Pennamen, P., Le, L., Tingaud-Sequeira, A., Fiore, M., Bauters, A., Van Duong Béatrice, N., Coste, V., Bordet, J.-C., Plaisant, C., Diallo, M., Michaud, V., Trimouille, A., Lacombe, D., Lasseaux, E., Delevoye, C., Picard, F. M., Delobel, B., Marks, M. S., & Arveiler, B. (2020). BLOC1S5 pathogenic variants cause a new type of Hermansky-Pudlak syndrome. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*. <https://doi.org/10.1038/s41436-020-0867-5>
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., Rehm, H. L., & ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants : A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 17(5), 405-424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>

**Table 1. Clinical features of HPS-8 patients described in the present study and from the literature.**

	<b>F1.II.8</b> <b>(Lasseaux et al. 2018)</b>	<b>F2.II.1</b> <b>(Lasseaux et al. 2018)</b>	<b>F3.II.1</b>	<b>Morgan et al. (2006)</b> (6 affected members from one family)	<b>Cullinane et al. (2012)</b>
<b>Variant</b> <b>(NM_212550.3)</b>	c.385_403del p.(Ser129Glnfs*90)	c.444_467del p.(Gln150_Ala157del)	c.338_341del p.(Leu113Argfs*15)	c.448delC p.(Gln150Argfs*75)	c.131C>A p.(Ser44*)
<b>ACMG Classification</b>	Pathogenic (PVS1, PM2, PP1, PP4)	Likely pathogenic (PM2, PM4, PP3, PP4)	Pathogenic (PVS1, PM2, PP4)		
<b>Ethnicity</b>	North Africa	Portuguese	Brazilian		
<b>Age at examination</b>	15 y.o.	12 y.o.	10 y.o.		
<b>Hair color</b>	Blond	Gold	Blond	5/6: Gold/Silver	Brown: lighter than family members
<b>Skin color</b>	Light pink	Pale	Creamy	6/6: Hypopigmentation	Lighter than family members
<b>Eye color</b>	Blue	Light brown	Blue	6/6: Hazel	Brown
<b>Retinal hypopigmentation</b>	NA	NA	Yes	NA	Yes
<b>Visual impairment</b>	Ph, As, HM	Am	Ph, As, Myo	HM 4/6, As 3/6, Ex 2/6, Es 1/6, Myo 2/6	Ex, St
<b>Low visual acuity</b>	Yes	Yes	Yes	6/6	Yes
<b>Congenital nystagmus</b>	Yes	Yes	Yes	6/6	Yes
<b>Iris transillumination</b>	NA	Yes	NA	5/6	Yes
<b>Foveal hypoplasia</b>	NA	NA	NA	5/6	Yes
<b>Platelet aggregation</b>	Low with collagene	Low with collagene, arachidonic acid	NA	Impaired in 2/2 tested patients	NA
<b>Platelet dense granules</b>	LCD63; LMep	Not tested	NA	Absence in 2/2 tested patients	Absence of delta granules
<b>Blood diathesis</b>	Excessive post-surgical bleeding	Not described	Yes (No details)	3/6: Episodes aof excessive bleeding	Minor gum bleeds, easy bruisability
<b>Others</b>	Hodgkin Lymphoma recurrent otitis	NR	NR	NR	Asthma, allergies

Am : Amblyopia, As : astigmatism, Es : Esotropia, Ex : Exotropia, HM hypermetropia, LCD63 : Low expression of CD63, LMep : low secretion and capture of Mepacrine, Myo : Myopia, NA : Not Available, NR : Not Reported, Ph : Photophobia, St : strabismus, y.o. : years old.

## IV.2 PAX6

Lors de la mise au point du panel de gènes, nous avons décidé d'inclure également quelques gènes impliqués dans des diagnostics différentiels. En effet de nombreux patients sans diagnostic moléculaire présentent des formes pauci-symptomatiques avec peu ou pas d'hypopigmentation cutanéophanéarienne. Parmi ces gènes, le gène *PAX6* a été inclus. Les variants hétérozygotes du gène *PAX6* (PAIRED BOX GENE 6 (OMIM\*607108)) sont responsables de l'aniridie, de transmission autosomique dominante. (149) Il s'agit d'une pathologie avec une certaine variabilité d'expression. Des variants tronquants ont été plutôt associés aux formes avec aniridie tandis que des faux-sens ont été plutôt associés à des formes incomplètes avec hypoplasie fovéolaire et nystagmus sans aniridie. (150) Chez des patients à phototype clair, la présence d'un nystagmus et d'une hypoplasie fovéolaire peut faire évoquer un diagnostic d'albinisme.

Parmi les 230 patients chez qui le panel a été séquencé, 6 patients avec 1 variant hétérozygote de *PAX6* ont été mis en évidence, tous des faux-sens (Tableau 5). Un de ces variants, présent chez deux patients, s'est avéré être un faux-positif après vérification par séquençage Sanger. Un variant était survenu *de novo* et deux hérités d'une mère modérément atteinte. Pour deux variants nous sommes en attente des prélèvements parentaux pour la confirmation.

N° Patient	Exon	cDNA	Protein	Score	Commentaire	Sanger
1	12	c.1154C>T	p.(Pro385Leu)	Classe 3 : VSI	Inconnu et AA peu conservé	ok
2	8	c.622C>T	p.(Arg208Trp)	Classe 5 : Pathogène	Connu HGMD, Phénotype: Aniridie (CM930572)	ok
3	13	c.1207G>T	p.(Val403Phe)	Classe 4 : Probablement Pathogène	Non décrit mais AA conservé et absent des témoins de la base GnomAD	Faux : absent en Sanger
4	7	c.383G>A	p.(Arg128His)	Classe 5 : Pathogène	Connu, associé à un phénotype variable et souvent atypique (Arg128Cys, His et Pro)	Hérité de la mère atteinte
5	7	c.382C>G	p.(Arg128Gly)	Classe 4 : Probablement Pathogène	Non connu mais même AA que plusieurs variants classe 5 (Arg128Cys, His et Pro)	<i>de novo</i>
	13	c.1207G>T	p.V403F	Classe 4 : Probablement Pathogène	Non décrit mais AA conservé et absent des témoins de la base GnomAD	Faux : absent en Sanger
6	6	c.191G>T	p.(Gly64Val)	Classe 5 : Pathogène	Connu HGMD - Phénotype : Cataracte, avec nystagmus (CM991012)	Hérité de la mère atteinte

Tableau 5. Description et interprétation de variants de *PAX6* identifiés chez 6 patients.

Les cliniciens ont été recontactés afin de réévaluer le phénotype de ces patients, dans l'optique de rapporter ces cas et corrélations génotype-phénotype dans un article à venir.

### **IV.3 Mises au point pools parentaux**

Nous avons observé de nombreux variants de signification incertaine voire probablement pathogènes à l'état hétérozygote chez nos patients. Or, nous avons pris comme hypothèse pour notre analyse que les 19 gènes connus dans l'albinisme humain sont de transmission autosomique récessive ou récessive liée à l'X. (114) Nous avons donc sélectionné en première intention les patients avec des variants homozygotes ou hétérozygotes composites.

Il se pourrait qu'il existe de nouvelles formes d'albinisme à transmission autosomique dominante. Devant la quantité de variants potentiellement délétères uniques identifiés, il semblait difficile de réaliser une étude de ségrégation familiale par séquençage Sanger pour chacun de ces variants. Nous avons donc décidé de mettre au point une analyse parentale par pools parentaux. Le principe est de séquencer le panel de gènes candidats chez les parents, mais en combinant plusieurs ADN, afin d'économiser du temps et des réactifs. Tout d'abord il a fallu tester la faisabilité de cette technique. Ceci a fait l'objet du travail de Master 1 d'Ænora Letourneur, sous ma supervision. La mise au point a permis de tester le nombre d'ADN que l'on pouvait mélanger dans un même pool et le nombre de pools à passer par puce, pour s'assurer une couverture suffisante pour détecter tous les variants et éviter les faux-négatifs. Une fois les conditions optimales validées nous avons pu passer un premier batch de parents. Cette analyse a nécessité de s'assurer que les parents dont les ADNs étaient combinés ne pouvaient pas être porteurs des mêmes variants (donc séparer les parents du même couple et vérifier que les cas index n'avaient pas de variants en commun). Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un stage d'initiation à la recherche par Cécile Courdier, sous ma supervision. Ce travail a permis de valider la ségrégation parentale de nombreux variants et les variants hérités de parents sains permettent donc d'éliminer la pathogénicité de ces variants dans une hypothèse de dominance à pénétrance complète. Ce travail a mis en évidence des variants *de novo* qu'il faudra vérifier par séquençage Sanger. Ces analyses sont encore en cours.

### **IV.4 Variants synonymes**

Bien que ce travail se soit concentré sur la recherche de nouveaux gènes, de nombreux patients non résolus sont porteurs d'un seul variant pathogène dans un des 21 gènes connus, sans deuxième événement mis en évidence. En analysant certains de ces patients avant de les inclure dans l'analyse du panel de gènes candidats nous avons détecté des patients porteurs d'un variant récurrent synonyme (ne modifiant pas la séquence d'acides aminés) à distance des sites canoniques d'épissage, initialement non retenus comme délétères. Le premier variant identifié

est un synonyme rare dans le gène *SLC45A2*, NM\_016180.3:c.1518C>T p.(Val506Val), identifié chez 7 patients non apparentés, porteurs d'un autre variant connu ou prédit pathogène. La ségrégation parentale des variants a prouvé que les deux variants étaient situés *en trans* l'un de l'autre chez tous les patients pour lesquels les deux parents étaient disponibles. (Tableau 6)

Patient	Allèle 1	Allèle 2	Mère	Père
1	<b>c.1518C&gt;T p.(Val506Val)</b>	c.986delC p.Thr329Argfs*69	<b>c.1518C&gt;T p.(Val506Val)</b>	c.986delC p.Thr329Argfs*69
2	<b>c.1518C&gt;T p.(Val506Val)</b>	c.1166_1167delAA p.Lys389Serfs*55	c.1166_1167delAA p.Lys389Serfs*55	?
3	<b>c.1518C&gt;T p.(Val506Val)</b>	c.1032+1delG	<b>c.1518C&gt;T p.(Val506Val)</b>	c.1032+1delG
4	<b>c.1518C&gt;T p.(Val506Val)</b>	c.1471G>A p.Gly491Arg	<b>c.1518C&gt;T p.(Val506Val)</b>	c.1471G>A p.Gly491Arg
5	<b>c.1518C&gt;T p.(Val506Val)</b>	c.986delC p.Thr329Argfs*69	c.986delC p.Thr329Argfs*69	<b>c.1518C&gt;T p.(Val506Val)</b>
6	<b>c.1518C&gt;T p.(Val506Val)</b>	del Exons 1-4	del Exons 1-4	<b>c.1518C&gt;T p.(Val506Val)</b>
7	<b>c.1518C&gt;T p.(Val506Val)</b>	c.953G>A p.Arg318His	c.953G>A p.Arg318His	?

Tableau 6. Génotype chez 7 patients porteur du synonyme rare c.1518C>T de *SLC45A2* et ségrégation parentale.

Ce variant rare (108 porteurs hétérozygotes parmi les plus de 140000 témoins de la base GnomAD, [gnomad.broadinstitute.org](http://gnomad.broadinstitute.org), aucun homozygote) est situé au milieu de l'exon 7, à distance des sites canoniques d'épissage. Les outils de prédiction d'épissage n'ont pas montré de modification majeure des sites connus ni de création de site d'épissage. Les données de ségrégation et de fréquence en population générale permettent de le classer comme probablement pathogène d'après la classification de l'ACMG (PS4, PM2, PM3, BP7). (151)

Nous avons contacté les cliniciens ayant pris en charge ces patients et pour deux familles nous avons pu obtenir une biopsie cutanée du patient et de ses parents, afin d'obtenir de l'ARN et de réaliser des RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*). Des analyses préliminaires ont montré la présence d'un transcrit avec un saut de l'exon 6, non rapporté dans Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). Ce transcrit n'est pas présent chez des témoins. Cependant nous n'avons pas encore pu déterminer si le saut d'exon était favorisé par le variant.

Un autre variant synonyme rare a ensuite été mis en évidence chez 7 patients dans l'exon 10 du gène *OCA2*, NM\_000275.2 : c.1080C>T p.(Ser360Ser). Tous ces patients sont porteurs d'un

variant connu ou prédit délétère et pour la plupart des patients l'analyse de ségrégation familiale a montré la présence des deux variants *en trans* l'un de l'autre (Tableau 7).

Ce variant est encore plus rare que le variant de *SLC45A2* (seulement 5 porteurs hétérozygotes parmi les plus de 140000 témoins de la base GnomAD, aucun homozygote). Dans Alamut Visual, il semble qu'il modifie une séquence d'ESE (Exonic Splice Enhancer) (d'après l'outil ESE-Finder). Les données de ségrégation et de fréquence en population générale permettent de le classer comme probablement pathogène d'après la classification de l'ACMG (PS4, PM2, PM3, BP7).

Patient	Allèle 1	Allèle 2	Mère	Père
1	<b>c.1080C&gt;T p.(Ser360Ser)</b>	c.1349C>T p.Thr450Met	<b>c.1080C&gt;T p.(Ser360Ser)</b>	c.1349C>T p.Thr450Met
2	<b>c.1080C&gt;T p.(Ser360Ser)</b>	c.2330G>A p.(Cys777Tyr)	<b>c.1080C&gt;T p.(Ser360Ser)</b>	c.2330G>A p.(Cys777Tyr)
3	<b>c.1080C&gt;T p.(Ser360Ser)</b>	c.516-3C>A	NA	NA
4	<b>c.1080C&gt;T p.(Ser360Ser)</b>	c.2433G>T p.(Arg811Ser)	<b>c.1080C&gt;T p.(Ser360Ser)</b>	c.2433G>T p.(Arg811Ser)
5	<b>c.1080C&gt;T p.(Ser360Ser)</b>	c.1327G>A p.(Val443Ile)	c.1327G>A p.(Val443Ile)	<b>c.1080C&gt;T p.(Ser360Ser)</b>
6	<b>c.1080C&gt;T p.(Ser360Ser)</b>	c.1778T>C p.(Phe593Ser)	<b>c.1080C&gt;T p.(Ser360Ser)</b>	c.1778T>C p.(Phe593Ser)
7	<b>c.1080C&gt;T p.(Ser360Ser)</b>	c.1327G>A p.(Val443Ile)	c.1327G>A p.(Val443Ile)	<b>c.1080C&gt;T p.(Ser360Ser)</b>

Tableau 7. Génotype de 7 patients avec variant synonyme dans le gène *OCA2* et ségrégation parentale

Pour ces deux variants nous avons réalisé des haplotypages grâce à des microsatellites proches du gène. Ceci a été fait au cours du stage de Master 1 de Modibo Diallo. Pour *SLC45A2* nous avons pu génotyper 4 microsatellites informatifs ce qui a mis en évidence un haplotype similaire chez tous les porteurs du variant synonyme. Ceci pourrait indiquer que ce variant pourrait ne pas être délétère mais situé en déséquilibre de liaison avec un variant non détecté par nos méthodes. Pour le gène *OCA2*, 4 patients et 6 microsatellites ont pu être analysés. Aucun haplotype commun n'a été détecté. Ceci serait plutôt en faveur de la pathogénicité du variant en lui-même.

Ces données encore très préliminaires font l'objet de travaux en cours et nécessitent que des analyses fonctionnelles puissent élucider les mécanismes en jeu pour ces variants. Des analyses sur biopsie de peau sont en cours au moment de la rédaction de ce travail.

## DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

---

Ce travail a permis d'identifier deux nouveaux gènes impliqués dans l'albinisme, une forme isolée et une forme syndromique.

L'un, *DCT* ou *TYRP-2* code une enzyme impliquée dans la synthèse d'eumélanine, et appartient à la famille des *tyrosinase-related proteins*, comme *TYR* et *TYRP1*. (56) Les variants identifiés sont responsables, chez deux patientes non apparentées, d'une hypopigmentation modérée, reproduite chez la souris porteuse de variants de nos patientes, induits par technologie CrispR-Cas9. Nous avons proposé de nommer cette nouvelle forme OCA8. (152)

L'autre, *BLOCIS5* ou *Muted*, code une sous-unité d'un complexe impliqué dans la biogenèse des *lysosomes-related-organelles*, BLOC-1, dont 3 autres sous-unités sont codées par des gènes des formes syndromiques que sont les HPS-7, 8 et 9. (30) Les variants identifiés sont associés à une perte de fonction induisant un phénotype d'HPS modéré, et, chez une patiente, à la déstabilisation du complexe BLOC-1, reproduite dans des modèles cellulaires. Nous avons proposé de nommer cette forme HPS-11. (147)

Il s'agit de formes rares, puisque sur les plus de 1600 patients analysés à ce jour, seulement 2 patientes ont été identifiées pour chaque gène. Les analyses moléculaires en diagnostic des 19 gènes préalablement connus, dans cette grande cohorte, ont permis de disposer d'ADN de nombreux patients sans diagnostic moléculaire et, ainsi, de découvrir deux patients pour chacun de ces nouveaux gènes, renforçant ainsi nos observations. A noter que dans notre cohorte, ces formes semblent aussi rares que l'OCA7, les HPS-7, 8 et 9 et le CHS pour lesquels seulement 2 ou 3 patients sont répertoriés, et, finalement moins rares que l'HPS-2 ou l'HPS-10 pour lesquels aucun patient n'a encore été identifié par nos analyses (Tableau 3). Chaque année nous recevons de plus en plus de nouveaux patients à analyser, environ 200 par an les deux dernières années. Il est licite d'imaginer que nous identifierons de nouveaux patients pour ces formes rares et notamment les deux nouveaux gènes, qui nous permettront alors d'affiner les descriptions phénotypiques de ces nouvelles formes.

Les patientes que nous rapportons présentent toutes un phénotype oculocutané modéré. Il semble compréhensible que ce soient des gènes liés à des formes modérées d'albinisme qui puissent être découverts tardivement. En effet, ces patients, sans un examen ophtalmologique poussé et spécialisé, pourraient ne pas être diagnostiqués comme atteints d'un albinisme et donc

pas adressés à un laboratoire spécialisé. (153) Notre laboratoire a probablement l'une des plus grandes cohortes mondiales et son expertise reconnue a permis que des patients soient adressés en nombre de toute la France, parfois d'autres pays d'Europe voire du monde entier. (43,154) Il est aussi à noter que le système de santé français permet au plus grand nombre un suivi médical avancé et l'accès aux consultations spécialisées, ce qui n'est pas le cas dans de nombreux pays. Si d'autres gènes impliqués dans l'albinisme humain restent à découvrir, il est probable qu'ils soient liés à une hypopigmentation et/ou des signes oculaires très modérés, et qu'il s'agisse de formes excessivement rares.

Les nouveaux gènes, *BLOC1S5* (HPS-11) et *DCT* (OCA8) ont récemment été ajoutés à la base OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man®, <https://www.omim.org> ; #619165 et #619172) et pourront ainsi être connus et testés en diagnostic par tous nos homologues dans le monde. Il est probable que d'autres patients porteurs de ces formes puissent bientôt être découverts grâce à l'implémentation de ces gènes dans les panels de nos confrères ou grâce à la mise en place du séquençage d'exome, selon les stratégies adoptées de par le monde. A l'occasion d'une communication orale lors des 5<sup>èmes</sup> journées Européennes pour l'Albinisme (5<sup>TH</sup>EDA, <http://5eda.albinism.eu>) nous avons pu entendre l'intérêt de nos confrères internationaux pour cette découverte mais également les difficultés rencontrées par certains pays qui ne bénéficient pas de notre système de santé. Peu de pays ont, comme nous, la possibilité de tester un aussi grand nombre de patients et/ou de ne pas avoir à tenir compte des ressources financières de ceux-ci pour proposer un diagnostic moléculaire.

Pourtant, le diagnostic moléculaire d'une maladie rare est essentiel pour les patients et leurs familles. Il peut mettre fin à l'errance diagnostique et permettre aux patients de mettre un nom sur leur affection, tout en permettant un conseil génétique pour leur descendance et leurs apparentés. En ce qui concerne l'albinisme, le diagnostic est dans un premier temps clinique, mais il est important par l'analyse moléculaire de diagnostiquer précocement les formes syndromiques, souvent paucisymptomatiques, chez des patients fréquemment dépistés dès la naissance ou dans les premiers mois de vie. Cela leur permet de bénéficier d'une prise en charge spécialisée et, notamment, une prévention des saignements excessifs en cas d'intervention chirurgicale, dentaire et d'accouchement, comme la 2<sup>ème</sup> patiente atteinte d'HPS-11 a pu le vivre. Nous avons également été confrontés à des cas de parents soupçonnés de maltraitance, devant l'apparition d'ecchymoses faciles, pour qui le diagnostic moléculaire a permis de lever

ces soupçons. Le diagnostic d'une forme isolée permet, à l'inverse, d'être rassurant pour le pronostic. Les patients atteints de maladies rares et leurs familles sont souvent avides d'informations précises sur la pathologie. La publication de descriptions détaillées de patients permet d'améliorer les connaissances des cliniciens et des familles. Connaître sa pathologie permet également de l'expliquer et de faciliter l'acceptation d'un entourage parfois peu compréhensif. L'éducation sur la génétique et la physiopathologie de l'albinisme est un pas vers l'acceptation sociale et la lutte contre les superstitions, notamment dans les pays où les PVA souffrent de discrimination. Cela permet également aux patients de se rapprocher d'associations de patients et d'échanger avec d'autres atteints autour de leur vécu, de leur ressenti. Il ne faut bien sûr pas négliger les aspects négatifs d'un tel diagnostic, l'impact sur les relations familiales, la culpabilité ou le sentiment d'être « anormal ». Une prise en charge spécialisée et multidisciplinaire adaptée est nécessaire pour ces patients et leurs familles. (155)

Nous avons décrit de nouveaux variants de *BLOC1S3* responsables de l'HPS-8 chez 3 patients présentant une atteinte pigmentaire modérée. (43) Les HPS liés à des atteintes de BLOC-1 sont connus chez l'humain depuis 2003 (141) mais restent très rares avec peu de patients rapportés dans le monde par rapport aux HPS liés à BLOC-2 (HPS-3, 5 et 6) ou BLOC-3 (HPS-1 et 4). (30,49,114) Ces formes semblent également être des HPS très modérés, comme pour les atteintes de BLOC-2, même si le petit nombre de patients décrits et leur jeune âge ne permet pas d'affirmer que des atteintes systémiques plus graves, telles qu'observées dans les HPS-1, 2, 4 et 10, n'apparaîtront pas plus tardivement. Il semble, d'ailleurs, que la 2<sup>ème</sup> patiente avec HPS-11 ait présenté des signes systémiques avec une atteinte digestive, immunitaire et peut-être respiratoire. Cependant, il n'est pas certain de pouvoir imputer ces symptômes à l'HPS-11. De plus, un de nos patients, atteint d'HPS-8, a présenté une forme rare de lymphome de Hodgkin, à prédominance lymphocytaire, forme décrite chez des patients HPS-2. (44) C'est d'ailleurs ce qui a conduit nos confrères hématologues à adresser ce patient pour un diagnostic moléculaire, à l'âge de 15 ans, alors qu'il n'avait jamais été exploré malgré la présence de 4 atteints dans cette grande fratrie de 9. Il est donc important de porter à la connaissance du plus grand nombre possible de cliniciens l'existence de ces formes rares et de la possibilité de diagnostic moléculaire. Les signes modérés en font potentiellement des affections sous-diagnostiquées. (153) En absence de confirmation moléculaire, une analyse de l'agrégation plaquettaire pour dépister un déficit en granules denses est importante pour ne pas méconnaître

une forme syndromique qui nécessiterait une prise en charge spécialisée avant une intervention chirurgicale, dentaire ou un accouchement. (113)

Notre étude a permis d'associer à l'HPS la 4<sup>ème</sup> sous-unité du complexe BLOC-1, sur les huit qui la composent. Il est licite de suspecter les autres sous-unités également. Notamment la sous-unité *BLOCIS4*, qui est responsable d'un HPS chez la souris *Cappucino*. (125) Cette sous-unité est, à l'identique de *BLOCIS3*, codée par un gène constitué d'un unique exon codant (OMIM \*605695). Ce gène est mal couvert sur notre panel de gènes candidats. C'est également le cas de *BLOCIS3* qui présente un petit « trou de couverture » récurrent sur le panel de diagnostic et pour lequel le séquençage Sanger est également complexe et a nécessité une mise au point spécifique. Ce défaut de couverture pourrait expliquer qu'aucun patient avec variant de *BLOCIS4* n'ait été identifié chez les 230 patients analysés. De plus il est probable qu'un HPS lié à *BLOCIS4* serait une forme de rareté équivalente aux HPS-7, 8, 9 et 11 et il se pourrait qu'aucun patient de notre cohorte n'en soit affecté.

En ce qui concerne les trois sous-unités restantes, BLOC1S1, BLOC1S2 et SNAPIN ou BLOC1S7, elles sont, pour leur part, également impliquées dans un autre complexe, le complexe BORC (BLOC1-related complex) qui semble plus essentiel avec létalité précoce voire embryonnaire chez la souris, ce qui indique que son dysfonctionnement pourrait induire des phénotypes également très sévères chez l'homme, éventuellement incompatibles avec la vie, non observés chez les patients de notre cohorte. (156)

Notre équipe s'attache depuis près de 20 ans à l'analyse des gènes d'albinisme et contribue à élaborer des corrélations génotype-phénotype afin d'améliorer le diagnostic et la prise en charge des patients. En 2018, nous avons fait un bilan de notre cohorte (990 patients analysés à l'époque), permettant une photographie de la proportion des différentes formes d'albinisme diagnostiquées en France.(114) Les proportions et prévalences de chaque formes peuvent être très différentes selon la région du monde, du fait de variants à effet fondateurs, comme par exemple la délétion de l'exon 7 d'*OCA2* en Afrique sub-saharienne (157) ou encore les variants récurrents d'*HPS1* et *HPS3* de Puerto Rico. (30) En France, ainsi que chez les caucasiens non-hispaniques, ce sont les atteintes du gène *TYR* qui touchent le plus grand nombre de patients (114,158) avec 50% de formes modérées liées à la présence du variant hypomorphe R402Q (NM\_000372.4:c.1205G>A p.(Arg402Gln)). Ce variant fréquent, présent chez plus de 17% de la population mondiale et 26 % des personnes d'origine européenne, n'est pas responsable d'un

phénotype d'albinisme à l'état homozygote, et pourrait, de ce fait, être considéré comme un polymorphisme. Cependant, il a été démontré *in vitro* son effet sur l'activité tyrosinase (68), et nous avons décrit le phénotype détaillé de nombreux patients porteurs de ce variant, ainsi qu'un parent également hétérozygote composite pour ce variant mais dont le diagnostic d'OCA1 n'a été porté qu'après le diagnostic de sa fille. (67) Ceci illustre à nouveau l'intérêt d'un examen ophtalmologique approfondi pour ne pas passer à côté du diagnostic d'albinisme dans des populations à peau claire. (153)

Afin d'approfondir les corrélations génotype-phénotype nous avons mis en place une base de données répertoriant l'ensemble des phénotypes les plus détaillés possible des patients que nous avons analysés au laboratoire, ainsi que leur génotype complet. Dans un premier temps les patients résolus ont été implémentés et étudiés (Thèse pour le grade de docteur en médecine du Dr Vincent Michaud (159)). L'implémentation des patients non résolus est en cours et permettra notamment de comparer le phénotype des patients non résolus à ceux qui le sont, et de distinguer le phénotype des patients avec un variant pathogène hétérozygote de ceux qui n'en ont aucun, en incluant également les variants de signification incertaine (VSI). Il nous semble que les patients non résolus ont dans l'ensemble des formes plutôt modérées, mais ceci nécessite confirmation. Cette base de données sera une grande source d'information et permettra peut-être également de mettre en évidence des variants modificateurs ou des phénomènes de digénisme ou d'oligogénisme. Nous pourrions éventuellement observer un effet additif de certains variants fréquents ou rares, chez des patients ayant déjà deux variants pathogènes dans un même gène et chez ceux qui en ont un seul. Certains variants fréquents dans la population générale sont en cours d'investigation, comme cela a été fait pour R402Q. C'est le cas du variant p.S192Y (NM\_000372.4:c.575C>A p.(Ser192Tyr)) du gène *TYR*. Il semblerait qu'un haplotype commun contenant le R402Q et le S192Y, constitue un allèle pathogène et que deux individus homozygotes pour cet allèle soient atteints d'albinisme. (67,69) La recherche de cet haplotype, dans notre cohorte pourrait permettre de conforter les constatations de cette cohorte scandinave. Dans le gène *OCA2*, le variant R419Q (NM\_000275.3:c.1256G>A p.(Arg419Gln)) présente un profil de ségrégation qui pourrait suggérer un mécanisme proche du R402Q de *TYR*. Il est à noter qu'*OCA2* est le gène où est détecté le plus grand nombre de patients avec un seul variant pathogène. Ceci suggère qu'il pourrait exister un ou plusieurs variants récurrents, soient écartés car trop fréquents, comme le R419Q, soient non détectés par nos techniques.

Notre stratégie d'analyse est classiquement focalisée sur les exons et les jonctions exons-introns. De ce fait, on ne peut exclure la présence de variants introniques profonds, dans les régions non traduites 5' ou 3', ainsi que dans les éléments régulateurs à distance, qui pourraient avoir un impact sur l'expression des gènes, comme cela a été montré pour le gène *CFTR*. (160) Notre équipe s'attache actuellement à répertorier les éléments régulateurs à distance qui peuvent interagir avec les gènes d'albinisme. Une analyse bio-informatique a été réalisée pour localiser des éléments qui prédisent les sites intervenant dans la régulation de l'expression génique, comme les sites d'hypersensibilité à la DNaseI, les sites de fixation de facteurs de transcription, les sites de liaison de CTCF et des signatures chromatinienne (H3K27Ac, H3K4me1, H3K4me3). En parallèle, la mise au point d'une technique de « *promoter capture Hi-C* » (*high throughput chromosome conformation capture*) (161) est en cours pour identifier un maximum d'éléments régulateurs interagissant physiquement avec les promoteurs des gènes d'albinisme. Les analyses de biologie moléculaire conventionnelle nécessitent l'extraction d'ADN qui perd dans le processus toute sa conformation tridimensionnelle. Or dans le noyau cellulaire la chromatine est organisée dans l'espace en des domaines d'association topologique ou TADs. (162) La technologie *Capture Hi-C* permet, en fixant préalablement la conformation chromatinienne, de lier les régions régulatrices, structurellement éloignées, qui entrent en contact avec les promoteurs de nos gènes d'intérêt, puis de les séquencer pour les identifier. Nous pourrions par la suite rechercher des variants dans ces éléments régulateurs, chez des patients avec un seul variant pathogène dans un premier temps.

En outre, la méthode des amplicons, que nous avons employée, a ses limites. Elle ne permet pas de repérer une anomalie de structure. Nous pouvons identifier des anomalies du nombre de copie grâce aux méthodes de bioinformatique basées sur la couverture (163) mais avec ces dernières nous ne pouvons pas déceler une translocation, une inversion ou une insertion, même si son point de cassure était situé au sein d'un exon puisque celui-ci ne serait pas amplifié par la PCR. Notre équipe a identifié, grâce à la CGH-Array haute résolution ciblant spécifiquement les gènes d'albinisme, de nombreux variants du nombre de copies, ainsi qu'un réarrangement complexe. (114,164) Cette technique ne permet cependant d'objectiver que des réarrangements avec déséquilibres. Une inversion ou insertion équilibrée ne serait pas visualisable. La technique de capture et séquençage en *paired-end* permet de dépister certaines de ces anomalies. (165) Dépister des réarrangements dont les points de cassure sont introniques nécessite cependant des analyses de gène entier, mais elles sont à l'heure actuelles encore très

coûteuses et de mise en place ardue pour le diagnostic. Des séquençages de gènes entiers ont déjà été entrepris par notre équipe, il y a quelques années pour les gènes d'OCA1 à 4, mais n'ont pas permis d'identifier de deuxième variant chez des patients hétérozygotes, dont seul un petit nombre a pu être étudié. Le laboratoire travaille cependant à la mise en place de telles analyses pour étudier un plus grand nombre de patients.

Enfin, parfois, le deuxième évènement était sous nos yeux depuis le début mais avait été écarté lors de l'interprétation. Chez certains patients apparemment hétérozygotes, une réanalyse a permis de mettre en évidence des variants synonymes rares et récurrents, dans les gènes *OCA2* et *SLC45A2*, dont la pathogénicité ne pouvait être soupçonnée en se basant uniquement sur l'effet sur la protéine ou l'épissage, prédit *in silico*. Le fait d'avoir une grande cohorte a permis d'observer une récurrence et donc de suspecter un effet de ces variants. Néanmoins en l'absence de tests fonctionnels la pathogénicité de variants rares et non récurrents ne peut être formellement affirmée. Dans le cadre de l'albinisme, les études fonctionnelles sont complexifiées par l'expression génique limitée des formes non syndromiques. Les gènes d'albinisme non syndromique ne sont exprimés que dans les mélanocytes et le RPE. Une biopsie de peau est donc nécessaire pour obtenir de l'ARN ou des protéines, indispensables pour évaluer les conséquences des variants. La mise en place d'outils standardisés au laboratoire de diagnostic permettrait de vérifier rapidement et de manière fiable la pathogénicité de certains VSI et donc permettre la résolution de nouveaux cas. L'avènement de nouvelles technologies d'édition du génome comme CrispR-Cas9 permet de faciliter et d'accélérer certaines analyses fonctionnelles. (166) Nous l'avons d'ailleurs mis en pratique pour la génération de souris avec variants de *Dct*. (152) L'utilisation de modèles animaux en routine pour le diagnostic est à l'heure actuelle inenvisageable. Il sera donc nécessaire de disposer de modèles cellulaires adaptés, produisant du pigment et l'obtention et le maintien de cultures de mélanocytes sont fastidieux. Les cultures mélanocytaires humaines exigent des conditions stringentes et nécessitent une biopsie cutanée, issue d'un geste relativement invasif pour le patient, correctement conservée entre le prélèvement et sa mise en culture. Notre équipe travaille actuellement à la mise en place de validations fonctionnelles, en étudiant un modèle cellulaire produisant des pigments. Il s'agit d'une lignée humaine pigmentée issue de mélanome (MNT-1). (167) Dans un premier temps, il s'agit de produire des clones cellulaires, chacun avec un KO d'un des gènes d'albinisme, obtenu par CrispR-Cas9. Le premier gène que nous testons est *TYR*, puisque sa perte de fonction homozygote entraîne une absence totale de pigment, ce qui

permet d'évaluer visuellement l'obtention d'un KO homozygote sur un clone cellulaire. Des clones avec KO d'autres gènes sont en cours de production, n'entraînant pas une absence totale de pigment (*OCA2*, *DCT*). Pour ceux-ci il conviendra de réaliser un dosage du pigment pour s'assurer de la réussite du KO. Par la suite, nous pourrions introduire dans ces modèles KO des transcrits dans des vecteurs d'expression. Des transcrits sauvages devraient restaurer la production de pigment. Ainsi, l'expression d'un transcrit avec un VSI devrait nous permettre d'observer une restauration de la production totale du pigment signifiant sa bénignité, ou au contraire une restauration partielle ou nulle et ainsi confirmer sa pathogénicité. Cette validation nécessitera donc que le dosage de pigment soit très sensible. Des analyses de localisation cellulaire des protéines concernées, à l'image de celle réalisée pour *BLOC1S5*, seront également réalisées.

Cette méthode utilisant des transcrits connaît quelques limites, comme la nécessité de connaître tous les transcrits alternatifs d'un gène et leur implication dans la pigmentation, de bénéficier d'un transcrit porteur du variant à l'étude, soit par clonage direct sur ARN du patient, avec toutes les difficultés évoquées ci-dessus, soit par mutagenèse dirigée. Cette méthode ne permet pas d'observer d'éventuelles anomalies d'épissage. Il convient en effet de ne pas méconnaître un potentiel épissage aberrant qu'un variant faux-sens ou synonyme pourrait occasionner. Pour cela il est possible d'utiliser la méthode du mini-gène, utilisant un vecteur contenant deux exons intrinsèques, l'un proche d'un promoteur, l'autre flanqué d'une queue poly-adenylée, entre lesquels on viendra insérer la séquence à tester. Après transfection dans une cellule appropriée, une RT-PCR permettra de séquencer les variants d'épissage. (168) La technologie CrispR-Cas9 nous permet également d'envisager une mutagenèse dirigée directement sur les gènes de la lignée cellulaire pour ensuite étudier les transcrits par RT-PCR-séquençage ou transcriptome. Cette méthode comporte quelques écueils. Comme toute lignée issue de cellules cancéreuses, le génotype des cellules MNT-1 est complexe, avec de nombreuses aneuploïdies que nous tentons de caractériser par caryotype. Nous souhaitons vérifier le nombre de copies de chaque gène d'albinisme. La présence de plus de deux copies apportera un degré de complexité supplémentaire si nous souhaitons étudier des hétérozygotes composites. Par ailleurs, la technologie CrispR-Cas9 est à l'origine d'effets indésirables, comme l'insertion de variations en dehors de la zone ciblée (*off-target*) ou de réarrangements chromosomiques en aval des points de cassure induits, dont il faudra tenir compte dans l'interprétation des résultats. (169)

Notre stratégie de recherche de nouveaux gènes par analyse de panel de gènes candidats s'est révélée relativement efficace en déterminant la cause de l'albinisme pour 4 patientes. Cependant de nombreux patients restent encore à ce jour non résolus, malgré l'analyse des 129 gènes. Les deux nouveaux gènes, tout comme les 19 précédents, sont associés à des formes récessives, et de nombreux patients présentent un ou plusieurs variants hétérozygotes potentiellement délétères, sans deuxième événement associé dans un même gène. Les analyses fines du panel de gènes candidats sont encore en cours. Chez seulement environ la moitié des patients, l'analyse approfondie des gènes pour lequel un variant potentiellement délétère a été finalisée en observant un à un les fichiers BAMs grâce au logiciel de visualisation Alamut Visual (SOPHiA GENETICS) sans qu'un deuxième événement ait pu être observé. Cette analyse visuelle, conduite pour le panel diagnostic, chez les patients avec une mutation d'un des 21 gènes connus, peut permettre la mise en évidence d'un deuxième variant non appelé par les techniques bioinformatiques, ou de mettre en évidence une zone non couverte au séquençage, donnant lieu à un séquençage Sanger. De tels "trous de couverture" sont mis en évidence pour le panel 129 gènes, mais il n'a pas été possible, dans le cadre de ce projet, de réaliser systématiquement des séquençages Sanger, devant un nombre conséquent de VSI dans de nombreux gènes différents.

En outre, les variants du panel de gènes candidats ont été analysés sur le modèle des 19 gènes connus initialement, c'est-à-dire selon l'hypothèse d'une forme récessive d'albinisme, autosomique ou liée à l'X. Il est possible que parmi les gènes candidats, certains soient en fait impliqués dans des formes dominantes. De nombreux patients ont un seul variant, probablement pathogène ou de signification incertaine, dans un ou plusieurs gènes du panel. Nous avons étudié la faisabilité de l'étude par pool parentaux qui permet rapidement (et économiquement) d'analyser la ségrégation parentale, et qui pourrait permettre d'identifier des variants survenus *de novo*. Ces analyses parentales sont encore en cours.

On pourrait également imaginer qu'il existe des gènes d'albinisme soumis à empreinte parentale. Un des gènes du panel, *OSBPL5* ou *OBPH1* (OMIM \*606733), situé à proximité du domaine soumis à empreinte de la région 11p15.5 (locus associé aux syndromes de Beckwith-Wiedemann et Silver-Russell (170)) serait soumis à empreinte parentale dans le placenta, chez la souris et chez l'humain, mais pas dans les autres tissus étudiés. L'expression bi-allélique n'a cependant pas été évaluée pour la rétine et la peau. (171) L'existence d'une empreinte parentale tissu-spécifique permet d'imaginer un phénomène similaire au niveau des yeux et de la peau. Afin de suspecter un phénomène d'empreinte, un grand nombre de patients avec un variant rare

d'un même gène, toujours hérité d'un même parent, serait nécessaire. Pour le moment il n'a pas été mis en évidence de tels variants récurrents dans un même gène, et nous ne disposons pas de l'ADN parental pour de nombreux patients non résolus.

Enfin, il est tout à fait possible que d'autres nouveaux gènes d'albinisme existent mais n'aient pas été sélectionnés dans ce panel. Des analyses d'exome ont déjà été tentées et de nouvelles vont être entreprises pour tenter d'identifier de nouveaux gènes. Le coût de ces analyses reste encore à ce jour une limite pour la mettre en place pour l'ensemble des patients négatifs. La mise en route des plateformes de séquençage très haut-débit, dans le cadre du plan France Médecine Génomique 2025 (<https://pfm2025.aviesan.fr>), sera une chance pour les patients de mettre fin à leur errance diagnostique. D'ores et déjà, les génodermatoses, dont l'albinisme, figurent parmi les pré-indications validées par la filière FIMARAD (FILIERE SANTÉ MALADIES RARES DERMATOLOGIQUES). (172) Notre consœur et collaboratrice Dr Fanny Morice-Picard est responsable de la RCP d'inclusion pour le CHU de Bordeaux. La stratégie adoptée est, dans un premier temps, la réalisation du panel ciblé, du fait de sa grande rentabilité (>70% de diagnostic). Les patients non résolus pourront ensuite être inclus pour le séquençage du génome complet par la plateforme et notre laboratoire participera à l'interprétation des variants identifiés par séquençage très haut débit. Nous espérons que ces analyses permettront d'identifier de nouveaux variants notamment structuraux. Les patients présentant des formes oculaires pures ne pourront pas encore être étudiés par ce biais. La filière MHEMO permet d'inclure des patients avec pathologies plaquettaires constitutionnelles, ce qui pourrait être utile aux rares patients non résolus avec forme oculaire et ayant un déficit d'agrégation plaquettaire objectivé. (173)

Finalement, certains patients avec forme paucisymptomatique pourraient ne pas être atteints d'albinisme. (174) Lors de la mise au point du panel de diagnostic et du panel de gènes candidats, nous avons choisi d'intégrer certains gènes de diagnostics différentiels. Nous avons ainsi pu observer une proportion non négligeable de patients ne présentant pas, en définitive, un albinisme, mais une autre pathologie à présentation atypique ou paucisymptomatique, ce que nous qualifions de forme frontière. Nous avons ainsi décrit des patients avec atteinte de *FRMD7* (FERM DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 7 ; OMIM \*300628), gène associé au nystagmus congénital, de transmission récessive liée à l'X. (175) Le cas index avait été adressé pour albinisme oculaire et sa cousine était également atteinte. Un variant pathogène de *FRMD7*, déjà

rapporté dans la base de données HGMD (Human Gene Mutation Database, <https://portal.biobase-international.com>), a été identifié. Chez la cousine, une analyse de l'inactivation de l'X a mis en évidence la présence d'un biais en faveur de l'X porteur du variant de *FRMD7*, expliquant l'atteinte chez cette petite fille, tandis que sa tante, conductrice, exempte de biais, n'était pas affectée.

Nous avons également découvert des variants de *PAX6*, associés à une hypoplasie fovéolaire sans aniridie. Les variants du gène *PAX6* sont associés à une expressivité variable (150), illustrée par nos 6 patients suspectés d'albinisme oculaire ou oculocutané modéré.

De tels diagnostics différentiels pourraient être mis en évidence par séquençage pangénomique et nous avons d'ailleurs établi une liste de gènes impliqués dans des atteintes oculaires dont le phénotype correspond à une forme frontière afin de rechercher spécifiquement les variants par séquençage d'exome chez une centaine de patients non résolus présentant une forme frontière.

La découverte de nouveaux gènes permet de renforcer nos connaissances sur les mécanismes physiopathologiques de la pigmentation et du développement oculaire. Pour étudier les conséquences cellulaires et anatomiques de nos variants, nous avons observé l'histologie rétinienne de la souris avec variants de *Dct* et des embryons de poisson zèbre traités avec des morpholino *dct*, et nous avons entamé de plus amples études et mises au point afin de continuer à élucider le rôle des gènes de pigmentation dans le développement embryonnaire et fœtal de l'œil. Les analyses histologiques oculaires chez la souris ne montrent pas d'hypopigmentation majeure au niveau des mélanocytes choroïdiens et iriens. Cependant, il existe un très net défaut de pigmentation du RPE, dès le stade embryonnaire 15.5 jours de développement. Nous voulons étudier les mécanismes développementaux qui lient le défaut de pigmentation aux anomalies de développement rétinienne observées chez les patients et nos modèles animaux.

En l'absence de fovéa chez la souris, nous ne pouvions pas y comparer le phénotype oculaire de nos patientes. Cependant, les PVA présentent des troubles de la décussation optique, se traduisant par des anomalies des potentiels évoqués visuels (PEV). Les souris avec perte de fonction homozygote de *Tyr* (*albino*) et les chats siamois présentent également un défaut de décussation des fibres du nerf optique. (176) Nous avons entrepris d'étudier la répartition des fibres optiques ipsi- et controlatérales chez nos souris *Dct*<sup>-/-</sup> grâce à une greffe de cristaux de DiI au niveau du nerf optique. Un cristal, placé dans un globe oculaire, à la naissance du nerf optique, permet la diffusion du DiI, fluorescent, le long des axones, et ainsi de visualiser le trajet des fibres optiques. Des analyses préliminaires ne montrent pas d'anomalies de répartition

de ces fibres. Les deux patientes présentant des variants pathogènes pour *DCT* n'ont pas encore été évaluées par PEV. Il sera intéressant de vérifier si elles sont exemptes de problèmes de vision binoculaire comme le suggère notre étude chez le modèle animal, et nous avons contacté les cliniciens en ce sens.

Nous allons continuer d'étudier finement les caractéristiques morphologiques et moléculaires de la rétine et du RPE de la souris modèle *Dct*<sup>-/-</sup> à différents stades de développement, qui nous permettront d'explorer le lien entre la mélanogénèse du RPE et la neurogénèse rétinienne. Ces études pourront par la suite être étendues pour comparer les différents types d'albinisme et faire le lien entre la pigmentation et le développement rétinien.

L'outil CrispR-Cas9 et le modèle murin ont été cruciaux pour valider les variants de *DCT*, d'autant que nous étudions des gènes très conservés dans l'évolution. Cet outil permet d'introduire des variants ponctuels et ainsi d'étudier les variants présents chez les patients, à condition que la séquence concernée soit conservée. Ceci permettrait de générer des homozygotes mais aussi des hétérozygotes composites et ainsi il sera possible d'étudier des compositions alléliques diverses, voire digénismes ou oligogénismes, dans le contexte de lignées congéniques murines. Toutefois il faut rester prudent sur les constatations chez la souris, dont le phénotype peut parfois différer grandement des humains. La compréhension des mécanismes physiopathologiques des maladies rares est bien sûr indispensable pour envisager à terme la recherche de futurs traitements, et disposer de modèles animaux porteurs de variants identiques aux humains serait un outil précieux pour la mise en route de futurs essais thérapeutiques.

En conclusion, ce travail a permis l'identification de deux nouveaux gènes d'albinisme, *DCT* et *BLOCIS5*, impliqués respectivement dans une forme non syndromique, OCA8 et une forme syndromique, HPS-11, toutes deux rares et modérées, de transmission autosomique récessive. Il reste cependant encore de nombreux patients non résolus mais aussi de nombreuses perspectives d'avenir pour détecter les gènes et les variants manquants et élucider les mécanismes physiopathologiques de la pigmentation humaine conduisant au phénotype d'albinisme.

## RÉFÉRENCES

---

1. Phifer-Rixey M, Nachman MW. Insights into mammalian biology from the wild house mouse *Mus musculus*. *eLife*. 15 avr 2015;4:e05959.
2. Panthier J-J, Guénet J-L. Comment la souris est devenue, timidement, une espèce modèle pour la recherche en génétique animale et humaine. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*. 25 juin 2017;169:218-25.
3. Seruggia D, Josa S, Fernández A, Montoliu L. The structure and function of the mouse tyrosinase locus. *Pigment Cell & Melanoma Research* [Internet]. [cité 19 janv 2021];n/a(n/a). Disponible sur: <http://www.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/pcmr.12942>
4. Silvers WK. The Coat Colors of Mice [Internet]. 1979 [cité 22 nov 2020]. Disponible sur: <http://www.informatics.jax.org/wksilvers/>
5. Issue | Under the Same Sun [Internet]. [cité 22 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.underthesamesun.com/content/issue#what-is-albinism>
6. Castle WE, Allen GM. The Heredity of Albinism. *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences*. 1903;38(21):603-22.
7. Jeambrun P. L'albinisme : données historiques. In: HISTOIRE DES SCIENCES MEDICALES [Internet]. 64, Avenue des Gobelins, 75013 Paris; 2013. Disponible sur: <https://www.biusante.parisdescartes.fr/sfhm/hsm/HSMx2013x047x002/HSMx2013x047x002x0195.pdf>
8. Fall B. Sorcellerie et albinisme en Afrique subsaharienne. 2018;158.
9. National Geographic. Tanzanie : pourquoi les albinos sont-ils persécutés ? [Internet]. National Geographic. 2018 [cité 22 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.nationalgeographic.fr/photographie/tanzanie-pourquoi-les-albinos-sont-ils-persecutes>
10. Under the Same Sun - What is albinism ? [Internet]. [cité 22 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.underthesamesun.com/content/issue#what-is-albinism>
11. Accueil | Genespoir [Internet]. AssoConnect. [cité 22 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.genespoir.org/page/865831-accueil>
12. Fitzpatrick TB. The Validity and Practicality of Sun-Reactive Skin Types I Through VI. *Arch Dermatol*. 1 juin 1988;124(6):869.
13. Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin Pigmentation in Mammalian Skin and Its Hormonal Regulation. *Physiological Reviews* [Internet]. 1 oct 2004 [cité 16 avr 2020]; Disponible sur: <https://journals-physiology-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/abs/10.1152/physrev.00044.2003>
14. Vandamme N, Berx G. From neural crest cells to melanocytes: cellular plasticity during development and beyond. *Cell Mol Life Sci*. 1 mai 2019;76(10):1919-34.

15. Crête neurale. In: Wikipédia [Internet]. 2020 [cité 22 nov 2020]. Disponible sur: [https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Cr%C3%AAt%C3%A9\\_neurale&oldid=167615062](https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Cr%C3%AAt%C3%A9_neurale&oldid=167615062)
16. Goding CR, Arnheiter H. MITF-the first 25 years. *Genes Dev.* 1 août 2019;33(15-16):983-1007.
17. Gilbert SF, Gilbert SF. *Developmental Biology*. 6th éd. Sinauer Associates; 2000.
18. Pingault V, Ente D, Moal FD-L, Goossens M, Marlin S, Bondurand N. Review and update of mutations causing Waardenburg syndrome. *Human Mutation.* 2010;31(4):391-406.
19. Dave TV, Pappuru RR, Dave VP. When color matters: Waardenburg syndrome. *Indian J Ophthalmol.* janv 2019;67(1):135.
20. D'Alba L, Shawkey MD. Melanosomes: Biogenesis, Properties, and Evolution of an Ancient Organelle. *Physiological Reviews.* 01 2019;99(1):1-19.
21. Sitaram A, Marks MS. Mechanisms of protein delivery to melanosomes in pigment cells. *Physiology (Bethesda).* avr 2012;27(2):85-99.
22. Benito-Martínez S, Zhu Y, Jani RA, Harper DC, Marks MS, Delevoye C. Research Techniques Made Simple: Cell Biology Methods for the Analysis of Pigmentation. *Journal of Investigative Dermatology.* févr 2020;140(2):257-268.e8.
23. Dennis MK, Mantegazza AR, Snir OL, Tenza D, Acosta-Ruiz A, Delevoye C, et al. BLOC-2 targets recycling endosomal tubules to melanosomes for cargo delivery. *J Cell Biol.* 25 mai 2015;209(4):563-77.
24. OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man [Internet]. [cité 23 févr 2021]. Disponible sur: <https://www.omim.org/>
25. Ajitkumar A, Yarrarapu SNS, Ramphul K. Chediak Higashi Syndrome. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 [cité 24 nov 2020]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507881/>
26. Introne WJ, Westbroek W, Groden CA, Bhambhani V, Golas GA, Baker EH, et al. Neurologic involvement in patients with atypical Chediak-Higashi disease. *Neurology.* 14 2017;88(7):e57-65.
27. Barbosa MDFS, Barrat FJ, Tchernev VT, Nguyen QA, Mishra VS, Colman SD, et al. Identification of Mutations in Two Major mRNA Isoforms of the Chediak-Higashi Syndrome Gene in Human and Mouse. *Hum Mol Genet.* 1 juill 1997;6(7):1091-8.
28. Wang Z, Liang Y, Xu Z. Silvery Gray Hair: A Clue to Diagnosing Chédiak–Higashi Syndrome. *The Journal of Pediatrics.* 1 juin 2019;209:255-255.e1.
29. Jax.org- beige [Internet]. [cité 24 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.jax.org/strain/000629>

30. Huizing M, Malicdan MCV, Wang JA, Pri-Chen H, Hess RA, Fischer R, et al. Hermansky-Pudlak syndrome: Mutation update. *Human Mutation*. mars 2020;41(3):543-80.
31. Buff - Phenotype [Internet]. [cité 24 nov 2020]. Disponible sur: <http://www.informatics.jax.org/image/MGI:3587308>
32. Huizing M, Scher CD, Strovel E, Fitzpatrick DL, Hartnell LM, Anikster Y, et al. Nonsense mutations in ADTB3A cause complete deficiency of the beta3A subunit of adaptor complex-3 and severe Hermansky-Pudlak syndrome type 2. *Pediatr Res*. févr 2002;51(2):150-8.
33. Pearl- Phenotype [Internet]. [cité 24 nov 2020]. Disponible sur: <http://www.informatics.jax.org/image/MGI:3715189>
34. Dell'Angelica EC, Shotelersuk V, Aguilar RC, Gahl WA, Bonifacino JS. Altered Trafficking of Lysosomal Proteins in Hermansky-Pudlak Syndrome Due to Mutations in the  $\beta$ 3A Subunit of the AP-3 Adaptor. *Molecular Cell*. janv 1999;3(1):11-21.
35. Enders A, Zieger B, Schwarz K, Yoshimi A, Speckmann C, Knoepfle E-M, et al. Lethal hemophagocytic lymphohistiocytosis in Hermansky-Pudlak syndrome type II. *Blood*. 1 juill 2006;108(1):81-7.
36. Ammann S, Schulz A, Krägeloh-Mann I, Dieckmann NMG, Niethammer K, Fuchs S, et al. Mutations in AP3D1 associated with immunodeficiency and seizures define a new type of Hermansky-Pudlak syndrome. *Blood*. 25 févr 2016;127(8):997-1006.
37. Mohammed M, Al-Hashmi N, Al-Rashdi S, Al-Sukaiti N, Al-Adawi K, Al-Riyami M, et al. Biallelic mutations in AP3D1 cause Hermansky-Pudlak syndrome type 10 associated with immunodeficiency and seizure disorder. *European Journal of Medical Genetics*. 1 nov 2019;62(11):103583.
38. Bowman SL, Bi-Karchin J, Le L, Marks MS. The road to lysosome-related organelles: Insights from Hermansky-Pudlak syndrome and other rare diseases. *Traffic*. 2019;20(6):404-35.
39. Falcón-Pérez JM, Starcevic M, Gautam R, Dell'Angelica EC. BLOC-1, a novel complex containing the pallidin and muted proteins involved in the biogenesis of melanosomes and platelet-dense granules. *J Biol Chem*. 2 août 2002;277(31):28191-9.
40. Setty SRG, Tenza D, Truschel ST, Chou E, Sviderskaya EV, Theos AC, et al. BLOC-1 Is Required for Cargo-specific Sorting from Vacuolar Early Endosomes toward Lysosome-related Organelles. *Molecular Biology of the Cell*. 2007;18:13.
41. Bryan MM, Tolman NJ, Simon KL, Huizing M, Hufnagel RB, Brooks BP, et al. Clinical and molecular phenotyping of a child with Hermansky-Pudlak syndrome-7, an uncommon genetic type of HPS. *Mol Genet Metab*. 2017;120(4):378-83.
42. Moore BA, Flenniken AM, Clary D, Moshiri AS, Nutter LMJ, Berberovic Z, et al. Genome-wide screening of mouse knockouts reveals novel genes required for normal

- integumentary and oculocutaneous structure and function. *Scientific Reports*. 1 août 2019;9(1):11211.
43. Pennamen P, Tingaud-Sequeira A, Michaud V, Morice-Picard F, Plaisant C, Vincent-Delorme C, et al. Novel variants in the BLOC1S3 gene in patients presenting a mild form of Hermansky-Pudlak syndrome. *Pigment Cell Melanoma Res*. 20 juill 2020;
  44. Lorenzi L, Tabellini G, Vermi W, Moratto D, Porta F, Notarangelo LD, et al. Occurrence of Nodular Lymphocyte-Predominant Hodgkin Lymphoma in Hermansky-Pudlak Type 2 Syndrome Is Associated to Natural Killer and Natural Killer T Cell Defects. *PLOS ONE*. 26 nov 2013;8(11):e80131.
  45. Gwynn B, Martina JA, Bonifacino JS, Sviderskaya EV, Lamoreux ML, Bennett DC, et al. Reduced pigmentation (rp), a mouse model of Hermansky-Pudlak syndrome, encodes a novel component of the BLOC-1 complex. *Blood*. 15 nov 2004;104(10):3181-9.
  46. Okamura K, Suzuki T. Current landscape of Oculocutaneous Albinism in Japan. *Pigment Cell Melanoma Res*. 24 sept 2020;
  47. Phenotype Image Detail [Internet]. [cité 9 janv 2021]. Disponible sur: <http://www.informatics.jax.org/image/MGI:3587352>
  48. Gautam R, Chintala S, Li W, Zhang Q, Tan J, K Novak E, et al. The Hermansky-Pudlak Syndrome 3 (Cocoa) Protein Is a Component of the Biogenesis of Lysosome-related Organelles Complex-2 (BLOC-2). *The Journal of biological chemistry*. 1 avr 2004;279:12935-42.
  49. Michaud V, Lasseaux E, Plaisant C, Verloes A, Perdomo-Trujillo Y, Hamel C, et al. Clinico-molecular analysis of eleven patients with Hermansky-Pudlak type 5 syndrome, a mild form of HPS. *Pigment Cell Melanoma Res*. janv 2017;30(6):563-70.
  50. Wei A, Yuan Y, Bai D, Ma J, Hao Z, Zhang Y, et al. NGS-based 100-gene panel of hypopigmentation identifies mutations in Chinese Hermansky-Pudlak syndrome patients. *Pigment Cell Melanoma Res*. nov 2016;29(6):702-6.
  51. Wei A, Yuan Y, Qi Z, Liu T, Bai D, Zhang Y, et al. Instability of BLOC-2 and BLOC-3 in Chinese patients with Hermansky-Pudlak syndrome. *Pigment Cell & Melanoma Research*. 2019;32(3):373-80.
  52. Huizing M, Pederson B, Hess RA, Griffin A, Helip-Wooley A, Westbroek W, et al. Clinical and cellular characterization of Hermansky-Pudlak syndrome type-6. *J Med Genet*. déc 2009;46(12):803-10.
  53. Suzuki T, Li W, Zhang Q, Karim A, Novak EK, Sviderskaya EV, et al. Hermansky-Pudlak syndrome is caused by mutations in HPS4, the human homolog of the mouse light-ear gene. *Nat Genet*. mars 2002;30(3):321-4.
  54. Power B, Ferreira CR, Chen D, Zein WM, O'Brien KJ, Introne WJ, et al. Hermansky-Pudlak syndrome and oculocutaneous albinism in Chinese children with pigmentation defects and easy bruising. *Orphanet J Rare Dis*. 21 2019;14(1):52.

55. Anderson PD, Huizing M, Claassen DA, White J, Gahl WA. Hermansky-Pudlak syndrome type 4 (HPS-4): clinical and molecular characteristics. *Hum Genet.* juill 2003;113(1):10-7.
56. Simon JD, Peles D, Wakamatsu K, Ito S. Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. *Pigment Cell & Melanoma Research.* 2009;22(5):563-79.
57. Lamoreux ML, Wakamatsu K, Ito S. Interaction of major coat color gene functions in mice as studied by chemical analysis of eumelanin and pheomelanin. *Pigment Cell Res.* févr 2001;14(1):23-31.
58. Lai X, Wichers HJ, Soler-Lopez M, Dijkstra BW. Structure and Function of Human Tyrosinase and Tyrosinase-Related Proteins. *Chemistry – A European Journal.* 2 janv 2018;24(1):47-55.
59. Eizirik E, Yuhki N, Johnson WE, Menotti-Raymond M, Hannah SS, O'Brien SJ. Molecular Genetics and Evolution of Melanism in the Cat Family. *Current Biology.* 4 mars 2003;13(5):448-53.
60. Beaumont KA, Shekar SN, Cook AL, Duffy DL, Sturm RA. Red hair is the null phenotype of MC1R. *Human Mutation.* 2008;29(8):E88-94.
61. Siracusa LD. The agouti gene: turned on to yellow. *Trends Genet.* déc 1994;10(12):423-8.
62. Jones MR, Mills LS, Alves PC, Callahan CM, Alves JM, Lafferty DJR, et al. Adaptive introgression underlies polymorphic seasonal camouflage in snowshoe hares. *Science.* 22 2018;360(6395):1355-8.
63. Tomita Y, Takeda A, Okinaga S, Tagami H, Shibahara S. Human oculocutaneous albinism caused by single base insertion in the tyrosinase gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 15 nov 1989;164(3):990-6.
64. Hertle RW. Albinism: Particular attention to the ocular motor system. *Middle East African Journal of Ophthalmology.* 7 janv 2013;20(3):248.
65. 000058 - B6(Cg)-Tyr<c-2J>/J [Internet]. [cité 23 janv 2021]. Disponible sur: <https://www.jax.org/strain/000058>
66. Marti A, Lasseaux E, Ezzedine K, Léauté-Labrèze C, Boralevi F, Paya C, et al. Lessons of a day hospital: Comprehensive assessment of patients with albinism in a European setting. *Pigment Cell Melanoma Res.* 5 janv 2018;n/a-n/a.
67. Monfermé S, Lasseaux E, Duncombe-Poulet C, Hamel C, Defoort-Dhellemmes S, Drumare I, et al. Mild form of oculocutaneous albinism type 1: phenotypic analysis of compound heterozygous patients with the R402Q variant of the TYR gene. *Br J Ophthalmol.* sept 2019;103(9):1239-47.
68. Tripathi RK, Giebel LB, Strunk KM, Spritz RA. A polymorphism of the human tyrosinase gene is associated with temperature-sensitive enzymatic activity. *Gene Expr.* mai 1991;1(2):103-10.

69. Grønskov K, Jespersgaard C, Bruun GH, Harris P, Brøndum-Nielsen K, Andresen BS, et al. A pathogenic haplotype, common in Europeans, causes autosomal recessive albinism and uncovers missing heritability in OCA1. *Sci Rep* [Internet]. 24 janv 2019 [cité 14 nov 2020];9. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6345944/>
70. Wang T, Waters CT, Jakins T, Yates JRW, Trump D, Bradshaw K, et al. Temperature sensitive oculocutaneous albinism associated with missense changes in the tyrosinase gene. *British Journal of Ophthalmology*. 1 oct 2005;89(10):1383-4.
71. Phenotype Image Detail - Himalayan [Internet]. [cité 23 janv 2021]. Disponible sur: <http://www.informatics.jax.org/image/MGI:3771025>
72. Le L, Escobar IE, Ho T, Lefkovith AJ, Latteri E, Haltaufderhyde KD, et al. SLC45A2 protein stability and regulation of melanosome pH determine melanocyte pigmentation. *Mol Biol Cell*. 15 2020;31(24):2687-702.
73. Marti A, Lasseaux E, Ezzedine K, Léauté-Labrèze C, Boralevi F, Paya C, et al. Lessons of a day hospital: Comprehensive assessment of patients with albinism in a European setting. *Pigment Cell & Melanoma Research*. 2018;31(2):318-29.
74. Oca2<p-18J> Spontaneous Allele Detail MGI Mouse (MGI:4999725) [Internet]. [cité 23 janv 2021]. Disponible sur: <http://www.informatics.jax.org/allele/MGI:4999725>
75. Rinchik EM, Bultman SJ, Horsthemke B, Lee ST, Strunk KM, Spritz RA, et al. A gene for the mouse pink-eyed dilution locus and for human type II oculocutaneous albinism. *Nature*. 7 janv 1993;361(6407):72-6.
76. Boissy RE, Zhao H, Oetting WS, Austin LM, Wildenberg SC, Boissy YL, et al. Mutation in and lack of expression of tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) in melanocytes from an individual with brown oculocutaneous albinism: a new subtype of albinism classified as « OCA3 ». *Am J Hum Genet*. juin 1996;58(6):1145-56.
77. Manga P, Kromberg JG, Box NF, Sturm RA, Jenkins T, Ramsay M. Rufous oculocutaneous albinism in southern African Blacks is caused by mutations in the TYRP1 gene. *Am J Hum Genet*. nov 1997;61(5):1095-101.
78. Rooryck C, Roudaut C, Robine E, Müsebeck J, Arveiler B. Oculocutaneous albinism with TYRP1 gene mutations in a Caucasian patient. *Pigment Cell Research*. 1 juin 2006;19(3):239-42.
79. Phenotype Image Detail-brown [Internet]. [cité 23 janv 2021]. Disponible sur: <http://www.informatics.jax.org/image/MGI:5609800>
80. Newton JM, Cohen-Barak O, Hagiwara N, Gardner JM, Davisson MT, King RA, et al. Mutations in the Human Orthologue of the Mouse underwhite Gene (uw) Underlie a New Form of Oculocutaneous Albinism, OCA4. *Am J Hum Genet*. nov 2001;69(5):981-8.
81. Bennett DC, Lamoreux ML. The Color Loci of Mice – A Genetic Century. *Pigment Cell Research*. 1 août 2003;16(4):333-44.

82. Kausar T, Bhatti MA, Ali M, Shaikh RS, Ahmed ZM. OCA5, a novel locus for non-syndromic oculocutaneous albinism, maps to chromosome 4q24. *Clinical Genetics*. 2013;84(1):91-3.
83. Wei A-H, Zang D-J, Zhang Z, Liu X-Z, He X, Yang L, et al. Exome sequencing identifies SLC24A5 as a candidate gene for nonsyndromic oculocutaneous albinism. *J Invest Dermatol*. juill 2013;133(7):1834-40.
84. Lamason RL, Mohideen M-APK, Mest JR, Wong AC, Norton HL, Aros MC, et al. SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. *Science*. 16 déc 2005;310(5755):1782-6.
85. Zhang Z, Gong J, Sviderskaya EV, Wei A, Li W. Mitochondrial NCKX5 regulates melanosomal biogenesis and pigment production. *J Cell Sci*. 15 2019;132(14).
86. Morice-Picard F, Lasseaux E, François S, Simon D, Rooryck C, Bieth E, et al. SLC24A5 mutations are associated with non-syndromic oculocutaneous albinism. *J Invest Dermatol*. févr 2014;134(2):568-71.
87. Grønskov K, Dooley CM, Østergaard E, Kelsh RN, Hansen L, Levesque MP, et al. Mutations in c10orf11, a melanocyte-differentiation gene, cause autosomal-recessive albinism. *Am J Hum Genet*. 7 mars 2013;92(3):415-21.
88. Tian X, Cui Z, Liu S, Zhou J, Cui R. Melanosome transport and regulation in development and disease. *Pharmacology & Therapeutics*. 17 oct 2020;107707.
89. Gele MV, Dynoodt P, Lambert J. Griscelli syndrome: a model system to study vesicular trafficking. *Pigment Cell & Melanoma Research*. 2009;22(3):268-82.
90. Phenotype Image Detail-GS [Internet]. [cité 23 janv 2021]. Disponible sur: <http://www.informatics.jax.org/image/MGI:3587262>
91. Ménasché G, Ho CH, Sanal O, Feldmann J, Tezcan I, Ersoy F, et al. Griscelli syndrome restricted to hypopigmentation results from a melanophilin defect (GS3) or a *MYO5A* F-exon deletion (GS1). *J Clin Invest*. 1 août 2003;112(3):450-6.
92. Elmaksoud MSA, Gomaa NS, Azouz HG, On CNV, Ho CT, Omar TE, et al. Genetic analysis in three Egyptian patients with Griscelli syndrome Type 1 reveals new nonsense mutations in *MYO5A*. *Clinical and Experimental Dermatology*. 2020;45(6):789-92.
93. Lipsker D. Haemophagocytic lymphohistiocytosis and silvery hair in Griscelli syndrome. *British Journal of Haematology*. 2016;175(1):11-11.
94. Nouriel A, Zisquit J, Helfand AM, Anikster Y, Greenberger S. Griscelli Syndrome Type 3: Two New Cases and Review of the Literature. *Pediatr Dermatol*. déc 2015;32(6):e245-248.
95. Société française d'ophtalmologie, Dufier J-L, Kaplan J. Oeil et génétique: [rapport présenté à la] Société française d'ophtalmologie. Issy-les-Moulineaux: Masson; 2005.

96. Falk N, Lösl M, Schröder N, Gießl A. Specialized Cilia in Mammalian Sensory Systems. *Cells*. sept 2015;4(3):500-19.
97. Les Mécanismes de la vision. Pour la science; 1990. 186 p.
98. Storm T, Burgoyne T, Futter CE. Membrane trafficking in the retinal pigment epithelium at a glance. *J Cell Sci* [Internet]. 15 août 2020 [cité 11 oct 2020];133(16). Disponible sur: <https://jcs-biologists-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/content/133/16/jcs238279>
99. Embryologie de l'oeil [Internet]. SNOF. [cité 20 janv 2021]. Disponible sur: <https://www.snof.org/encyclopedie/embryologie-de-loeil>
100. Bassi MT, Schiaffino MV, Renieri A, De Nigris F, Galli L, Bruttini M, et al. Cloning of the gene for ocular albinism type 1 from the distal short arm of the X chromosome. *Nat Genet*. mai 1995;10(1):13-9.
101. McKay BS. Pigmentation and Vision: Is GPR143 in Control? *J Neurosci Res*. janv 2019;97(1):77-87.
102. Lavado A, Jeffery G, Tovar V, de la Villa P, Montoliu L. Ectopic expression of tyrosine hydroxylase in the pigmented epithelium rescues the retinal abnormalities and visual function common in albinos in the absence of melanin. *J Neurochem*. févr 2006;96(4):1201-11.
103. Hägglund MGA, Hellsten SV, Bagchi S, Philippot G, Löfqvist E, Nilsson VCO, et al. Transport of l-Glutamine, l-Alanine, l-Arginine and l-Histidine by the Neuron-Specific Slc38a8 (SNAT8) in CNS. *Journal of Molecular Biology*. 27 mars 2015;427(6, Part B):1495-512.
104. Kuhl HJ, Han J, Maconachie GDE, Park SE, Lee S-T, McLean R, et al. SLC38A8 mutations result in arrested retinal development with loss of cone photoreceptor specialization. *Hum Mol Genet*. 4 nov 2020;29(18):2989-3002.
105. Martens MC, Emmert S, Boeckmann L. Sunlight, Vitamin D, and Xeroderma Pigmentosum. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1268:319-31.
106. albinism [Internet]. Patricia Willocq Photography. [cité 23 févr 2021]. Disponible sur: <https://patriciawillocq.wordpress.com/tag/albinism/>
107. Summers CG, Knobloch WH, Witkop CJ, King RA. Hermansky-Pudlak syndrome. Ophthalmic findings. *Ophthalmology*. avr 1988;95(4):545-54.
108. Käsmann-Kellner B, Ruprecht K-W. Albinismus. Klassifikation und klinisches Spektrum. *Z prakt Augenheilkd*. 1999;(20):195-203.
109. Thomas MG, Kumar A, Mohammad S, Proudlock FA, Engle EC, Andrews C, et al. Structural Grading of Foveal Hypoplasia Using Spectral Domain Optical Coherence Tomography; A Predictor of Visual Acuity? *Ophthalmology*. août 2011;118(8):1653-60.
110. Puzniak RJ, Ahmadi K, Kaufmann J, Gouws A, Morland AB, Pestilli F, et al. Quantifying nerve decussation abnormalities in the optic chiasm. *Neuroimage Clin* [Internet]. 1 nov

2019 [cité 28 déc 2020];24. Disponible sur:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6849426/>

111. Herrera E, García-Frigola C. Genetics and development of the optic chiasm. 2008 [cité 1 juill 2020]; Disponible sur: <https://digital.csic.es/handle/10261/62911>
112. Huizing M, Malicdan MCV, Gochuico BR, Gahl WA. Hermansky-Pudlak Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Stephens K, et al., éditeurs. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cité 25 juin 2020]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1287/>
113. Fiore M, Garcia C, Sié P, Favier R, Lavenu-Bombled C, Hurtaud M-F, et al. Déficit en granules denses plaquettaires : une cause sous-estimée de saignements inexplicés. *Hématologie*. 1 juill 2017;23(4):243-54.
114. Lasseaux E, Plaisant C, Michaud V, Pennamen P, Trimouille A, Gaston L, et al. Molecular characterization of a series of 990 index patients with albinism. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2018;31(4):466-74.
115. Jackson IJ, Chambers DM, Tsukamoto K, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, et al. A second tyrosinase-related protein, TRP-2, maps to and is mutated at the mouse slaty locus. *EMBO J*. févr 1992;11(2):527-35.
116. Mouse pictures of Dct alleles [Internet]. [cité 17 janv 2021]. Disponible sur: <http://www.espcr.org/micemut/locusdct.html>
117. Hellström AR, Watt B, Fard SS, Tenza D, Mannström P, Narfström K, et al. Inactivation of Pmel alters melanosome shape but has only a subtle effect on visible pigmentation. *PLoS Genet*. sept 2011;7(9):e1002285.
118. Clark LA, Wahl JM, Rees CA, Murphy KE. Retrotransposon insertion in SILV is responsible for merle patterning of the domestic dog. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 31 janv 2006;103(5):1376-81.
119. Giordano F, Bonetti C, Surace EM, Marigo V, Raposo G. The ocular albinism type 1 (OA1) G-protein-coupled receptor functions with MART-1 at early stages of melanogenesis to control melanosome identity and composition. *Hum Mol Genet*. 12 janv 2009;18(23):4530-45.
120. Aydin IT, Hummler E, Smit NPM, Beermann F. Coat color dilution in mice because of inactivation of the melanoma antigen MART-1. *Pigment Cell Melanoma Res*. janv 2012;25(1):37-46.
121. Suzuki T, Oiso N, Gautam R, Novak EK, Panthier J-J, Suprabha PG, et al. The mouse organellar biogenesis mutant buff results from a mutation in Vps33a, a homologue of yeast vps33 and Drosophila carnation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 4 févr 2003;100(3):1146-50.
122. Gissen P, Tee L, Johnson CA, Genin E, Caliebe A, Chitayat D, et al. Clinical and molecular genetic features of ARC syndrome. *Hum Genet*. oct 2006;120(3):396-409.

123. Vasilev F, Sukhomyasova A, Otomo T. Mucopolysaccharidosis-Plus Syndrome. *Int J Mol Sci* [Internet]. 9 janv 2020 [cité 1 nov 2020];21(2). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7013929/>
124. Phenotype Image Detail - buff [Internet]. Disponible sur: <http://www.informatics.jax.org/image/MGI:3587308>
125. Ciciotte SL, Gwynn B, Moriyama K, Huizing M, Gahl WA, Bonifacino JS, et al. Cappuccino, a mouse model of Hermansky-Pudlak syndrome, encodes a novel protein that is part of the pallidin-muted complex (BLOC-1). *Blood*. 1 juin 2003;101(11):4402-7.
126. Zhang Q, Li W, Novak EK, Karim A, Mishra VS, Kingsmore SF, et al. The gene for the muted (mu) mouse, a model for Hermansky-Pudlak syndrome, defines a novel protein which regulates vesicle trafficking. *Hum Mol Genet*. 15 mars 2002;11(6):697-706.
127. Hartwig C, Monis WJ, Chen X, Dickman DK, Pazour GJ, Faundez V. Neurodevelopmental disease mechanisms, primary cilia, and endosomes converge on the BLOC-1 and BORC complexes. *Developmental Neurobiology*. 15 juin 2018;78(3):311-30.
128. Ohbayashi N, Fukuda M. Recent advances in understanding the molecular basis of melanogenesis in melanocytes. *F1000Res*. 15 juin 2020;9:608.
129. Loftus SK, Larson DM, Baxter LL, Antonellis A, Chen Y, Wu X, et al. Mutation of melanosome protein RAB38 in chocolate mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2 avr 2002;99(7):4471-6.
130. Osanai K. Rab38 Mutation and the Lung Phenotype. *International Journal of Molecular Sciences*. août 2018;19(8):2203.
131. Aguilar A, Weber J, Boscher J, Freund M, Ziessel C, Eckly A, et al. Combined deficiency of RAB32 and RAB38 in the mouse mimics Hermansky-Pudlak syndrome and critically impairs thrombosis. *Blood Adv*. 13 août 2019;3(15):2368-80.
132. Detter JC, Zhang Q, Mules EH, Novak EK, Mishra VS, Li W, et al. Rab geranylgeranyl transferase alpha mutation in the gunmetal mouse reduces Rab prenylation and platelet synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 11 avr 2000;97(8):4144-9.
133. Liggins MC, Flesher JL, Jahid S, Vasudeva P, Eby V, Takasuga S, et al. PIKfyve regulates melanosome biogenesis. *PLoS Genet* [Internet]. 27 mars 2018 [cité 30 janv 2021];14(3). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5889185/>
134. Lenk GM, Szymanska K, Debska-Vielhaber G, Rydzanicz M, Walczak A, Bekiesinska-Figatowska M, et al. Biallelic Mutations of VAC14 in Pediatric-Onset Neurological Disease. *Am J Hum Genet*. 7 juill 2016;99(1):188-94.
135. Sulem P, Gudbjartsson DF, Stacey SN, Helgason A, Rafnar T, Jakobsdottir M, et al. Two newly identified genetic determinants of pigmentation in Europeans. *Nature Genetics*. juill 2008;40(7):835-7.

136. Ambrosio AL, Boyle JA, Aradi AE, Christian KA, Di Pietro SM. TPC2 controls pigmentation by regulating melanosome pH and size. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 17 mai 2016;113(20):5622-7.
137. Böck J, Krogsaeter E, Passon M, Chao Y-K, Sharma S, Grallert H, et al. Human genome diversity data reveal that L564P is the predominant TPC2 variant and a prerequisite for the blond hair associated M484L gain-of-function effect. *PLOS Genetics*. 19 janv 2021;17(1):e1009236.
138. Ripoll L, Heiligenstein X, Hurbain I, Domingues L, Figon F, Petersen KJ, et al. Myosin VI and branched actin filaments mediate membrane constriction and fission of melanosomal tubule carriers. *J Cell Biol*. 6 août 2018;217(8):2709-26.
139. Targeted Sequencing Approaches for NGS - FR [Internet]. [cité 17 janv 2021]. Disponible sur: [//www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/sequencing/sequencing-learning-center/next-generation-sequencing-information/ngs-basics/targeted-sequencing-approaches.html](http://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/sequencing/sequencing-learning-center/next-generation-sequencing-information/ngs-basics/targeted-sequencing-approaches.html)
140. Cullinane AR, Curry JA, Golas G, Pan J, Carmona-Rivera C, Hess RA, et al. A BLOC-1 mutation screen reveals a novel BLOC1S3 mutation in Hermansky-Pudlak Syndrome type 8. *Pigment Cell Melanoma Res*. sept 2012;25(5):584-91.
141. Li W, Zhang Q, Oiso N, Novak EK, Gautam R, O'Brien EP, et al. Hermansky-Pudlak syndrome type 7 (HPS-7) results from mutant dysbindin, a member of the biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 (BLOC-1). *Nature Genetics*. sept 2003;35(1):84-9.
142. Gu W, Zhang F, Lupski JR. Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics*. 3 nov 2008;1:4.
143. Moriyama K, Bonifacino JS. Pallidin is a component of a multi-protein complex involved in the biogenesis of lysosome-related organelles. *Traffic*. sept 2002;3(9):666-77.
144. Starcevic M, Dell'Angelica EC. Identification of Snapin and Three Novel Proteins (BLOS1, BLOS2, and BLOS3/Reduced Pigmentation) as Subunits of Biogenesis of Lysosome-related Organelles Complex-1 (BLOC-1)\*. *Journal of Biological Chemistry*. 2 juill 2004;279(27):28393-401.
145. Budd PS, Jackson IJ. Structure of the Mouse Tyrosinase-Related Protein-2/Dopachrome Tautomerase (Tyrrp2/Dct) Gene and Sequence of Two Novel Slaty Alleles. *Genomics*. 1 sept 1995;29(1):35-43.
146. Morgan NV, Pasha S, Johnson CA, Ainsworth JR, Eady RAJ, Dawood B, et al. A Germline Mutation in BLOC1S3/Reduced Pigmentation Causes a Novel Variant of Hermansky-Pudlak Syndrome (HPS8). *The American Journal of Human Genetics*. janv 2006;78(1):160-6.
147. Pennamen P, Le L, Tingaud-Sequeira A, Fiore M, Bauters A, Van Duong Béatrice N, et al. BLOC1S5 pathogenic variants cause a new type of Hermansky-Pudlak syndrome. *Genet Med*. 22 juin 2020;

148. Badolato R, Prandini A, Caracciolo S, Colombo F, Tabellini G, Giacomelli M, et al. Exome sequencing reveals a pallidin mutation in a Hermansky-Pudlak-like primary immunodeficiency syndrome. *Blood*. 29 mars 2012;119(13):3185-7.
149. Jordan T, Hanson I, Zaletayev D, Hodgson S, Prosser J, Seawright A, et al. The human PAX6 gene is mutated in two patients with aniridia. *Nature Genetics*. août 1992;1(5):328-32.
150. Lima Cunha D, Arno G, Corton M, Moosajee M. The Spectrum of PAX6 Mutations and Genotype-Phenotype Correlations in the Eye. *Genes (Basel)*. 17 2019;10(12).
151. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. mai 2015;17(5):405-24.
152. Pennamen P, Tingaud-Sequeira A, Gazova I, Keighren M, McKie L, Marlin S, et al. Dopachrome tautomerase variants in patients with oculocutaneous albinism. *Genet Med*. 26 oct 2020;
153. Arveiler B, Michaud V, Lasseaux E. Albinism: An Underdiagnosed Condition. *J Invest Dermatol*. juill 2020;140(7):1449-51.
154. Bertolotti A, Lasseaux E, Plaisant C, Trimouille A, Morice-Picard F, Rooryck C, et al. Identification of a homozygous mutation of SLC24A5 (OCA6) in two patients with oculocutaneous albinism from French Guiana. *Pigment Cell Melanoma Res*. 22 oct 2015;
155. Alliance G, ScreeningServices TNY-M-AC for G and N. PSYCHOLOGICAL AND SOCIAL IMPLICATIONS [Internet]. *Understanding Genetics: A New York, Mid-Atlantic Guide for Patients and Health Professionals*. Genetic Alliance; 2009 [cité 11 févr 2021]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK115570/>
156. Snouwaert JN, Church RJ, Jania L, Nguyen M, Wheeler ML, Saintsing A, et al. A Mutation in the Borsc7 Subunit of the Lysosome Regulatory BORC Complex Results in Motor Deficits and Dystrophic Axonopathy in Mice. *Cell Reports*. 31 juill 2018;24(5):1254-65.
157. Krause A, Seymour H, Ramsay M. Common and Founder Mutations for Monogenic Traits in Sub-Saharan African Populations. *Annu Rev Genom Hum Genet*. 31 août 2018;19(1):149-75.
158. Hutton SM, Spritz RA. Comprehensive analysis of oculocutaneous albinism among non-Hispanic caucasians shows that OCA1 is the most prevalent OCA type. *J Invest Dermatol*. oct 2008;128(10):2442-50.
159. Michaud V. Analyses démographiques, phénotypiques et génétiques d'une cohorte de 692 patients atteints d'albinisme. 12 avr 2019;111.
160. Moisan S, Berlivet S, Ka C, Gac GL, Dostie J, Férec C. Analysis of long-range interactions in primary human cells identifies cooperative CFTR regulatory elements. *Nucleic Acids Res*. 7 avr 2016;44(6):2564-76.

161. Cairns J, Freire-Pritchett P, Wingett SW, Várnai C, Dimond A, Plagnol V, et al. CHiCAGO: robust detection of DNA looping interactions in Capture Hi-C data. *Genome Biol* [Internet]. 15 juin 2016 [cité 14 févr 2021];17. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4908757/>
162. Beagan JA, Phillips-Cremens JE. On the existence and functionality of topologically associating domains. *Nat Genet.* janv 2020;52(1):8-16.
163. Zhao M, Wang Q, Wang Q, Jia P, Zhao Z. Computational tools for copy number variation (CNV) detection using next-generation sequencing data: features and perspectives. *BMC Bioinformatics.* 2013;14 Suppl 11:S1.
164. Morice-Picard F, Lasseaux E, Cailley D, Gros A, Toutain J, Plaisant C, et al. High-resolution array-CGH in patients with oculocutaneous albinism identifies new deletions of the TYR, OCA2, and SLC45A2 genes and a complex rearrangement of the OCA2 gene. *Pigment Cell & Melanoma Research.* 2014;27(1):59-71.
165. Jiang Y, Wang Y, Brudno M. PRISM: pair-read informed split-read mapping for base-pair level detection of insertion, deletion and structural variants. *Bioinformatics.* 15 oct 2012;28(20):2576-83.
166. Seruggia D, Fernández A, Cantero M, Pelczar P, Montoliu L. Functional validation of mouse tyrosinase non-coding regulatory DNA elements by CRISPR–Cas9-mediated mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 26 mai 2015;43(10):4855-67.
167. Bin B-H, Bhin J, Yang SH, Shin M, Nam Y-J, Choi D-H, et al. Membrane-Associated Transporter Protein (MATP) Regulates Melanosomal pH and Influences Tyrosinase Activity. *PLoS One* [Internet]. 9 juin 2015 [cité 24 nov 2015];10(6). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4461305/>
168. Wai H, Douglas AGL, Baralle D. RNA splicing analysis in genomic medicine. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 1 mars 2019;108:61-71.
169. Cullot G, Boutin J, Toutain J, Prat F, Pennamen P, Rooryck C, et al. CRISPR-Cas9 genome editing induces megabase-scale chromosomal truncations. *Nat Commun.* 8 mars 2019;10(1):1136.
170. Netchine I, Rossignol S, Azzi S, Brioude F, Le Bouc Y. Imprinted anomalies in fetal and childhood growth disorders: the model of Russell-Silver and Beckwith-Wiedemann syndromes. *Endocr Dev.* 2012;23:60-70.
171. Higashimoto K, Soejima H, Yatsuki H, Joh K, Uchiyama M, Obata Y, et al. Characterization and imprinting status of OBPH1/Obph1 gene: implications for an extended imprinting domain in human and mouse. *Genomics.* déc 2002;80(6):575-84.
172. Génodermatoses [Internet]. PFMG 2025. [cité 14 févr 2021]. Disponible sur: <https://pfm2025.aviesan.fr/professionnels/pre-indications-et-mise-en-place/genodermatoses/>

173. Pathologies Plaquettaires Constitutionnelles [Internet]. PFMG 2025. [cité 20 févr 2021]. Disponible sur: <https://pfm2025.aviesan.fr/professionnels/pre-indications-et-mise-en-place/pathologies-plaquettaires-constitutionnelles/>
174. Ehrenberg M, Bagdonite-Bejarano L, Fulton AB, Orenstein N, Yahalom C. Genetic causes of nystagmus, foveal hypoplasia and subnormal visual acuity- other than albinism. *Ophthalmic Genetics*. 17 févr 2021;0(0):1-9.
175. Michaud V, Defoort-Dhellemmes S, Drumare I, Pennamen P, Plaisant C, Lasseaux E, et al. Clinical and molecular findings of FRMD7 related congenital nystagmus as a differential diagnosis of ocular albinism. *Ophthalmic Genetics*. 4 mars 2019;40(2):161-4.
176. Mason C, Guillery R. Conversations with Ray Guillery on albinism: linking Siamese cat visual pathway connectivity to mouse retinal development. *European Journal of Neuroscience*. 2019;49(7):913-27.

## ANNEXE 1 – Liste des gènes candidats

<i>Gène</i>	<i>Numéro OMIM</i>	<i>Nom intégral OMIM</i>	<i>Synonyme/autre nom OMIM</i>	<i>Position Chromosomique GRCh38</i>
<i>ABCB6</i>	*605452	ATP-BINDING CASSETTE, SUBFAMILY B, MEMBER 6	MITOCHONDRIAL ABC PROTEIN 3; MTABC3	2:219,209,765-219,219,016
<i>ANKRD27</i>	*618957	ANKYRIN REPEAT DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 27	VPS9 DOMAIN- AND ANKYRIN REPEAT DOMAIN-CONTAINING PROTEIN	19:32,597,004-32,675,214
<i>ANXA2</i>	*151740	ANNEXIN A2	ANNEXIN II; ANX2 LIPOCORTIN II; LPC2; LIP2	15:60,347,150-60,398,024
<i>AP1B1</i>	*600157	ADAPTOR-RELATED PROTEIN COMPLEX 1, BETA-1 SUBUNIT	ADAPTIN, BETA-1; ADTB1 ADAPTIN, BETA-PRIME BETA-ADAPTIN- MENINGIOMA GENE ON CHROMOSOME 22; BAM22	22:29,327,679-29,388,582
<i>AP1G1</i>	*603533	ADAPTOR-RELATED PROTEIN COMPLEX 1, GAMMA-1 SUBUNIT;	ADAPTIN, GAMMA; ADTG CLATHRIN- ASSOCIATED/ASSEMBLY/A DAPTOR PROTEIN, LARGE, GAMMA-1; CLAPG1	16:71,728,999-71,809,072
<i>AP1G2</i>	*603534	ADAPTOR-RELATED PROTEIN COMPLEX 1, GAMMA-2 SUBUNIT	ADAPTIN, GAMMA-2 CLATHRIN- ASSOCIATED/ASSEMBLY/A DAPTOR PROTEIN, LARGE, GAMMA-2	14:23,559,562-23,567,938
<i>AP1M1</i>	*603535	ADAPTOR-RELATED PROTEIN COMPLEX 1, MU-1 SUBUNIT	CLATHRIN ASSEMBLY PROTEIN COMPLEX AP1, MU SUBUNIT CLATHRIN ADAPTOR PROTEIN AP47; AP47 MU-1A	19:16,197,853-16,235,344
<i>AP1M2</i>	*607309	ADAPTOR-RELATED PROTEIN COMPLEX 1, MU-2 SUBUNIT	MU-1B	19:10,572,670-10,587,314
<i>AP1S1</i>	*603531	ADAPTOR-RELATED PROTEIN COMPLEX 1, SIGMA-1 SUBUNIT	CLATHRIN- ASSOCIATED/ASSEMBLY/A DAPTOR PROTEIN, SMALL 1; CLAPS1  CLATHRIN ADAPTOR PROTEIN 19; AP19	7:101,154,397-101,161,276

<i>AP1S2</i>	*300629	ADAPTOR-RELATED PROTEIN COMPLEX 1, SIGMA-2 SUBUNIT;	CLATHRIN-ASSOCIATED/ASSEMBLY/ADAPTOR PROTEIN, SMALL 1-LIKE CLATHRIN ADAPTOR COMPLEX AP1, SIGMA-1B SUBUNIT	X:15,825,805-15,855,013
<i>AP1S3</i>	*615781	ADAPTOR-RELATED PROTEIN COMPLEX 1, SIGMA-3 SUBUNIT	ADAPTOR PROTEIN COMPLEX 1, SIGMA-1C SUBUNIT	2:223,755,329-223,837,601
<i>AP3B2</i>	*602166	ADAPTOR-RELATED PROTEIN COMPLEX 3, BETA-2 SUBUNIT	ADAPTOR-RELATED PROTEIN COMPLEX 3B, NEURON-SPECIFIC, BETA-3B AP3B, BETA-3B NEURONAL ADAPTIN-LIKE PROTEIN, BETA SUBUNIT; NAPTB	15:82,659,280-82,709,907
<i>AP3D1</i>	*607246	ADAPTOR-RELATED PROTEIN COMPLEX 3, DELTA-1 SUBUNIT	ADAPTIN, DELTA GARNET, DROSOPHILA, HOMOLOG OF MOCHA, MOUSE, HOMOLOG OF	19:2,100,987-2,151,625
<i>AP3M1</i>	*610366	ADAPTOR-RELATED PROTEIN COMPLEX 3, MU-1 SUBUNIT	CLATHRIN ADAPTOR COMPLEX AP3, MU-3A SUBUNIT	10:74,120,011-74,151,084
<i>AP3M2</i>	*610469	ADAPTOR-RELATED PROTEIN COMPLEX 3, MU-2 SUBUNIT	CLATHRIN ADAPTOR COMPLEX AP3, MU-3B SUBUNIT  CLA20	8:42,152,945-42,171,182
<i>AP3S1</i>	*601507	ADAPTOR-RELATED PROTEIN COMPLEX 3, SIGMA-1 SUBUNIT	CLATHRIN-ASSOCIATED/ASSEMBLY/ADAPTOR PROTEIN, SMALL 3, 22-KD; CLAPS3  CLATHRIN ADAPTOR COMPLEX AP3, SIGMA-3A SUBUNIT	5:115,841,605-115,914,080
<i>AP3S2</i>	*602416	ADAPTOR-RELATED PROTEIN COMPLEX 3, SIGMA-2 SUBUNIT	CLATHRIN-ASSOCIATED/ASSEMBLY/ADAPTOR PROTEIN, SMALL 4, 22-KD  CLATHRIN ADAPTOR COMPLEX AP3, SIGMA-3B SUBUNIT	15:89,830,598-89,893,993
<i>APOE</i>	*107741	APOLIPOPROTEIN E	/	19:44,905,795-44,909,394

<i>APP</i>	#605714	AMYLOID BETA A4 PRECURSOR PROTEIN	AMYLOID OF AGING AND ALZHEIMER DISEASE; AAA  CEREBRAL VASCULAR AMYLOID PEPTIDE; CVAP  PROTEASE NEXIN II; PN2	21:25,880,549-26,171,127
<i>ATP6V1C1</i>	*603097	ATPase, H+ TRANSPORTING, LYSOSOMAL, 42-KD, V1 SUBUNIT C, ISOFORM 1	ATPase, H+ TRANSPORTING, LYSOSOMAL, SUBUNIT C; ATP6C  VACUOLAR PROTON PUMP, 42-KD SUBUNIT  V-ATPase, SUBUNIT C  ATPase, H+ TRANSPORTING, LYSOSOMAL, SUBUNIT D, FORMERLY; ATP6D, FORMERLY	8:103,021,082-103,073,050
<i>ATP7A</i>	*300011	ATPase, Cu(2+)-TRANSPORTING, ALPHA POLYPEPTIDE	/	X:77,910,655-78,050,394
<i>BACE1</i>	*604252	BETA-SITE AMYLOID BETA A4 PRECURSOR PROTEIN-CLEAVING ENZYME 1	BETA-SITE APP-CLEAVING ENZYME; BACE  SECRETASE, BETA  MEMAP SIN 2	11:117,285,206-117,316,255
<i>BACE2</i>	*605668	BETA-SITE AMYLOID BETA A4 PRECURSOR PROTEIN-CLEAVING ENZYME 2	BETA-SITE APP-CLEAVING ENZYME 2  ASPARTIC-LIKE PROTEASE, 56-KD; ALP56  DOWN SYNDROME REGION ASPARTIC PROTEASE; DRAP	21:41,168,159-41,282,529
<i>BLOC1S1</i>	*601444	BIOGENESIS OF LYSOSOME-RELATED ORGANELLES COMPLEX 1, SUBUNIT 1	BLOC1, SUBUNIT 1; BLOS1 GCN5-LIKE 1; GCN5L1	12:55,716,033-55,719,706
<i>BLOC1S4</i>	*605695	BIOGENESIS OF LYSOSOME-RELATED ORGANELLES COMPLEX 1, SUBUNIT 4	BLOC1, SUBUNIT 4; BLOS4  CAPPUCCINO, MOUSE, HOMOLOG OF; CNO	4:6,716,173-6,717,663

<i>BLOC1S5</i>	*607289	BIOGENESIS OF LYSOSOME-RELATED ORGANELLES COMPLEX 1, SUBUNIT 5	BLOC1, SUBUNIT 5; BLOS5  MUTED, MOUSE, HOMOLOG OF; MUTED	6:8,013,566-8,064,413
<i>BNC2</i>	*608669	BASONUCLIN 2	/	9:16,409,502-16,870,669
<i>CAVI</i>	*601047	CAVEOLIN 1	CAVEOLAE PROTEIN, 22-KD; CAV	7:116,525,008-116,561,184
<i>CAV2</i>	*601048	CAVEOLIN 2	CAVEOLAE PROTEIN, 20-KD	7:116,499,737-116,508,540
<i>CD63</i>	*155740	CD63 ANTIGEN	MELANOMA-ASSOCIATED ANTIGEN MLA1; MLA1  MELANOMA-ASSOCIATED ANTIGEN ME491  GRANULOPHYSIN	12:55,725,322-55,729,672
<i>DCT</i>	*191275	DOPACHROME TAUTOMERASE	TYROSINASE-RELATED PROTEIN 2	13:94,436,810-94,549,405
<i>DOCK7</i>	*615730	DEDICATOR OF CYTOKINESIS 7	KIAA1771	1:62,454,725-62,688,385
<i>EDNI</i>	131240	ENDOTHELIN 1	ET1	6:12,256,462-12,297,19
<i>EHD2</i>	*605890	EH DOMAIN-CONTAINING 2	/	19:47,713,421-47,743,133
<i>ERC1</i>	*607127	ELKS/RAB6-INTERACTING/CAST FAMILY, MEMBER 1	RAB6-INTERACTING PROTEIN 2; RAB6IP2 ELKS GENE; ELKS KIAA1081	12:1099675-1605099
<i>FIG4</i>	*609390	FIG4 PHOSPHOINOSITIDE 5-PHOSPHATASE	FIG4, S. CEREVISIAE, HOMOLOG OF SAC DOMAIN-CONTAINING INOSITOL PHOSPHATASE 3; SAC3 KIAA0274	6:109,691,295-109,825,430
<i>FRMD7</i>	*300628	FERM DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 7	/	X:132,074,925-132,128,019
<i>GNAI3</i>	*139370	GUANINE NUCLEOTIDE-BINDING PROTEIN, ALPHA-INHIBITING ACTIVITY POLYPEPTIDE 3	G PROTEIN, ALPHA-INHIBITING 3	1:109,548,614-109,600,194

<i>GPNMB</i>	*604368	GLYCOPROTEIN NON-METASTATIC PROTEIN B	NMB	7:23,246,765-23,275,109
<i>ITPR1</i>	*147265	INOSITOL 1,4,5- TRIPHOSPHATE RECEPTOR, TYPE 1	IP3R IP3R1	3:4,493,347-4,847,505
<i>KIF13A</i>	*605433	KINESIN FAMILY MEMBER 13A	/	6:17,759,182-17,987,634
<i>KIF13B</i>	*607350	KINESIN FAMILY MEMBER 13B	GUANYLATE KINASE- ASSOCIATED KINESIN; GAKIN KIAA0639	8:29,067,277-29,263,384
<i>KIF17</i>	*605037	KINESIN FAMILY MEMBER 17	KIAA1405	1:20,664,013-20,718,006
<i>KXDL1</i>	*615178	KXDL MOTIF- CONTAINING PROTEIN 1	CHROMOSOME 19 OPEN READING FRAME 50; C19ORF50	19:18,557,761-18,569,386
<i>LGALS3</i>	*153619	LECTIN, GALACTOSIDE- BINDING, SOLUBLE, 3	MACROPHAGE GALACTOSE-SPECIFIC LECTIN; MAC2 GALACTOSIDE-BINDING PROTEIN; GALBP GALECTIN 3; GAL3	14:55,129,251-55,145,429
<i>MCOLN1</i>	*605248	MUCOLIPIN 1	ML4 GENE MUCOLIPIDIN TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL CATION CHANNEL, MUCOLIPIN SUBFAMILY, MEMBER 1; TRPML1	19:7,522,623-7,534,008
<i>MCOLN3</i>	*607400	MUCOLIPIN 3	TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL CATION CHANNEL, MUCOLIPIN SUBFAMILY, MEMBER 3; TRPML3	1:85,018,081-85,048,901
<i>MFN1</i>	*608506	MITOFUSIN 1		3:179065480-179112719
<i>MFN2</i>	*608507	MITOFUSIN 2	KIAA0214	1:11,980,180-12,013,514
<i>MICU1</i>	*605084	MITOCHONDRIAL CALCIUM UPTAKE PROTEIN 1	CALCIUM-BINDING ATOPY- RELATED AUTOANTIGEN 1; CBARA1	10:72,367,325-72,626,190
<i>MICU2</i>	*610632	MITOCHONDRIAL CALCIUM UPTAKE PROTEIN 2	EF-HAND DOMAIN FAMILY, MEMBER A1; EFHA1	13:21,492,690-21,604,204
<i>MIR203</i>	*611899	MICRO RNA 203	miRNA203 MIRN203	14:104,117,404- 104,117,513

<i>MIR3196</i>	NA	microRNA 3196	hsa-mir-3196	20:63238779-63238842
<i>MKLN1</i>	*605623	MUSKELIN 1	TWO-HYBRID-ASSOCIATED PROTEIN WITH RANBPM 2; TWA2	7:131,110,093- 131,496,636
<i>MLANA</i>	*605513	MELAN A	MELANOMA ANTIGEN RECOGNIZED BY T CELLS 1; MART1	9:5,890,888-5,910,605
<i>MYO6</i>	*600970	MYOSIN VI	MYOSIN VI	6:75,749,202-75,919,536
<i>NPC1</i>	*607623	NPC INTRACELLULAR CHOLESTEROL TRANSPORTER 1	NPC1 GENE	18:23,506,183-23,586,505
<i>OPTN</i>	*602432	OPTINEURIN	14.7K-INTERACTING PROTEIN; FIP2 HYPL  TRANSCRIPTION FACTOR IIIA-INTERACTING PROTEIN TFIIIA-INTP  NEMO-RELATED PROTEIN; NRP GLC1E GENE	10:13,100,081-13,138,307
<i>ORAI1</i>	*610277	ORAI CALCIUM RELEASE- ACTIVATED CALCIUM MODULATOR 1	CALCIUM RELEASE- ACTIVATED CALCIUM MODULATOR 1; CRACM1  TRANSMEMBRANE PROTEIN 142A; TMEM142A	12:121,626,549- 121,642,039
<i>OSBP</i>	*167040	OXYSTEROL- BINDING PROTEIN	OSBP1	11:59,574,397-59,615,773
<i>OSBPL1A</i>	*606730	OXYSTEROL- BINDING PROTEIN- LIKE PROTEIN 1A	OSBP-RELATED PROTEIN 1; ORP1 OSBPL1B	18:24,162,044-24,397,881
<i>OSBPL3</i>	*606732	OXYSTEROL- BINDING PROTEIN- LIKE PROTEIN 3	OSBP-RELATED PROTEIN 3; ORP3 KIAA0704	7:24,796,536-24,980,217
<i>OSBPL5</i>	*606733	OXYSTEROL- BINDING PROTEIN- LIKE PROTEIN 5	OSBP-RELATED PROTEIN 5; ORP5 KIAA1534 OBPH1	11:3,087,106-3,165,309
<i>OSBPL8</i>	*606736	OXYSTEROL- BINDING PROTEIN- LIKE PROTEIN 8	OSBP-RELATED PROTEIN 8; ORP8 KIAA1451	12:76,351,796-76,559,804

<i>PACSIN2</i>	*604960	PROTEIN KINASE C AND CASEIN KINASE SUBSTRATE IN NEURONS 2		22:42,869,765-43,015,148
<i>PAX6</i>	*607108	PAIRED BOX GENE 6		11:31,789,025-31,817,960
<i>PI4K2A</i>	*609763	PHOSPHATIDYLINOSITOL 4-KINASE, TYPE 2, ALPHA	PHOSPHATIDYLINOSITOL 4-KINASE, TYPE II PI4KII PI4KII-ALPHA	10:97,640,685-97,676,433
<i>PIKFYVE</i>	*609414	PHOSPHOINOSITIDE KINASE, FYVE FINGER-CONTAINING	PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-PHOSPHATE 5-KINASE, TYPE III; PIP5K3 FAB1, S. CEREVISIAE, HOMOLOG OF; FAB1 KIAA0981	2:208,266,177-208,358,746
<i>PMEL</i>	*155550	PREMELANOSOMAL PROTEIN	SILVER, MOUSE, HOMOLOG OF; SILV PREMELANOSOMAL PROTEIN; PMEL GP100 ME20	12:55,954,104-55,966,708
<i>PPARA</i>	+170998	PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR-ALPHA	PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR	22:46,150,525-46,243,755
<i>PPARGC1A</i>	*604517	PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR-GAMMA, COACTIVATOR 1, ALPHA	PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR-GAMMA, COACTIVATOR 1; PPARGC1 PPAR-GAMMA COACTIVATOR 1-ALPHA; PGC1A PGC1-ALPHA PPAR-GAMMA COACTIVATOR 1; PGC1	4:23,792,020-24,472,904
<i>PRKCB</i>	*176970	PROTEIN KINASE C, BETA	PRKCB1 PKCB	16:23,835,982-24,220,610
<i>PSD</i>	*602327	PLECKSTRIN AND SEC7 DOMAINS-CONTAINING PROTEIN	TYL EXCHANGE FACTOR FOR ARF6; EFA6 EFA6A	10:102,402,618-102,420,163
<i>PSEN1</i>	*104311	PRESENILIN 1	PS1 S182	14:73,136,435-73,223,690
<i>PSEN2</i>	*600759	PRESENILIN 2	PS2 STM2	1:226,870,593-226,903,828

<i>RAB11A</i>	*605570	RAS-ASSOCIATED PROTEIN RAB11A	/	15:65,869,490-65,891,988
<i>RAB11B</i>	*604198	RAS-ASSOCIATED PROTEIN RAB11B	/	19:8,390,359-8,404,433
<i>RAB22A</i>	*612966	RAS-ASSOCIATED PROTEIN RAB22A	/	20:58,309,714-58,367,506
<i>RAB24</i>	*612415	RAS-ASSOCIATED PROTEIN 24	/	5:177,301,197-177,303,718
<i>RAB25</i>	*612942	RAS-ASSOCIATED PROTEIN RAB25	RAB11C	1:156,061,159-156,070,503
<i>RAB27A</i>	*603868	RAS-ASSOCIATED PROTEIN RAB27A	RAB27 RAS-RELATED GENE FROM MEGAKARYOCYTE; RAM	15:55,202,965-55,291,337
<i>RAB30</i>	*605693	RAS-ASSOCIATED PROTEIN RAB30	/	11:82,973,132-83,071,896
<i>RAB31</i>	*605694	RAS-ASSOCIATED PROTEIN RAB31	/	18:9,708,186-9,862,550
<i>RAB32</i>	*612906	RAS-ASSOCIATED PROTEIN RAB32	/	6:146,543,832-146,554,952
<i>RAB38</i>	*606281	RAS-ASSOCIATED PROTEIN RAB38	/	11:87,809,489-88,175,503
<i>RAB6A</i>	*179513	RAS-ASSOCIATED PROTEIN RAB6A	RAS-ASSOCIATED PROTEIN RAB6; RAB6	11:73,675,637-73,761,073
<i>RAB7</i>	*602298	RAS-ASSOCIATED PROTEIN RAB7	/	3:128,726,182-128,814,797
<i>RAB8A</i>	*165040	RAS-ASSOCIATED PROTEIN RAB8	RAS-ASSOCIATED PROTEIN RAB8A; RAB8A ONCOGENE MEL; MEL	19:16,111,888-16,134,233
<i>RAB9</i>	*300284	RAS-ASSOCIATED PROTEIN RAB9	RAB9A	X:13,689,127-13,710,503
<i>RABGGTA</i>	*601905	RAB GERANYLGERANYL TRANSFERASE, ALPHA SUBUNIT	/	14:24,265,537-24,271,626
<i>SDCBP</i>	*602217	SYNDECAN-BINDING PROTEIN	SYNTENIN PRO-TGF-ALPHA CYTOPLASMIC DOMAIN- INTERACTING PROTEIN 18; TACIP18 MELANOMA DIFFERENTIATION- ASSOCIATED GENE 9; MDA9	8:58,553,260-58,582,859

<i>SLC35D3</i>	*612519	SOLUTE CARRIER FAMILY 35, MEMBER D3	/	6:136,922,300-136,925,659
<i>SLC4A5</i>	*606757	SOLUTE CARRIER FAMILY 4 (SODIUM BICARBONATE COTRANSPORTER), MEMBER 5	SODIUM BICARBONATE COTRANSPORTER 4; NBC4	2:74,216,241-74,343,415
<i>SLC4A8</i>	*605024	SOLUTE CARRIER FAMILY 4 (SODIUM BICARBONATE COTRANSPORTER), MEMBER 8	KIAA0739 KNBC3	12:51,391,316-51,515,762
<i>SLC7A11</i>	*605024	SOLUTE CARRIER FAMILY 4 (SODIUM BICARBONATE COTRANSPORTER), MEMBER 8	KIAA0739 KNBC3	12:51,391,316-51,515,762
<i>SNAPIN</i>	*607007	SNAP-ASSOCIATED PROTEIN; SNAPIN	SNARE-ASSOCIATED PROTEIN SNAPIN; SNAPAP BIOGENESIS OF LYSOSOME-RELATED ORGANELLES COMPLEX 1, SUBUNIT 7; BLOC1S7 BLOC1, SUBUNIT 7; BLOS7	1:153,658,653-153,661,851
<i>SORT1</i>	*602458	SORTILIN	NEUROTENSIN RECEPTOR 3; NTSR3; NT3 NEUROTENSIN RECEPTOR, 100-KD	1:109,309,574-109,397,939
<i>STAR</i>	*600617	STEROIDOGENIC ACUTE REGULATORY PROTEIN	START DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 1; STARD1	8:38,142,699-38,150,951
<i>STARD3</i>	*607048	START DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 3	METASTATIC LYMPH NODE 64; MLN64	17:39,637,143-39,664,200
<i>STIM1</i>	*605921	STROMAL INTERACTION MOLECULE 1	/	11:3,854,603-4,093,209
<i>STX12</i>	*606892	SYNTAXIN 12	STX13	1:27,773,218-27,824,442
<i>STX8</i>	*604203	SYNTAXIN 8	/	17:9,250,470-9,575,893
<i>TBC1D15</i>	*612662	TBC1 DOMAIN FAMILY, MEMBER 15	/	12:71,839,758-71,924,312
<i>TFEB</i>	*600744	T-CELL TRANSCRIPTION FACTOR EB	TCFEB	6:41,683,977-41,736,222

<i>TGFBRAP1</i>	*606237	TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA RECEPTOR-ASSOCIATED PROTEIN 1	TGFBR-ASSOCIATED PROTEIN 1; TRAP1	2:105,249,403-105,329,734
<i>TPCN2</i>	*612163	TWO-PORE SEGMENT CHANNEL 2	TWO-PORE CHANNEL 2; TPC2	11:69,048,931-69,090,596
<i>TRPA1</i>	*604775	TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL CATION CHANNEL, SUBFAMILY A, MEMBER 1	ANKYRIN-LIKE PROTEIN WITH TRANSMEMBRANE DOMAINS 1; ANKTM1	8:72,021,249-72,094,884
<i>TRPM7</i>	*605692	TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL CATION CHANNEL, SUBFAMILY M, MEMBER 7	LONG TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL CHANNEL 7; LTRPC7 TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL-PHOSPHOLIPASE C-INTERACTING KINASE; TRP-PLIK ;CHAK	15:50,557,157-50,686,796
<i>TSPO</i>	*109610	TRANSLOCATOR PROTEIN, 18-KD	BENZODIAZEPINE RECEPTOR, PERIPHERAL; BZRP; PBR BENZODIAZEPINE PERIPHERAL BINDING SITE; PBS; BPBS ISOQUINOLINE CARBOXAMIDE-BINDING PROTEIN	22:43,151,558-43,163,241
<i>VAC14</i>	*604632	VAC14 COMPONENT OF PIKFYVE COMPLEX	VAC14, S. CEREVISIAE, HOMOLOG OF VAC14 ASSOCIATED REGULATOR OF PIKFYVE; ARPIKFYVE TAX1-BINDING PROTEIN 2; TAX1BP2 TAX-REACTIVE PROTEIN X; TRX	16:70,687,438-70,801,157
<i>VAMP7</i>	*300053	VESICLE-ASSOCIATED MEMBRANE PROTEIN 7	SYNAPTOBREVIN-LIKE 1; SYBL1 TETANUS NEUROTOXIN-INSENSITIVE VAMP; TIVAMP	X:155,881,317-155,943,768
<i>VDAC1</i>	*604492	VOLTAGE-DEPENDENT ANION CHANNEL 1	PORIN OMP2, YEAST, HUMAN COMPLEMENT OF	5:133,971,870-134,070,986

<i>VPS11</i>	*608549	VPS11 CORE SUBUNIT OF CORVET AND HOPS COMPLEXES	VACUOLAR PROTEIN SORTING 11, YEAST, HOMOLOG OF	11:119,067,791-119,081,971
<i>VPS16</i>	*608550	VPS16 CORE SUBUNIT OF CORVET AND HOPS COMPLEXES	VACUOLAR PROTEIN SORTING 16, YEAST, HOMOLOG OF	20:2,840,744-2,866,731
<i>VPS18</i>	*608551	VPS18 CORE SUBUNIT OF CORVET AND HOPS COMPLEXES	VACUOLAR PROTEIN SORTING 18, YEAST, HOMOLOG OF KIAA1475	15:40,894,409-40,903,974
<i>VPS26A</i>	*605506	VPS26 RETROMER COMPLEX COMPONENT A	VACUOLAR PROTEIN SORTING 26, YEAST, HOMOLOG OF; VPS26 HB58, MOUSE, HOMOLOG OF	10:69,124,177-69,174,411
<i>VPS29</i>	*606932	VPS29 RETROMER COMPLEX COMPONENT	VACUOLAR PROTEIN SORTING 29, YEAST, HOMOLOG OF RETROMER PROTEIN PEP11 DC7 DC15	12:110,491,082-110,502,110
<i>VPS33A</i>	*610034	VPS33A CORE SUBUNIT OF CORVET AND HOPS COMPLEXES	VACUOLAR PROTEIN SORTING 33, YEAST, HOMOLOG OF, A	12:122,229,563-122,266,493
<i>VPS35</i>	*601501	VPS35 RETROMER COMPLEX COMPONENT	VACUOLAR PROTEIN SORTING 35, YEAST, HOMOLOG OF MEM3, MOUSE, HOMOLOG OF; MEM3	16:46,656,131-46,689,193
<i>VPS39</i>	*612188	VPS39 SUBUNIT OF HOPS COMPLEX	VACUOLAR PROTEIN SORTING 39, YEAST, HOMOLOG OF VAM6, YEAST, HOMOLOG OF; VAM6 TRAP1-LIKE PROTEIN; TLP KIAA0770	15:42,158,700-42,208,330
<i>VPS41</i>	*605485	VPS41 SUBUNIT OF HOPS COMPLEX	VACUOLAR PROTEIN SORTING 41, YEAST, HOMOLOG OF	7:38,722,973-38,909,199
<i>VPS8</i>	*618366	VPS8 CORVET COMPLEX SUBUNIT	VACUOLAR PROTEIN SORTING 8, S. CEREVISIAE, HOMOLOG OF	3:184,812,142-185,052,613

<i>WASHC1</i>	*613632	WASH COMPLEX, SUBUNIT 1	WAS PROTEIN FAMILY HOMOLOG 1; WASH1 WASH	9:14,474-30,486
<i>WASHC2C</i>	*613631	WASH COMPLEX, SUBUNIT 2C;	FAMILY WITH SEQUENCE SIMILARITY 21, MEMBER C; FAM21C VACCINIA VIRUS PENETRATION FACTOR; VPEF KIAA0592	10:45,727,042-45,792,963
<i>WASHC3</i>	NA	WASH complex subunit 3	CCDC53; CGI-116	12:102012840-102062124
<i>WASHC4</i>	*615748	WASH COMPLEX, SUBUNIT 4	KIAA1033 GENE; KIAA1033 WASH COMPLEX, SUBUNIT 7 STRUMPELLIN AND WASH- INTERACTING PROTEIN; SWIP	12:105,107,725- 105,169,133
<i>WASHC5</i>	*610657	WASH COMPLEX, SUBUNIT 5	KIAA0196 STRUMPELLIN	8:125,024,259- 125,091,818

## Résumé

L'albinisme est une affection de la pigmentation caractérisée par l'association d'anomalies oculaires à divers degrés d'hypopigmentation cutanéophanéérienne et parfois des atteintes systémiques dans les formes syndromiques que sont les syndromes d'Hermansky-Pudlak (HPS) et le syndrome de Chediak-Higashi. Avant ce travail, 19 gènes étaient connus comme impliqués dans des formes isolées ou syndromiques d'albinisme, dont la plupart sont autosomiques récessives à l'exception de l'albinisme oculaire lié à l'X. Après étude complète de ces 19 gènes, environ 25% à 30% des patients restent sans diagnostic moléculaire. Afin de rechercher de nouveaux gènes, nous avons développé et testé un panel de 129 gènes candidats chez 230 patients non résolus sur le plan moléculaire. Ceci a permis de mettre en évidence des variants délétères dans deux nouveaux gènes. Nous rapportons d'une part deux patientes porteuses de variants perte de fonction dans le gène *BLOC1S5*, une délétion intragénique homozygote emportant les exons 3 et 4 et une délétion homozygote d'une paire de base (pb) de l'exon 4. *BLOC1S5* code une des sous-unités du complexe BLOC-1 qui en compte huit et dont 3 sont déjà associées à des formes d'HPS (7, 8, 9). Ces patientes présentent un phénotype d'albinisme modéré et un défaut d'agrégation plaquettaire par déficit en granules denses. Les plaquettes de la patiente 1 présentent une absence de BLOC-1 montrant que la délétion entraîne une dysfonction de *BLOC1S5* gênant l'assemblage du complexe. Tandis que l'expression du transcrit humain sauvage de *BLOC1S5*, dans des mélanocytes murins avec KO de *Bloc1s5*, non pigmentés, restaure la pigmentation, l'assemblage de BLOC-1 et le trafic de cargo, l'expression du transcrit avec la délétion de la 1<sup>ère</sup> patiente ne le permet pas. Nous avons ainsi démontré que la perte de fonction de *BLOC1S5* est responsable d'une nouvelle forme d'HPS, HPS-11. Le deuxième gène, *DCT* ou *TYRP2* est suspecté de longue date du fait de sa collaboration à la synthèse de la mélanine avec *TYR* et *TYRP1*, gènes connus d'albinisme (*OCA1* et 3, respectivement). Nous décrivons 2 patientes présentant un albinisme cutané modéré avec atteinte ophtalmologique caractéristique et porteuses de variants de *DCT*. Une patiente est homozygote pour un variant faux sens de l'exon 1 et l'autre hétérozygote composite pour un variant faux sens de l'exon 1 et une délétion de 14pb de l'exon 9. Les deux variants faux-sens sont situés dans des cystéines très conservées et ont été induits chez la souris par CrispR-Cas9, reproduisant l'hypopigmentation modérée et l'atteinte oculaire. Un modèle poisson zèbre a aussi été produit avec atteinte similaire. Nous concluons donc que *DCT* est impliqué dans une nouvelle forme d'albinisme oculo-cutané, *OCA8*. Enfin nous rapportons également le phénotype détaillé de trois patients porteurs de nouveaux variants dans *BLOC1S3*, associé à l'HPS-8, une des formes les plus rares d'albinisme syndromique. Avant ce travail, seulement 2 familles et deux variants étaient décrits dans la littérature. La description détaillée du phénotype de ces patients est une aide aux praticiens dans l'accompagnement diagnostique et pronostique des patients ainsi que pour le conseil génétique. Nous avons donc rapporté deux nouveaux gènes d'albinisme, pour une forme oculocutanée et pour une forme syndromique (HPS), toutes deux apparemment modérées et décrivons de nouveaux variants pour une forme connue mais néanmoins rare d'albinisme syndromique.

## Abstract

Albinism is a pigmentation disorder characterized by visual impairment, isolated (Ocular Albinism, OA) or associated with generalized skin and hair hypopigmentation (Oculo-Cutaneous Albinism, OCA), and sometimes with other symptoms in syndromic forms called Hermansky-Pudlak (HPS) and Chediak-Higashi (CHS) syndromes. Most are autosomal recessive affections except for X-linked OA. Prior to this work 19 genes were known to cause isolated or syndromic albinism. After extensive analysis of these genes, 25 to 30% of patients remain molecularly unsolved. To search for new genes we screened, in 230 patients without molecular diagnosis, a panel of 129 candidate genes. We identified deleterious variants in two candidate genes. First, we report two patients with predicted loss-of-function variants in *BLOC1S5* in two patients. The first patient carries an intragenic homozygous deletion involving exons 3 and 4. The second patient has a homozygous one base-pair deletion in exon 4. *BLOC1S5* codes for one of the 8 subunits of BLOC-1, three of which are involved HPS-7, 8 and 9. Both patients had mild hypopigmentation, classical ocular albinism and moderate bleeding diathesis, platelet aggregation deficit and a very low number of platelet dense granules, compatible with HPS. Patient 1's platelets displayed an absence of BLOC-1, showing that the identified mutation disrupts *BLOC1S5* function and impairs BLOC-1 assembly. Whereas expression of a wild-type *BLOC1S5* protein in non-pigmented murine melanocytes rescued pigmentation, assembly of a functional BLOC-1, and melanosome cargo trafficking, expression of the patient's *BLOC1S5* variant allele did not. These data indicate that mutation of *BLOC1S5* is disease-causing, and we propose that *BLOC1S5* is the gene for a new form of HPS, HPS11. The second gene, *DCT* or *TYRP2* has been suspected for a long time, due to its collaboration with *TYR* (*OCA1*) and *TYRP1* (*OCA3*). We describe two unrelated patients presenting with clinical diagnosis of OCA. One patient is homozygous for a missense variant in the exon 1 of *DCT* and the other is a compound heterozygote for a missense variant in exon 1 and a frame-shift deletion in exon 9. Both missense variants, affecting highly conserved cysteine, were introduced in mice via CrispR-Cas9, which led to mild hypopigmentation of the fur and ocular anomalies. A Zebrafish knock-down model has also been produced by morpholino injection, leading to a significant decrease in melanin levels compared to controls. We propose that *DCT* is the gene for a new form of OCA, *OCA8*. In this work we also describe three unrelated patients with novel variants in *BLOC1S3* responsible for HPS-8. This rare form of HPS had been reported in only two families and we believe detailed clinical description of patients is useful for clinicians for patient's diagnosis and prognosis evaluation and genetic counseling. In conclusion we have reported two new genes involved in isolated and syndromic forms of albinism as well as new insight in an already known yet rare form of syndromic albinism.