



HAL
open science

Caractérisation génomique des anomalies de la pigmentation cutanée en mosaïque

Arthur Sorlin

► **To cite this version:**

Arthur Sorlin. Caractérisation génomique des anomalies de la pigmentation cutanée en mosaïque. Médecine humaine et pathologie. Université Bourgogne Franche-Comté, 2019. Français. NNT : 2019UBFCI011 . tel-03435936

HAL Id: tel-03435936

<https://theses.hal.science/tel-03435936v1>

Submitted on 19 Nov 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 DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ

École doctorale n° 554 : Environnements – Santé
Doctorat de Génétique

Arthur Sorlin

Soutenu le 4 novembre 2019 à Dijon

Caractérisation génomique des anomalies de la pigmentation cutanée en mosaïque

Composition du Jury :

Président	Pr Rudolf Happle	Hôpital universitaire, Freiburg im Breisgau
Rapporteuse	Pr Catherine Boileau	Université Paris Diderot – Paris 7
Examinatrice	Dr Amélie Piton	Université de Strasbourg
Directeur	Pr Pierre Vabres	Université Bourgogne Franche-Comté
Co-directrice	Pr Laurence Faivre	Université Bourgogne Franche-Comté
Co-directeur	Dr Paul Kuentz	Université Bourgogne Franche-Comté

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu mes directeurs et co-directeurs de thèse, Pierre Vabres, Laurence Faivre et Paul Kuentz, ainsi que Christel Thauvin, directrice de l'unité de recherche, pour la confiance qu'ils m'ont accordée en me proposant ce travail, pour les connaissances qu'ils m'ont chacun transmises depuis mes premiers pas dans l'équipe en 2016, et pour le plaisir que je prends à travailler à leurs côtés.

Je remercie également le Pr Catherine Boileau, le Pr Rudolf Happle, et le Dr Amélie Piton, qui en leur qualité de rapporteurs et d'examinatrice, me font l'honneur de juger ce travail.

Merci à Damien Sanlaville, Ludovic Martin et Smail Hadj Rabia, dont les conseils prodigués au cours des différentes réunions du « Comité de suivi de thèse » m'ont permis d'améliorer ce travail.

Cette thèse a été rendue possible à la fois par les nombreux collaborateurs de la cohorte M.U.S.T.A.R.D. qui ont contribué à ce travail, mais également par les patients et leurs familles, qui, en nous transmettant leur espoir de voir nos connaissances progresser, nous poussent à nous dépasser ; je souhaite par ce travail leur adresser mes remerciements.

Je remercie tout particulièrement mon acolyte de la *team Mosaic*, Virginie Carmignac, qui tel le mortier supportant le *trencadis* de Gaudi, est nécessaire à la solidité de la *team* et de ses projets, et qui a, à maintes reprises, apporté un renfort décisif à l'avancée de ce travail.

Parmi la nombreuse équipe du laboratoire GAD et du Centre de génétique de Dijon, chacun à sa manière a également été nécessaire à la réalisation de ce projet. Je remercie notamment Yannis et Émilie pour leur expertise bioinformatique ; Jean-Baptiste pour m'avoir initié à la génomique, Justine, Charlotte, Martin, Thibaud, Victor et Jehanne, qui chaque jour prennent soin de nos échantillons ; Patrick et son équipe pour le renfort cytogénétique ; Christophe, Antonio, Fred, Anne-Sophie, Sébastien, Sophie, Ange-Line, pour leurs contributions aux *brainstormings*.

Je tiens à remercier mes parents et mes sœurs, encore une fois, pour m'avoir toujours encouragé. Mahaut, je suis fier de te passer le flambeau !

Je tiens enfin à remercier Delphine, pour une nouvelle preuve de ton soutien infailible. Ce travail te doit énormément, entre les idées nées au cours de nos discussions, tes relectures, tes contributions graphiques, tes *coaching* pré-congrès... Merci infiniment, d'être avec moi dans cette aventure et toutes les autres.

Sommaire

Résumé	9
I. Introduction.....	11
1. Mosaïques génétiques et mosaïques cutanées	13
2. Mécanismes de survenue des mutations en mosaïque	15
a. Définitions	15
b. Fréquence	17
c. Conséquences du mosaïcisme en pathologie humaine.....	18
3. Expression clinique des mutations post-zygotiques.....	21
a. Selon le tissu atteint.....	21
b. Selon la topographie cutanée.....	21
c. Selon le mécanisme de pathogénicité	23
4. Outils de détection des mutations post-zygotiques.....	25
a. Cytogénétique conventionnelle	25
b. Puces à ADN.....	25
c. <i>Next Generation Sequencing</i>	26
5. État des connaissances actuelles.....	27
a. Causes génétiques des anomalies du développement en mosaïque.....	27
b. Causes génétiques des dyschromies cutanées en mosaïque.....	30
II. Objectifs	33
III. Matériel et Méthodes.....	37
1. La cohorte M.U.S.T.A.R.D.....	39
2. Extraction d'ADN	41
3. Détermination de la stratégie de séquençage	45
4. Séquençage d'exome	45

5.	Séquençage ciblé à forte profondeur	46
6.	Analyse bioinformatique.....	47
a.	Variations nucléotidiques.....	47
b.	CNV constitutionnels.....	49
c.	Variations chromosomiques en mosaïque.....	50
i.	Outil 1 : Étude de la profondeur de séquençage.....	50
ii.	Outil 2 : Étude des fractions alléliques.....	52
iii.	Outil 3 : Étude des transmissions parent-enfant des SNP	53
7.	Réplication des résultats et études fonctionnelles	55
a.	Séquençage ciblé en profondeur, vérification des variants : Séquençage MiSeq ...	55
b.	Validation des variations chromosomiques en mosaïque	55
c.	Évaluation des conséquences fonctionnelles des variants détectés.....	56
IV.	Résultats.....	57
1.	Cohorte.....	59
2.	Patients étudiés en NGS et résultats généraux.....	61
3.	Variations ponctuelles postzygotiques : Publications découlant du travail de thèse ..	63
a.	Article 1 : Dysplasie ectodermique liée au gène <i>RHOA</i>	65
i.	Identification de variants post-zygotiques du gène <i>RHOA</i>	67
ii.	Phénotype associé aux variants post-zygotiques de <i>RHOA</i>	67
iii.	Évaluation des conséquences fonctionnelles des variants	68
iv.	Un gène nécessaire au développement : la survie par le mosaïcisme	70
v.	Une nouvelle voie de signalisation impliquée dans les syndromes en mosaïque ?	
	72	
b.	Article 2 : Mutation post-zygotique du gène <i>KITLG</i> et Hypermélanose nævoïde linéaire et en volutes	115
c.	Article 3: Hypermélanose de Ito liée à <i>MTOR</i>	127

d.	Article 4: Mutations constitutionnelles du gène <i>TFE3</i> et mosaïcisme fonctionnel	173
4.	Variations ponctuelles post-zygotiques : résultats non publiés	219
a.	Mutations post-zygotiques du gène <i>DOCK1</i> associées aux dyschromies en mosaïque	221
b.	Mutations du gène <i>GNA13</i> : une troisième dysplasie ectodermique de la voie Rho ?	227
c.	Mutation du gène <i>DEPDC5</i> associée à l'hypomélanose d'Ito	231
5.	Variations chromosomiques	233
a.	Analyse bioinformatique	233
i.	Outil 1 : Étude de la profondeur de séquençage	234
ii.	Outil 2 : Étude des fractions alléliques	237
iii.	Outil 3 : Étude des transmissions parent-enfant des SNP	237
b.	Anomalies chromosomiques détectées	238
i.	Anomalies chromosomiques associées à une dyschromie en mosaïque	239
ii.	Anomalies chromosomiques associées à des affections non pigmentaires	239
c.	Techniques de confirmation	239
d.	Mécanismes chromosomiques rencontrés	245
i.	Trisomies	245
ii.	Tétrasomies	249
iii.	Monosomies	255
iv.	Mixoploïdie	258
v.	Disomies uniparentales	263
V.	Discussion et Perspectives	267
1.	Hétérogénéité des étiologies génétiques des dyschromies en mosaïque	269
2.	Rendement diagnostique	269
3.	Identification de présentations syndromiques reconnaissables	270

4.	Identification d'une nouvelle famille de maladies en mosaïque	272
5.	Variations chromosomiques et compréhension de la physiopathologie des dyschromies en mosaïque	272
6.	Rendement des outils bioinformatiques de détection d'anomalies chromosomiques 273	
7.	Nécessité d'une lecture combinée SNV et chromosomique	273
8.	Automatisation de l'interprétation des données d'ES	274
9.	Validation par une seconde méthode	274
10.	Généralisation de la méthode	275
11.	Limites de la stratégie d'analyse actuelle	276
12.	Conséquences sur le conseil génétique	278
13.	Perspectives thérapeutiques	279
14.	Poursuite des travaux dans le cadre d'une collaboration nationale financée par l'ANR 280	
VI.	Bibliographie	283
VII.	Annexe	301
	Table de correspondance entre le log ratio d'ACPA et le taux de mosaïque	303

Résumé

Certaines anomalies de la pigmentation (ou dyschromies) cutanées de disposition linéaire ou segmentaire, parfois rapportées sous le nom d'hypomélanose d'Ito, ont fait suspecter de longue date l'implication d'un mosaïcisme sous-jacent, et ont ainsi été appelées dyschromies en mosaïque. Cette dénomination reposait essentiellement sur des arguments cliniques, en particulier leur disposition selon les lignes de Blaschko, par analogie avec d'autres dermatoses pour lesquelles un mosaïcisme sous-jacent avait pu être prouvé.

Divers remaniements chromosomiques en mosaïque (*mosaic Chromosomal Variants, mCV*), avaient été identifiés depuis les années 1980 dans les dyschromies en mosaïque, leur détection reposant sur le caryotype standard puis l'ACPA. Ces méthodes étaient cependant insuffisamment sensibles et difficiles à réaliser sur une biopsie de peau non cultivée. Plus récemment, ont été décrites des variations nucléotidiques monogéniques (*mosaic Single Nucleotide Variants, mSNV*) au sein du gène *MTOR* associées à une hypomélanose d'Ito. Hormis cela, les bases monogéniques des dyschromies en mosaïque étaient restées inconnues.

La caractérisation génomique des dyschromies en mosaïque, objet du présent travail, a d'une part nécessité la mise au point de méthodes adaptées à la détection de variations génétiques à faible taux et confinées au tissu atteint, et a d'autre part permis d'envisager une modification des pratiques pour la prise en charge des patients (conseil génétique, suggestion de cibles thérapeutiques, révision des modalités de surveillance). Au moment de débiter ce travail de thèse, le séquençage haut débit, ciblé ou pangénomique (séquençage d'exome, ES), se présentait comme une méthode de choix, en recherche, pour l'identification de mutations ponctuelles post-zygotiques.

Sous l'impulsion de deux projets d'envergure menés au sein de l'équipe de recherche Inserm 1231 GAD Génétique des Anomalies du développement (PHRC national et ANR), nous avons

recruté à Dijon la plus large cohorte mondiale à notre connaissance de patients porteurs d'un mosaïcisme cutané : la cohorte M.U.S.T.A.R.D. (*Mosaic Undiagnosed Skin Traits And Related Disorders*), comprenant à ce jour des prélèvements de 1052 patients. Après un phénotypage précis, les patients ont été orientés vers un séquençage pangénomique ou ciblé sur un gène candidat, sur ADN de tissu atteint. Afin d'éviter la multiplication des prélèvements invasifs et des examens coûteux, nous avons développé une stratégie bioinformatique utilisant les données d'ES, permettant la détection des mSNV et des mCV.

Cette approche a permis l'identification de plusieurs nouveaux gènes responsables de syndromes comportant une dyschromie en mosaïque. La caractérisation de nouvelles entités nosologiques identifiables (dysplasies ectodermiques liées à *RHOA* (Article 1), *DOCK1* et *GNA13*) a mis en évidence le rôle de la voie de signalisation dépendant des Rho GTPases. Des variations post-zygotiques dans deux gènes précédemment associés à un phénotype mendélien, *MTOR* et *KITLG* (Article 2), ont été également identifiées, causant un phénotype distinct et reconnaissable. Les outils bioinformatiques mis au point ont permis d'observer dans notre population une contribution équivalente des mSNV et mCV. Parmi ces derniers, il existe une vaste gamme d'anomalies : grandes délétions, duplications ou triplications, disomies et triploïdies en mosaïque. Nous avons ainsi confirmé par une méthode originale et sensible la fréquence des remaniements chromosomiques en mosaïque associés aux dyschromies en mosaïque.

Le recul apporté par cette étude permet également, en fonction de l'anomalie génétique identifiée, d'envisager des perspectives thérapeutiques auparavant inexistantes, et de préciser le risque familial de récurrence. Nous apportons la preuve de concept que l'ES permet la détection des mSNV et mCV en un seul examen, à partir d'un seul prélèvement, améliorant significativement le rendement diagnostique.

L'identification d'une dyschromie mosaïque chez des patients en impasse diagnostique constitue donc désormais une porte d'entrée clinique permettant d'appliquer les outils de détection utilisés dans ce travail pour identifier le mosaïcisme sous-jacent. La généralisation de cette approche devrait permettre l'amélioration de la prise en charge de ces patients porteurs de maladies rares et complexes.

I. Introduction

1. Mosaïques génétiques et mosaïques cutanées

Les progrès récents de la génomique ont mis en lumière l'importante variabilité intra-individuelle du génome humain, effaçant l'un des anciens postulats de la génétique, à savoir que l'ensemble des cellules constituant un organisme partageraient le même génome. L'accumulation de variations génomiques (mutations ponctuelles ou variations chromosomiques), de par sa fréquence, y compris dans des cellules saines, doit au contraire être considérée comme une qualité intrinsèque de notre génome (1–3), et ce dès les premières étapes du développement embryonnaire (4). De l'apparition de ces mutations résulte une mosaïque, organisme composé de populations cellulaires de patrimoines génétiques différents, malgré leur origine zygotique commune (5). Si la génétique humaine (en tant que science étudiant les causes génétiques des maladies) accorde une grande importance aux variations génétiques constitutionnelles, qu'elles soient héritées ou survenues *de novo* au cours de la gamétogénèse, il faut donc également tenir compte de l'apparition et de l'accumulation de mutations somatiques, au cours de la vie de l'individu (embryonnaire, fœtale, et post-natale) (6).

La survenue d'une mutation aux stades précoces de l'embryogénèse, dite post-zygotique (7), peut être la cause d'anomalies du développement variées. Selon le ou les tissu(s) concerné(s) et la proportion de cellules touchées, les conséquences phénotypiques d'un tel mosaïcisme peuvent éventuellement différer de celles d'une mutation équivalente de la lignée germinale. Lorsqu'il concerne la peau, un mosaïcisme peut être évoqué devant le type et la disposition particulière des atteintes cutanées, qui suivent par exemple les lignes de Blaschko, ou d'autres topographies évocatrices (8). C'est le cas par exemple des nævus épidermiques sébacés ou verruqueux, des malformations vasculaires cutanées, ou de troubles pigmentaires variés.

La détection de mutations ponctuelles en mosaïque, présentes dans une faible fraction des cellules, s'est longtemps heurtée aux limites des techniques classiques de séquençage. L'essor récent du séquençage massivement parallèle (*Massive parallel sequencing*, MPS) dit de nouvelle génération (*Next Generation Sequencing*, NGS), appliqué en particulier au séquençage d'exome (*Exome Sequencing*, ES), a permis ces dernières années leur

identification chez l'Homme dans plusieurs syndromes en mosaïque avec hypertrophie : mutations post-zygotiques d'*AKT1* dans le syndrome de Protée (9), de *PIK3CA* ou *AKT3* dans les syndromes hypertrophiques associés à *PIK3CA* ou *PROS* (*PIK3CA-Related Overgrowth Spectrum* : syndrome MCAP, CLOVES, Klippel-Trenaunay) (10,11) de *HRAS* et *KRAS* dans le syndrome du nævus sébacé (12), de *GNA11* et *GNAQ* dans le syndrome de Sturge-Weber et les phacomatoses pigmento-vasculaires (13), ou de *MTOR* dans un tableau d'hémi-mégalencéphalie avec dysplasie corticale focale et anomalies pigmentaires (14).

Certaines présentations cliniques en mosaïque comportent une hypopigmentation cutanée en bandes (nævus achromique), aussi appelée hypomélanose d'Ito (HI), surtout lorsqu'elle s'associe à une atteinte neurologique. Il s'agit d'une situation relativement fréquente au sein des anomalies du développement avec atteinte cutanée en mosaïque. En dehors de la description précédemment citée de quelques patients avec une hypopigmentation au sein d'une cohorte de patients porteurs de mutations constitutionnelles de *MTOR* (14), on considère depuis les années 1990 qu'une partie de ces hypopigmentations en mosaïque sont surtout une manifestation cutanée associée à divers remaniements chromosomiques (15), la plupart non spécifiques, mais de nombreux cas restent inexplicés.

À l'inverse, certains patients présentent un tableau d'hyperpigmentation en mosaïque, appelé aussi hypermélanose naevoïde linéaire et en volutes (*Linear and whorled nevoid hypermelanosis*, LWNH) lorsqu'il est isolé (16). Là encore, seules des étiologies chromosomiques, plus ou moins récurrentes, telles que le syndrome de Pallister-Killian (17) sont rapportées. Ces troubles de la pigmentation linéaires ou segmentaires sont regroupés ici sous la dénomination de dyschromies (cutanées) en mosaïque.

2. Mécanismes de survenue des mutations en mosaïque

a. Définitions

Une mosaïque génétique peut être définie par la présence, au sein d'un organisme multicellulaire, d'au moins deux lignées cellulaires dont le génotype diffère, tout en étant issues du même zygote (18) (Figure 1). Ces différences peuvent consister en des variations diverses, dont des variations nucléotidiques (*mosaic Single Nucleotide Variation*, mSNV), ou chromosomiques (*mosaic Chromosomal Variant*, mCV) : variation de nombre de copies (*copy number variants*, CNV), variations structurales (translocations, inversions...) ou encore disomies. Il s'agit de variations génétiques non héritées, en ce sens qu'elles ne sont pas issues de la lignée germinale parentale, mais doivent également être distinguées des variations *de novo* survenues au cours de la gamétoγένèse parentale, dont la conséquence est une variation constitutionnelle, présente de manière homogène dans toutes les cellules de l'organisme.

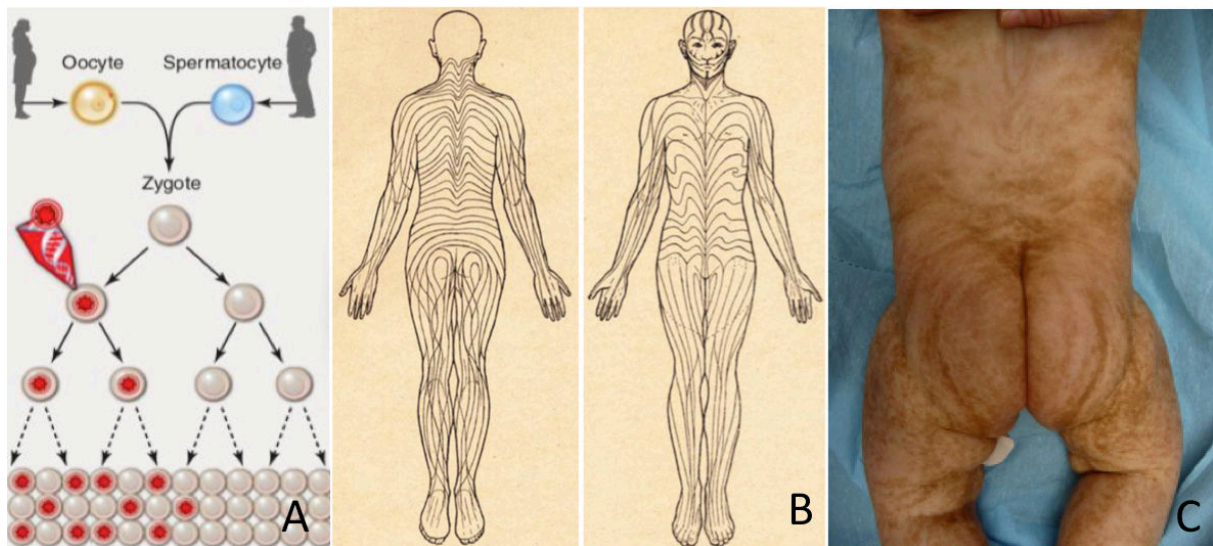
Une variation génétique acquise peut se rencontrer en génétique humaine dans deux contextes différents, qui partagent des problématiques communes, liées à la difficulté de détection des mutations et à celle de l'accès au tissu atteint :

- la situation la plus fréquente, et la mieux documentée, concerne l'oncologie : l'accumulation de mutations somatiques est à l'origine du processus de transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse.
- plus rarement, la variation se produit peu de temps après la fécondation et la formation du zygote primitif, et peut être responsable d'anomalies du développement. On parle alors d'une mutation post-zygotique, pour décrire un évènement de survenue précoce au cours de l'embryogénèse, et qui peut à lui seul être responsable de manifestations cliniques variées. Dans certains cas, la variation peut être liée à une correction imparfaite d'une anomalie constitutionnelle, telle qu'une trisomie (19).

Le mosaïcisme doit enfin être différencié du chimérisme, dans lequel deux (ou plus) populations cellulaires génétiquement différentes cohabitent, mais proviennent de deux

zygotes différents (20). Il résulte d'un transfert cellulaire d'un individu vers un autre, au cours de la vie embryonnaire (fusion de deux zygotes), foetale (microchimérisme par transfert fœto-maternel ou materno-foetal), ou post-natale (transfusion, allogreffe). Il est théoriquement possible de les différencier du point de vue génétique, par exemple avec une approche de puce à ADN de type SNP-array (*Single Nucleotide Polymorphism array*) : à la différence du mosaïcisme, où les cellules ne diffèrent qu'au locus de l'évènement post-zygotique (qu'il s'agisse d'une variation nucléotidique ponctuelle ou d'une correction partielle de non-disjonction méiotique conduisant à une trisomie en mosaïque), les différentes populations cellulaires d'une chimère diffèrent sur l'ensemble du génome.

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



A : Survenue précoce après la conception (post-zygotique) d'une mutation, qui ne touchera qu'une partie des cellules de l'individu (adapté de Poduri *et al.*, Science 2013 (18)). B : Atlas constitué par Alfred Blaschko à partir de l'observation de 170 patients porteurs de nævus linéaires (21). Les lignes de Blaschko constituent une des six dispositions typiques des lésions en mosaïque d'après Happle, 2014 (22). C : Patient de 10 jours porteur d'une Hypermélanose Nævoïde Linéaire et en Volutes (LWNH : *Linear and Whorled Naevoid Hypermelanosis*), suivant les lignes de Blaschko, sur l'ensemble du corps (16).

b. Fréquence

Des mutations ponctuelles ou des petites insertions/délétions se produisent tout au long de la vie d'un individu, à l'occasion de chaque division cellulaire, par le biais d'erreurs de réplication de l'ADN, mais également en dehors des étapes de division cellulaire sous l'influence d'agents mutagènes intrinsèques et extrinsèques. À l'âge de la reproduction, Lynch (23) a estimé le nombre de mutations acquises à 10^{16} pour les seules mutations ponctuelles¹, soit entre 100 et 1000 SNV par cellule. Pour rendre compte de la globalité des variations acquises, il faudrait également considérer les variations touchant plus d'une base, telles que les variations structurales et les variations de nombre de copies (24). Les mécanismes mis en jeu sont alors très divers (on peut citer la rétro-transposition d'éléments répétés, les erreurs de mécanisme de réparation de cassures chromosomiques, les non-disjonctions mitotiques) et leur nombre global est supposé bien supérieur (25). L'impact individuel de ces variations est pourtant limité, car elles existent chez des individus apparemment en bonne santé. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette tolérance : la part importante de mutations survenues dans des régions non codantes (représentant entre 98 et 99 % du génome), un effet de compensation par l'autre allèle, l'induction d'une apoptose avec extinction de la lignée mutée sans conséquence à l'échelle du tissu concerné, ou encore le maintien d'un fonctionnement cellulaire compatible avec la fonction spécifique attendue d'une cellule différenciée.

La part de ces mutations survenant en période post-zygotique précoce est difficile à estimer, mais des travaux de cytogénétique ont pu démontrer qu'il s'agit d'évènements non rares dès le stade du clivage (26). Une variation survenant lors du clivage du zygote ou au stade morula sera potentiellement présente dans un plus grand nombre de lignées cellulaires, comme cela a pu être documenté dans le cadre de mosaïques chromosomiques précoces (27). Leurs conséquences fonctionnelles sont alors plus générales, entraînant un mosaïcisme inter-organes, qui peut être responsable d'anomalies du développement embryonnaire.

¹ En tenant compte d'un taux basal de mutations ponctuelles de 10^{-8} par site et par génération, d'un génome diploïde de $6 \cdot 10^9$ nucléotides, pour un organisme produisant 10^{16} cellules au cours de sa vie.

À l'inverse, le mosaïcisme peut faire partie intégrante du développement physiologique, en particulier lorsqu'il s'agit de mosaïcisme plus tardif intra-organe. Les exemples sont multiples, telles que les recombinaisons responsables de la grande diversité des immunoglobulines (28), au sein de la lignée lymphoïde, ou l'hypothèse plus récente d'un mosaïcisme intracérébral comme facteur de différenciation neuronale, par le biais de SNV (29), de CNV (30) ou encore de l'intégration de rétro-transposons pouvant entraîner une modification de l'expression génique (31).

c. Conséquences du mosaïcisme en pathologie humaine

La découverte des premières anomalies chromosomiques en mosaïque a suivi rapidement l'identification de leur forme homogène : on peut en effet citer la première description d'un homme porteur d'une formule 46,XY/47,XXY en 1959 (32), et le premier cas décrit de trisomie 21 en mosaïque en 1961 (33), deux ans après la mise en évidence du rôle pathogène d'un chromosome 21 surnuméraire (34). Ainsi, c'est d'abord la cytogénétique qui a permis de documenter les conséquences du mosaïcisme en pathologie humaine. Avec l'amélioration des techniques de caryotype et de FISH, un nombre de plus en plus important d'anomalies chromosomiques – à l'état constitutionnel puis en mosaïque – sont décrites dans les décennies suivantes. Des variations chromosomiques en mosaïques sont ainsi rapportées pour l'ensemble des autosomes comme pour les gonosomes (35), qu'il s'agisse de pertes ou de gains d'un chromosome entier (monosomies, trisomies, tétrasomies) (36–40) ou d'une partie d'un chromosome, de mixoploïdies (cohabitation de cellules diploïdes et triploïdes ou tetraploïdes) (41,42), de chimères (20) ou de disomies uniparentales (43,44). Certaines de ces anomalies sont d'ailleurs considérées comme non viables à l'état constitutionnel, et (en dehors de leur mise en évidence sur des produits de fausse couche), ne sont détectées chez des individus vivant qu'à l'état de mosaïque. C'est par exemple le cas de trisomies d'autosomes en dehors des trisomies 13, 18 et 21, de même que la seule monosomie viable à l'état constitutionnel est la monosomie X (45).

Le mosaïcisme revêt également une grande importance dans le domaine des maladies monogéniques (ou mendéliennes). Il a initialement été suspecté, sous la forme de mutation post-zygotique devant l'existence d'une variabilité phénotypique importante (expressivité variable) dans le cadre de pathologies caractérisées sur le plan clinique et moléculaire, par exemple pour le syndrome de Marfan, le syndrome d'Alport, ou l'ataxie de Friedreich (46–48), mais également sous la forme d'un mosaïcisme révertant (correction post-zygotique d'une mutation) dont plusieurs exemples ont été donnés à partir des années 1990 (49,50). Potentiellement, toute pathologie mendélienne peut être concernée par un tel mosaïcisme (7,51), qui doit être pris en compte tant dans la démarche diagnostique que dans le conseil génétique (52).

3. Expression clinique des mutations post-zygotiques

Même si un mosaïcisme peut concerner tous les organes et tissus d'un organisme multicellulaire, la peau constitue un organe privilégié pour l'étude des anomalies du développement en mosaïque : elle est directement observable, et relativement facile à prélever. Un dermatologue allemand, Alfred Blaschko, a réalisé au début du XX^{ème} siècle, un travail fondateur en analysant la disposition cutanée atypique de « nævus linéaires » ((21) et Figure 1B). Ces lignes ont par la suite été interprétées comme une manifestation cutanée d'un mosaïcisme (53,54), et sont aujourd'hui considérées comme le trajet de migration radiale des cellules de l'ectoderme différencié en plaque neurale et ectoderme cutané.

La classification clinique contemporaine des mosaïques et la compréhension des mécanismes biologiques qui la sous-tendent doivent également beaucoup aux hypothèses du Professeur Rudolf Happle (55). Plusieurs niveaux de distinctions peuvent être considérés, que nous allons passer succinctement en revue.

a. Selon le tissu atteint

Un premier niveau de distinction peut s'opérer entre une atteinte de la lignée somatique ou de la lignée germinale. On peut distinguer, selon le tissu porteur de la variation, et donc selon la possibilité d'une transmission à la descendance, les mosaïcismes somatiques, gonadiques (ou mosaïques germinales), ou mixtes (56). Cette distinction théorique revêt une importance particulière pour le conseil génétique, mais reste techniquement et éthiquement difficile à mettre en évidence en pratique, du fait de la nécessité des prélèvements tissulaires multiples.

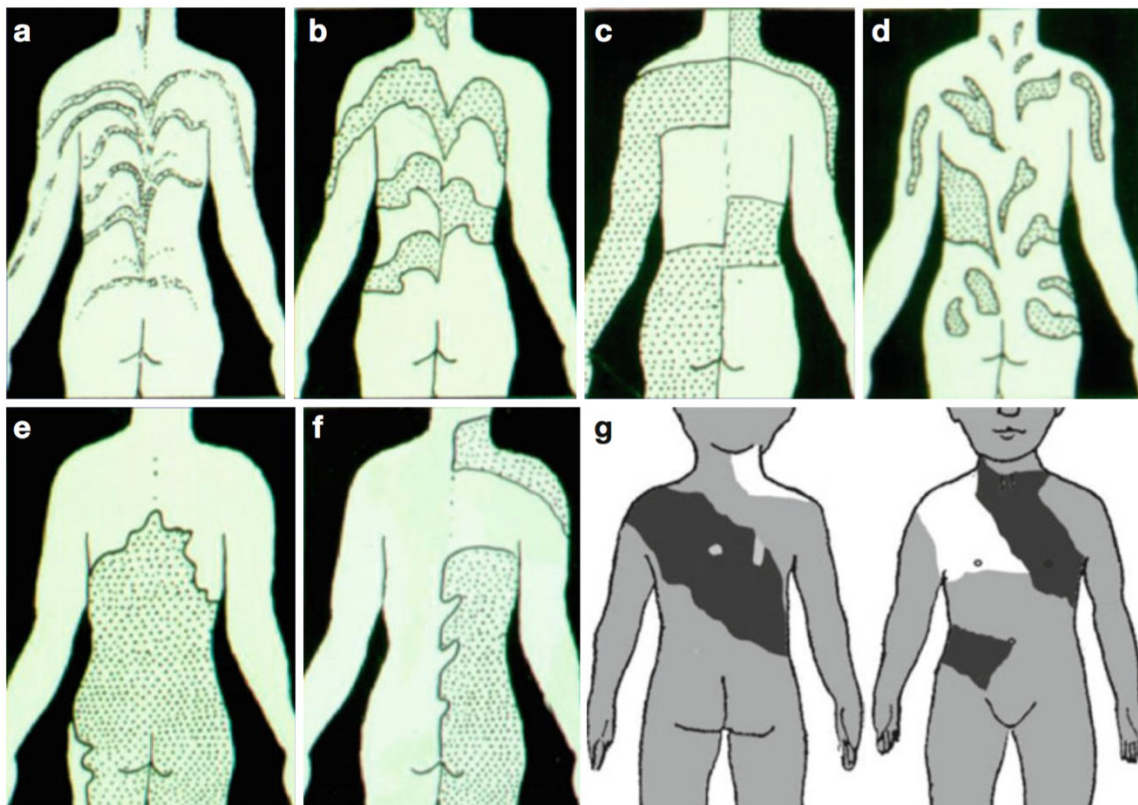
b. Selon la topographie cutanée

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

Les anomalies de la pigmentation cutanée en mosaïque suivent volontiers les lignes de Blaschko. Elles peuvent résulter tant d'une mosaïque génomique que d'une mosaïque épigénétique, par exemple par inactivation aléatoire du chromosome X. Aucune disposition n'est réellement typique ou évocatrice d'une entité nosologique, à l'exception peut-être du type phylloïde fréquemment associé à des anomalies du chromosome 13 (57) et du type 6 dans le syndrome de Ruggieri-Happle avec cutis tricolor (58).

Il faut ajouter à cette classification la notion de présentations segmentaires (touchant des parties distinctes du corps, de manière asymétrique, en respectant la ligne médiane) ou non segmentaires (qui couvrent un large éventail de manifestations, du nævus mélanocytaire commun au type 6 de la précédente classification) (55).

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



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

c. Selon le mécanisme de pathogénicité

Les premières mentions du rôle exclusif de mutations ponctuelles en mosaïque dans les anomalies du développement ont été formulées au sujet de cas sporadiques, par exemple le syndrome de Protée ou de McCune Albright. Dans ces cas, il a été émis l'hypothèse d'une mutation létale à l'état constitutionnel, dont seul le mosaïcisme permettait la survie (59), par analogie avec l'existence d'aneuploïdies létales à l'état constitutionnel, mais viables en mosaïques (45). Par la suite, il s'est avéré qu'une part importante des maladies en mosaïque est secondaire à des mutations post-zygotiques dans des gènes également impliqués dans des maladies autosomiques dominantes. L'effet de ces mutations post-zygotiques ne doit pas être confondu avec l'expressivité variable qui peut être observée dans ces syndromes, mais entraîne une forme segmentaire de la maladie, concernant une partie du corps seulement.

Parmi ces manifestations en mosaïques de maladies mendéliennes, deux types peuvent être distingués (22,60) :

- le type 1, dans lequel survient chez un individu une mutation dont ses cellules ne sont pas préalablement porteuses, entraînant une atteinte tissulaire segmentaire. Des exemples de descriptions historiques de mosaïcisme segmentaire de type 1 ont été donnés en plus haut (I.2.c). Sur le plan cutané, les manifestations segmentaires de type 1 sont reconnaissable à la présence de territoires indemnes côtoyant des régions exprimant une atteinte typique de la maladie, comme cela a par exemple été décrit dans la Neurofibromatose de type 1, la sclérose tubéreuse de Bourneville ou la maladie de Darier (61–65). Il est dans certains cas cliniquement difficilement discernable d'un mosaïcisme révertant, qui pourra être suspecté d'après l'étude familiale (atténuation d'un phénotype dominant) ou la disposition des territoires sains (multiples « spots » de peau saine au sein de larges territoires atteints, par exemple chez des patients porteurs d'une ichtyose par mutation de *KRT10*) (66,67).

- le type 2, dans lequel une mutation survient chez un individu déjà porteur d'une mutation constitutionnelle hétérozygote au même locus dans l'ensemble de ses cellules, entraînant une perte d'hétérozygotie, et un nouveau phénotype, qui se surajoute à un éventuel phénotype cutané constitutionnel. D'après R. Happle (22), il s'agit d'une forme de mosaïcisme dont la fréquence ne doit pas être sous-estimée. En raison de leur aspect cliniquement identifiable, certaines manifestations segmentaires de types 2 peuvent être considérées comme un

phénotype indépendant, jusqu'à l'identification sur le plan moléculaire de la perte d'hétérozygotie (68). Il peut même s'agir d'une présentation clinique récurrente dans certaines affections, telles que la Neurofibromatose de type 1, le syndrome de Legius, la maladie de Darier ou les porokeratoses (69–72).

4. Outils de détection des mutations post-zygotiques

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

a. Cytogénétique conventionnelle

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

b. Puces à ADN

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

c. Next Generation Sequencing

En dehors de quelques exemples, les techniques de biologies moléculaires conventionnelles ont exceptionnellement permis d'élucider les bases moléculaires de certaines anomalies du développement avec atteinte cutanée en mosaïque. On peut ainsi citer la découverte du rôle de *GNAS* dans le syndrome de McCune-Albright en 1991 Steinmann et al., "Mechanisms of Loss of Heterozygosity in Neurofibromatosis Type 1-Associated Plexiform Neurofibromas"; Happle, "Superimposed Segmental Manifestation of Both Rare and Common Cutaneous Disorders"; Fölster-Holst et al., "Molecular Genetic Support for the Rule of Dichotomy in Type 2 Segmental Darier Disease"; Atzmony et al., "Second-Hit, Postzygotic PMVK and MVD Mutations in Linear Porokeratosis."(73), des kératines K1 et K10 dans les nævus épidermiques acantholytiques (74), de *FGFR2* dans les nævus acnéiformes (75) et de *FGFR3* dans les nævus épidermiques verruqueux (76), mais il aura fallu l'entrée dans l'ère du séquençage massivement parallèle, pour connaître des progrès significatifs. En 2011, Lindhurst *et al.* identifiaient une mutation post-zygotique activatrice de *AKT1* comme la cause du syndrome de Protée (9). Depuis, des mutations ponctuelles responsables d'un mosaïcisme cutané ont été identifiées dans environ 50 gènes. Outre le séquençage d'exome complet, qui permet l'identification de nouveaux gènes causaux, le séquençage ciblé en profondeur permet la détection de mutations à très faible taux, avec une sensibilité avoisinant 1 % (10). Les techniques de NGS constituent aujourd'hui l'approche privilégiée pour l'étude des variants ponctuels en mosaïque (77). En revanche, au début de ce travail en 2016, les performances du NGS pour la détection de CNV et de variants structuraux en mosaïque restaient à évaluer.

5. État des connaissances actuelles

a. Causes génétiques des anomalies du développement en mosaïque

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

En particulier, dans nombre de syndromes avec hyperplasie ou hypertrophie segmentaire, évoquant un mosaïcisme sous-jacent de par la topographie particulière de ces lésions, des mutations post-zygotiques ont été identifiées par séquençage haut débit. On peut citer les syndromes du spectre PROS (78) (*PIK3CA-related overgrowth spectrum*, dont le syndrome CLOVES (*Congenital Lipomatous, Overgrowth, Vascular malformations, Epidermal naevi and Skeletal anomalies*) ou le syndrome Macrocéphalie- malformations capillaires (MCAP)), le syndrome de Schimmelpenning (12), de Sturge-Weber (79),... (Tableau 1) En revanche, ces différentes affections ne comportent pas de composante pigmentaire.

La majorité des gènes ainsi identifiés semblent être liés par leur appartenance à deux cascades de signalisations interconnectées (80), responsables de la survie et de la prolifération cellulaire : les voies PI3K-AKT-mTOR (81) et Ras-MAP kinases (82), ou aux constituants de protéines G hétérotrimériques couplées aux récepteurs transmembranaires, impliquées dans la transduction du signal en amont des voies précédentes (13)(Figure 3)

Ces voies permettent à la cellule d'intégrer les modifications de son environnement, notamment celles provenant de signaux extracellulaires. Elles jouent ainsi un rôle majeur dans la croissance, la prolifération et la survie cellulaire. Les voies de signalisation PI3K-AKT-mTOR et Ras-MAP kinases peuvent être activées par la fixation de ligands, en particuliers certains facteurs de croissance et cytokines, sur des récepteurs tyrosine kinase situés au niveau de la membrane cellulaire. À la suite de la liaison de ligand, le récepteur subit des changements conformationnels induisant notamment sa dimérisation. L'activation du récepteur entraîne une cascade de phosphorylations, conduisant à l'activation des effecteurs d'aval jusqu'au noyau cellulaire.

Ces voies de signalisation ubiquitaires sont impliquées dans une grande diversité de cancer (83–87), où une mutation activatrice au sein d'un des gènes de ces voies entraîne un échappement aux contrôles physiologiques, et une hyperactivation de la cascade de signalisation. À ce titre, elles sont la cible d'inhibiteurs plus ou moins spécifiques des différents composants impliqués, dont l'usage pourrait être transposé aux anomalies du développement avec atteinte cutanée en mosaïque (88,89).

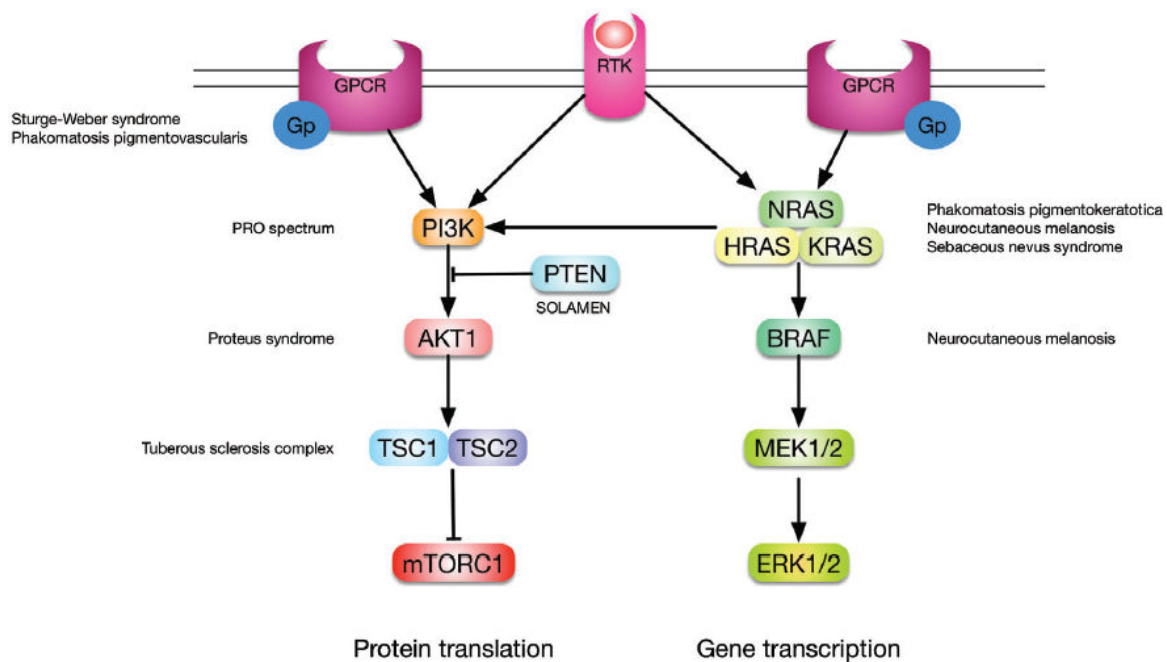
Les mutations décrites dans ces cascades de signalisations présentent ainsi un certain nombre de caractéristiques communes : elles présentent toutes un effet gain-de-fonction, avec hyperactivation de la voie de signalisation, sont souvent létales à l'état constitutionnel, et peuvent également être retrouvées dans des tissus tumoraux. En revanche, elles ne sont qu'exceptionnellement associées aux phénotypes pigmentaires faisant l'objet de ce travail, présents uniquement chez une minorité de patients porteurs de mutations post-zygotiques de *MTOR* (voir paragraphe suivant). S'il n'est pas exclu que des mutations responsables de dyschromies en mosaïque se situent dans des gènes hors de ces voies, les connaissances accumulées ces dernières années nous éclairent sur la « signature » des mutations potentiellement impliquées dans les dyschromies en mosaïque, par analogie avec celles responsables d'hypertrophies segmentaires ou d'anomalies vasculaires. Il s'agirait donc de mutations faux-sens, gain-de-fonction, létales à l'état constitutionnel, dans des gènes intolérants aux pertes de fonctions, d'expression ubiquitaires, et associés à un mécanisme de cancérogénèse.

Tableau 1 : Gènes responsables des anomalies du développement en mosaïque

Gène	Phénotype associé	#OMIM	Référence
<i>AKT1</i>	Syndrome de Protée	176920	(9)
<i>AKT3</i>	Mégalencéphalie-polymicrogyrie-polydactylie-hydrocéphalie	611223	(10)
<i>BRAF</i>	Syringocystadénome papillifère	164757	(90)
<i>FGFR1</i>	Lipomatose encéphalocrâniocutanée	613001	(91)
<i>FGFR2</i>	Nævus sébacé papillomateux	-	(92)
<i>FGFR2</i>	Nævus acnéique	-	(93)
<i>FGFR3</i>	Nævus épidermique kératosique	162900	(76)
<i>GNA11</i>	Phacomatose pigmento-vasculaire	'-	(13)
<i>GNAQ</i>	Angiome plan	163000	(79)
<i>GNAQ</i>	Syndrome de Sturge-Weber	185300	(79)
<i>GNAQ</i>	Phacomatose pigmento-vasculaire	'-	13)
<i>GNAS</i>	Syndrome de Mc Cune Albright	174800	(73)
<i>HRAS</i>	Nævus épidermique kératosique	162900	(94)
<i>HRAS</i>	Nævus sébacé	162900	(95)
<i>HRAS</i>	Syndrome de Schimmelpenning	163200	(12)
<i>HRAS</i>	Phacomatose pigmento-kératosique	'-	(96)
<i>KRAS</i>	Syndrome oculo-ectodermique	600268	(97)
<i>KRAS</i>	Syndrome de Schimmelpenning	163200	(12)
<i>MTOR</i>	Dysplasie corticale focale et/ou hypomélanose d'Ito	607341	(14)
<i>NRAS</i>	Nævus mélanocytaire congénital étendu	137550	(98)
<i>NRAS</i>	Mélanose neurocutanée	249400	(98)
<i>NRAS</i>	Syndrome de Schimmelpenning	163200	(99)
<i>PIK3CA</i>	PROS / Syndrome CLOVES / Klippel-Trenaunay	612918	(78)
<i>PIK3CA</i>	Syndrome MCAP	611223	(10)
<i>PIK3R2</i>	Mégalencéphalie-polymicrogyrie-polydactylie-hydrocéphalie	611223	(10)
<i>TEK</i>	Blue Rubber Bleb Nevus	112200	(100)

Les anomalies du développement exclusivement en mosaïque pour lesquelles les bases moléculaires sont identifiées à ce jour sont causées par des mutations post-zygotiques dans les gènes des cascades de signalisation PI3K-AKT-MTOR (*AKT1*, *AKT3*, *MTOR*, *PIK3CA*, *PIK3R2*) et RAS-MAPKinase (*BRAF*, *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*), dans des gènes codant les ligands des récepteurs tyrosine kinase en amont de ces voies (*FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*), dans un gène de récepteur Tyrosine Kinase (*TEK*), ou dans les protéines G hétérotrimériques couplées à ces récepteurs (*GNA11*, *GNAQ*).

Figure 3 : Représentation simplifiée des voies de signalisation PIK3-AKT-mTOR et RAS-MAPK, et de leur activation par les récepteurs tyrosine-kinase et les protéines G.



Adapté de van Steensel 2015 (80)

b. Causes génétiques des dyschromies cutanées en mosaïque

La majorité des identifications de causes monogéniques de syndromes en mosaïque ces dernières années ont donc concerné les syndromes avec hypertrophie. Les connaissances ont moins évolué en ce qui concerne les causes des syndromes avec dyschromie en mosaïque, telles que l'hypomélanose d'Ito (101) et la LWNH. Cette catégorie d'anomalies en mosaïque reste à ce jour peu explorée.

L'hypomélanose d'Ito a été décrite en 1952, comme une « image en négatif de l'*incontinentia pigmenti* » (102). Il s'agit d'une dépigmentation cutanée, congénitale ou acquise précocement, suivant une disposition en bandes ou taches selon les lignes de Blaschko, touchant au moins deux segments du corps, fréquemment associée à des signes extra cutanés, dont des atteintes du système nerveux central (103). Les plus fréquentes sont une déficience intellectuelle, une épilepsie, des anomalies diverses à l'imagerie cérébrale (hypoplasie cérébelleuse, anomalies de la substance blanche, dilatation ventriculaire), et ont été

interprétées comme la conséquence d'une anomalie de migration des cellules de la crête neurale. Ont également été rapportées des atteintes musculosquelettiques (scoliose, clinodactylies, déformations thoraciques), oculaires (strabisme, nystagmus, cataracte) et dentaires.

L'hypothèse d'un mosaïcisme génétique sous-jacent a été documentée dès 1988, avec l'identification d'aneuploïdies en mosaïques (104). Les anomalies de nombre de chromosomes en mosaïque sont fréquemment associées à l'HI, jusqu'à 52 % au sein de certaines cohortes (15) mais le lien physiopathologique demeure incertain. Tous les chromosomes peuvent être concernés, « à l'exception des chromosomes 21 et Y » (V. Sybert, communication personnelle)², une des anomalies les plus fréquentes étant la trisomie 18 en mosaïque, la tétrasomie 12p et les anomalies du chromosome X. Cependant, les tentatives d'isoler un gène ou un locus causal à partir des sites remaniés au sein des chromosomes impliqués n'ont pas été contributives (107).

À côté de ces anomalies chromosomiques fréquentes, peu de mutations monogéniques ont été identifiées. Elles ont nécessité l'avènement du NGS, qui a permis la mise en évidence d'une mutation post-zygotique récurrente de *MTOR* (14) dans l'HI avec (hémi)mégalencéphalie. L'hypopigmentation n'est cependant pas constante chez les patients porteurs de variants de *MTOR*, chez qui l'atteinte cérébrale est au premier plan.

Les tableaux comportant une hyperpigmentation, telles que la LWNH, semblent moins fréquent. Une étude exhaustive récente des cas rapportés dans des articles indexés sur PubMed (108) montre que parmi 651 patients avec dyschromie en mosaïque, 50% présentent une hypopigmentation, 43% une hyperpigmentation et 7% une atteinte mixte. Les individus des deux sexes sont concernés à part égale. Malgré les biais de publication inévitables, ce travail donne un ordre d'idée de la fréquence des manifestations extracutanées dans ces

² Kromann cite le chromosome 21 parmi ceux impliqués dans les dyschromies en mosaïque, mais en s'appuyant sur deux articles qui mentionnent ce chromosome dans l'impliquer formellement. En effet, Pinheiro et collaborateurs (105) rapportent une trisomie 21 constitutionnelle chez 2 patients, qu'il est difficile de lier au phénotype cutané en mosaïque, tandis que Woods et collaborateurs (106) rapportent un évènement que l'on doit probablement attribuer à un biais de culture (1 mitose sur 50 observées).

différentes atteintes. Les hyperpigmentations sont ainsi majoritairement isolées (68%), tandis que les hypopigmentations sont essentiellement syndromiques (73%). Les plus fréquentes des atteintes extracutanées concerne le développement intellectuel, puisque 54% des patients avec atteinte extracutanée sont porteur d'une déficience intellectuelle, suivi des atteintes squelettiques. En revanche, les auteurs n'ont pas pu déterminer, à la lumière de ce jeu de données conséquent, de tableau clinique récurrent qui permettrait d'identifier un syndrome reconnaissable. Il est d'ailleurs souligné, comme l'avait précédemment remarqué le Pr Happel (22), qu'une grande confusion existe autour des termes d'hypomélanose d'Ito ou de LWNH, et que ces derniers doivent être utilisés pour nommer un symptôme plutôt qu'une maladie, et qu'il est illusoire de vouloir évaluer la fréquence des manifestations extra-cutanée associées du fait de la variabilité de ces observations, inhérente au mosaïcisme sous-jacent. Seules les causes chromosomiques sont envisagées dans cette revue de littérature, qui sont impliquées chez environ 43% des patients ayant bénéficié d'une exploration en cytogénétique.

On peut tirer de ces travaux de cytogénétique, tout comme des efforts plus récents de caractérisation des causes moléculaires des dermatoses en mosaïque, un enseignement majeur quant au type de tissu à étudier. En effet, la mosaïque génétique est souvent confinée au tissu atteint, et absente (ou présente à très faible taux) dans le sang périphérique. Par ailleurs, la mise en culture des fibroblaste prélevés en zone cliniquement atteinte est source de biais : extinction de la mosaïque génétique par pression de sélection, ou apparition d'un nouvel élément en mosaïque artificiel (78,109). Ainsi, il est recommandé d'étudier de l'ADN extrait de biopsie de peau fraîche, sans mise en culture, ce qui peut être problématique quant à la quantité et la qualité du matériel disponible.

II. Objectifs

Les dyschromies cutanées en mosaïque représentent un groupe d'affections hétérogènes, de par leur type pigmentaire (hypopigmentation, hyperpigmentation, association des deux types précédents), la disposition des lésions, et leur caractère isolé ou syndromique (associé de manière variable à des atteintes neuro-développementales, des affections musculo-squelettiques, ou tout autre signe clinique).

En l'absence de bases génétiques clairement établies, la stratégie de prise en charge, les modalités de surveillance, les perspectives thérapeutiques ou encore le conseil génétique pour les patients souffrant de dyschromies cutanées en mosaïque et leurs familles sont bien souvent limités.

L'objectif de ce travail de thèse est de **déterminer les causes génétiques des anomalies de la pigmentation cutanée en mosaïque**, par l'étude, à l'aide de nouvelles technologies de séquençage, de l'ADN de patients, en impasse diagnostique, porteurs de dyschromies cutanées en mosaïque.

À cette fin, plusieurs moyens seront mis en œuvre :

- D'une part, sera réalisée une **étude pangénomique par séquençage d'exome à forte profondeur, idéalement en trio, de patients issus de la cohorte M.U.S.T.A.R.D., ayant bénéficié d'un phénotypage précis, à la recherche de variations en mosaïque dans de nouveaux gènes candidats**. Ces gènes pourront par la suite être étudiés de manière ciblée en séquençage à très forte profondeur chez d'autres patients de la cohorte. Les conséquences fonctionnelles des variations détectées seront étudiées dans le cadre de collaborations extérieures qui seront mises en place au cours de ce travail.

- D'autre part, **de nouvelles stratégies d'analyse des données de séquençage à haut débit seront développées**, pour détecter des variations génomiques pour lesquelles les stratégies conventionnelles sont en échec, en particulier les anomalies chromosomiques.

III. Matériel et Méthodes

Ce travail s'appuie sur une expertise déjà constituée au sein de l'équipe « Mosaïques » du laboratoire de Génétique des Anomalies du Développement, qui a réalisé au cours de ces dernières années l'identification de plusieurs gènes impliqués dans les anomalies du développement en mosaïque, dans des phénotypes adipeux, vasculaires ou kératinocytaires, (10,90,92). Un certain nombre d'éléments méthodologiques sont donc communs aux différents travaux de l'équipe, et n'ont nécessité que des adaptations ponctuelles dans le cadre de ce travail (telles que le pipeline général d'analyse des données de séquençage d'exome pour les SNV, ou la technique de séquençage ciblé). Pour ces éléments, la contribution de l'auteur consiste donc en une adaptation aux besoins spécifiques de la cohorte pigmentaire des outils communs du laboratoires, pour leur utilisation par ses soins. De plus, d'autres outils ont été spécifiquement développés pour répondre aux objectifs de ce travail, puis intégrés aux outils communs du laboratoire. C'est notamment le cas de l'ensemble des outils bioinformatiques permettant la détection des variations chromosomiques en mosaïque qui seront détaillés plus bas dans ce chapitre, ou de la stratégie de vérification de ces variations.

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

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

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

En août 2019, la cohorte comportait 1052 patients. Pour chacun d'entre eux, au moins un échantillon d'ADN est conservé, soit issu d'une biopsie de peau, soit issu d'un prélèvement sanguin. Les ADN des parents sont également conservés lorsqu'ils sont disponibles. Parmi les 1052 patients de la cohorte, une anomalie de la pigmentation cutanée en mosaïque est présente chez 191 patients. Parmi ceux-ci, ont été sélectionnés pour ce travail, au fur et à mesure de leur inclusion dans la cohorte, les patients répondant aux critères d'inclusion suivant : patient porteur d'une hyper- ou hypo-pigmentation de disposition évocatrice d'un mosaïcisme, sans être évocateur d'une cause précédemment identifiée (telle qu'un syndrome de McCune Albright, un tableau de phacomatose pigmento-vasculaire, un mosaïcisme segmentaire dans le cadre d'une Neurofibromatose, d'une Sclérose tubéreuse de Bourneville, ou d'un Albinisme...).

2. Extraction d'ADN

Les biopsies de peau des patients, prélevées en territoire atteint, sont extraites sans délai lors de la réception des échantillons au laboratoire. Afin d'éviter une diminution de la fraction allélique d'une variation, par pression de sélection négative au détriment de la population cellulaire mutée, aucune culture de fibroblastes n'est réalisée (78). En revanche, ce choix implique de ne disposer que d'une quantité relativement limitée d'ADN, liée au volume de la biopsie, à sa composition en tissu adipeux, et au rendement de la technique d'extraction utilisée, ce a notamment pour conséquence de restreindre la possibilité de réalisation d'examens itératifs.

Depuis la constitution de la cohorte M.U.S.T.A.R.D., plusieurs protocoles d'extraction de l'ADN génomique à partir de biopsie de peau fraîche, non cultivée, ont été utilisés, au fil des évolutions techniques :

- protocole 1, 2013-2017 : Qiagen Genra Puregene Tissue Kit
- protocole 2, 2017-2018 : Protocole local Phénol Chloroforme
- protocole 3, depuis 2019 : Extraction sur colonnes, Qiagen QIAamp DNA Mini kit.

Dans ces différents protocoles, les biopsies de peau nécessitent à la réception, une étape préalable de pesée et de fragmentation. Les cellules sont lysées avec une solution de lyse (telle que la *Cell Lysis* de Qiagen) en quantité adaptée au poids de la pièce de tissu. Les protéines sont lysées par la protéinase K.

L'ADN génomique est ensuite purifié : élimination des ARN par la RNase A et des protéines par précipitation dans les protocoles 1 et 2 (respectivement par la *Protein Precipitation Solution*, par une solution phénol-chloroforme-alcool isoamyl) ou par filtration sur colonnes dans le protocole 3. L'ADN est également précipité dans les protocoles 1 et 2 (respectivement à l'isopropanol et par une chloroforme-alcool isoamyl)

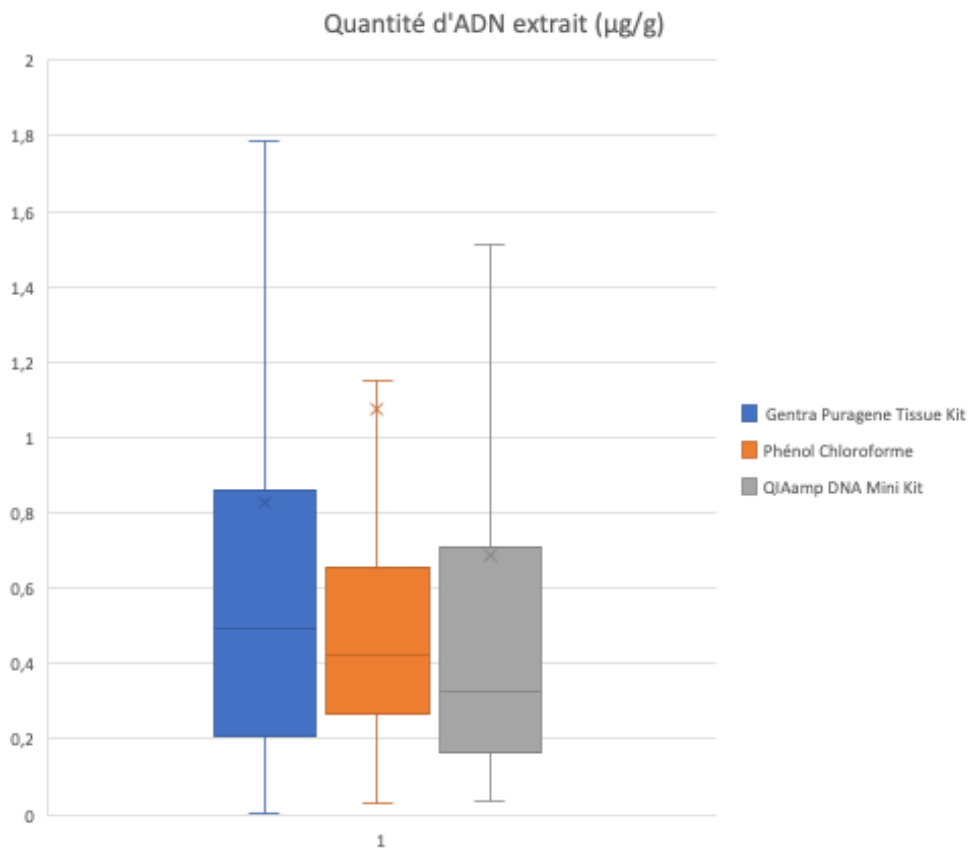
L'ADN est enfin lavé à l'éthanol et re-suspendu dans la *une solution d'hydratation*. La qualité et la quantité des ADN sont évaluées par dosage spectrophotométrique et fluorimétrique et migration sur gel d'agarose selon le protocole. En fonction de la qualité de l'ADN, il peut être nécessaire d'effectuer une ou plusieurs purifications. L'ADN peut ensuite être conservé

à -20°C, en vue d'une utilisation ultérieure pour le séquençage et les techniques complémentaires de vérifications de variations.

Un analyse rétrospective des données d'extraction pour les trois protocoles utilisés successivement depuis 2013, montre que la quantité d'ADN extrait d'une biopsie de peau est relativement stable, avec une médiane pour l'ensemble des échantillons extraits à respectivement 0,493 µg/gramme de biopsie, 0,423 µg/gramme de biopsie et 0,325 µg/gramme de biopsie (Figure 4). La valeur médiane pour la masse des biopsies extraites est de 18 g.

Cette valeur est à mettre en perspective avec la quantité d'ADN nécessaire pour la réalisation d'un ES en profondeur (1 à 3 µg actuellement, 5 µg au début de ce travail) ou de l'étude d'un gène en séquençage ciblé (environ 250 ng par gène). Étant donné qu'une partie de l'ADN est consommée pour la réalisation des contrôles qualité et tests de concordance, et une aliquote doit être conservée en prévision d'une éventuelle vérification de variation par une technique complémentaire, il apparaît qu'environ 25 % des biopsies ne permettent pas une extraction d'ADN en quantité suffisante pour la réalisation d'un ES.

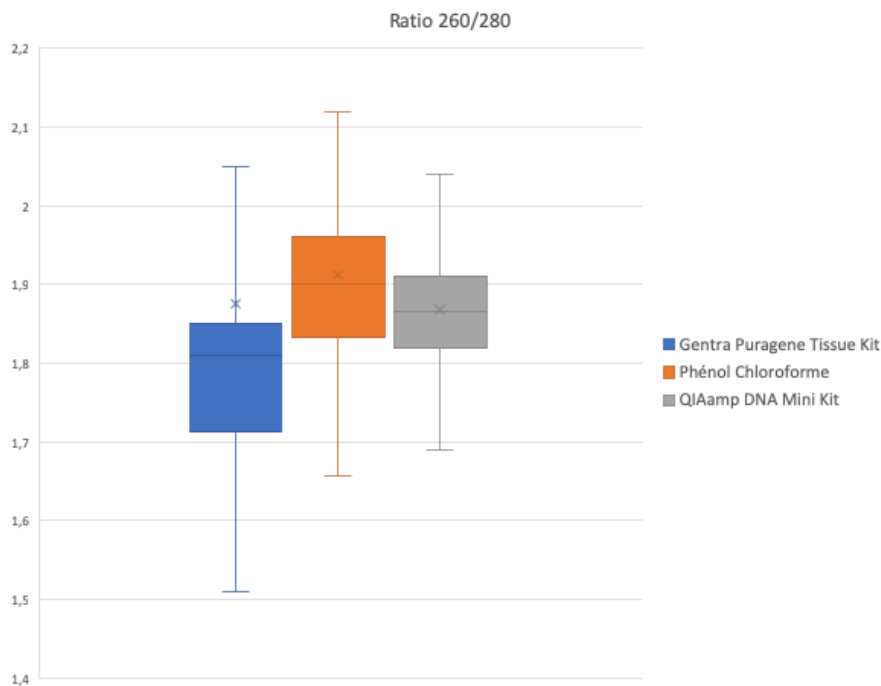
Figure 4 : Quantité d'ADN disponible après extraction, selon le protocole utilisé.



Exprimé en μg par gramme de biopsie. Données pour l'ensemble de la cohorte M.U.S.T.A.R.D. (Qiagen Gentra Puregene Tissue Kit : $n=282$; Protocole local Phénol Chloroforme : $n=150$; Qiagen QIAamp DNA Mini kit : $n=136$). Pour environ 25 % des patients, la quantité d'ADN disponible en une seule extraction est insuffisante pour la réalisation d'un ES.

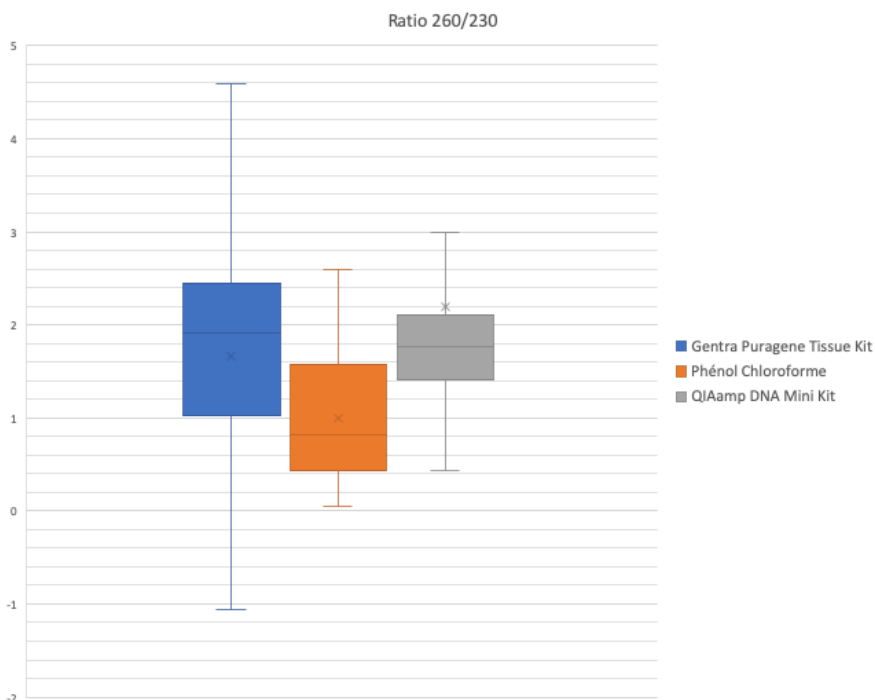
La pureté des échantillons varie selon le protocole utilisé (Figures 5 et 6). Le ratio $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ (augmenté >2 en cas de contamination par de l'ARN ou diminué $<1,8$ en présence de protéines, phénol et autres contaminants) est compris dans l'intervalle cible pour les 3 protocoles, mais plus homogène pour le protocole QIAamp. Le ratio $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ (Valeur cible entre 1,8 et 2 ; diminué en cas de contamination notamment par un solvant) est acceptable pour les protocoles 1 et 3, mais plus homogène pour ce dernier, et généralement abaissé pour le protocole 2. Il était en effet souvent nécessaire (environ 75 % des cas, valeur empirique) d'effectuer au moins une purification avant séquençage, ce qui conduisait à diminuer la quantité d'ADN disponible.

Figure 5 : ratio 260/280



Le ratio 260/280 est utilisé pour évaluer la contamination de protéines dans une solution d'acides nucléiques. La pureté d'une solution d'acides nucléiques est considérée comme acceptable lorsque le ratio 260/280 est compris entre 1,8 et 2,0.

Figure 6 : ratio 260/230



Le ratio A260/A230 est utilisé pour évaluer la contamination par le phénol, l'urée, l'EDTA... Un ratio A260/A230 compris entre 1,8 et 2 indique une bonne pureté des acides nucléiques.

3. Détermination de la stratégie de séquençage

En fonction de la présentation clinique, et de la disponibilité des ADNs du patient et de ses apparentés, la stratégie de séquençage se décompose en plusieurs étapes.

Dans un premier temps, si les ADN du patient et des parents sont disponibles en quantité et qualité suffisante (voir III.2), et en l'absence de gène candidat suspecté après analyse phénotypique, un séquençage d'exome en trio et en profondeur est réalisé. Exceptionnellement, un ES peut être réalisé en paire (comparaison de tissu atteint avec le sang du patient) en cas d'indisponibilité des parents.

En cas d'identification d'un gène candidat par ES, les données phénotypique des patients de la cohorte sont ré-analysées, afin de tenter d'identifier d'autres patients au phénotype proche, susceptibles de porter une variation du même gène. Pour ces derniers, le séquençage ciblé d'un ou plusieurs gènes candidats est réalisé en première intention.

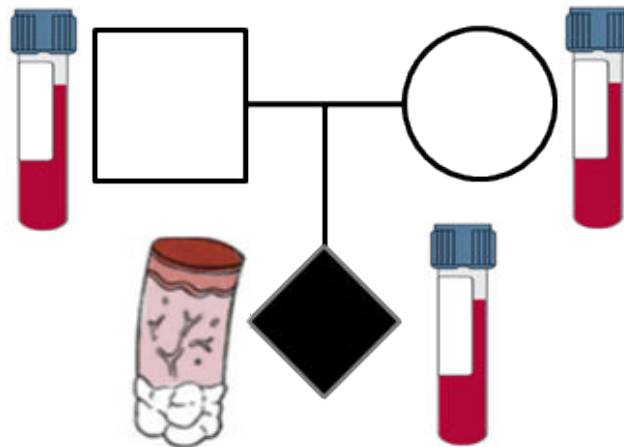
Enfin, lorsque la présentation clinique d'un nouveau patient était évocatrice d'un syndrome précédemment identifié dans le cadre de ce travail, le gène responsable était dans un premier temps étudié de manière ciblée. En l'absence d'orientation clinique, ou en cas de résultat négatif d'un séquençage ciblé, les dossiers étaient analysés individuellement en vue d'un séquençage d'exome.

4. Séquençage d'exome

Devant l'hypothèse d'une cause post-zygotique, le séquençage à haut débit de l'exome (Exome Sequencing, ES) est réalisé, en trio (cas index et ses deux parents) ou en comparaison en « paire » (biopsie de peau atteinte du cas index versus sang du cas index) en cas d'indisponibilité des parents, afin de permettre la détection d'un variant *de novo* en mosaïque (Figure 7.). Le séquençage est réalisé par un prestataire externe (Integragen, Evry, France), à partir d'une quantité de 1 à 3 µg d'ADN génomique par individu. Différents kits de capture

sont utilisés, en fonction de l'évolution des technologies. Le séquençage est effectué sur une plateforme Illumina. Il s'agit d'un séquençage *paired-end* produisant des séquences de 150 paires de bases. Une profondeur (nombre de lecture par base) minimale de 150X est demandée chez les cas index, et de 60x chez les apparentés, afin de détecter des variations à faible taux de mosaïcisme. Les données de séquençage brutes sont ensuite transmises au laboratoire pour analyse.

Figure 7 : Séquençage d'exome « en trio »



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

5. Séquençage ciblé à forte profondeur

Lorsque le phénotype d'un patient est évocateur d'un gène précédemment identifié au cours de ce travail, ce gène est étudié en séquençage haut débit (*Targeted Ultra Deep Sequencing, TUDS*), par séquençage d'amplicons sur un séquenceur de paillasse de type MiSeq disponible au laboratoire. Cette approche permet de produire un nombre très important de séquences, autorisant une profondeur de plus de 50.000X. Il est ainsi possible de détecter des variations à très faible taux, inférieur à 1% (78).

6. Analyse bioinformatique

Centre de Calcul de l'Université de Bourgogne – Le laboratoire dispose d'un accès au Centre de Calcul de l'Université de Bourgogne, un cluster de calcul composé de 350 serveurs Linux regroupant 5600 cœurs, avec une puissance de 300 TFLOPS (mars 2018). Il est utilisé pour le traitement des données issues du séquençage et leur stockage.

Pipeline – Les différentes étapes du traitement des données de séquençage, des contrôles qualité sur données brutes à l'annotation des variants, sont intégrées dans un algorithme appliqué à l'ensemble des patients. Après alignement sur le génome de référence (build GRCh37/hg19, UCSC Genome Browser) par le Burrows-Wheeler Aligner (BWA) (110), les duplicats de PCR sont marqués et retirés par le logiciel Picard (<http://picard.sourceforge.net>). Les scores de qualité de chaque base sont ajustés et l'alignement est affiné autour des événements d'insertion-délétion (indels) par différents outils du Genome Analysis Toolkit (GATK) (111) comme BaseRecalibrator ou IndelRealigner. Les bases qui diffèrent du génome de référence sont recherchées (*variant calling*) par HaplotypeCaller (GATK)(111) et annotées par SeattleSeqAnnotation. Dans le cas d'une analyse en trio, l'annotation se fera en tenant compte des liens de parenté pour différencier les variants hérités d'un des deux parents (ou présents dans le tissu sain pour les analyses en paire) ou *de novo*.

a. Variations nucléotidiques

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

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

- **dbSNP** (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/) : base recensant les polymorphismes chez l'homme. La présence d'une variation à une fréquence ≥ 1 % dans la base dbSNP est un motif de rejet de la variation, qui peut être considérée comme un polymorphisme
- **gnomAD** (*Genome Aggregation Database*, Broad Institute, Cambridge, USA, www.gnomad.broadinstitute.org) (112) : base de données issue du séquençage d'exome de 125 748 individus sains et de génomes de 15 708 individus sains. La présence de la variation dans cette base est également un argument en faveur de son caractère non pathogène, car le variant est toléré chez des sujets sains ou présentant un phénotype sans lien avec l'affection étudiée (à révélation tardive, ...). Elle fournit également des scores de tolérance aux variations faux-sens et non-sens pour chaque gène, basés sur la comparaison entre le nombre de variations observées et attendues (113).
- **CADD Score** (*Combined Annotation Dependent Depletion*) (114) : score intégrant plusieurs outils de prédiction *in silico* de l'effet d'un SNV ou de petites insertions ou délétions. Sur une échelle de 0 à 99, un variant portant un score ≥ 20 est situé parmi les 1 % les plus délétères
- **Grantham Score** (115) : dans le cadre d'une substitution d'acide aminé, évalue la distance entre la nature physicochimique des acides aminés concernés. Il varie entre 0 et 215 (distance la plus importante)
- Score de conservation **GERP** (*Genomic Evolutionary Rate Profiling*) (116) : score de conservation de chaque nucléotide, évalué par comparaison d'alignement multi-espèces. Il varie de -12.3 à 6.17 (le plus conservé)
- **PolyPhen-2** (117) : score de prédiction de l'impact d'une substitution d'acide aminé sur la fonction d'une protéine, établi à l'aide de données de structure et d'évolution comparative de la protéine concernée. Représentation du résultat sous forme d'une *heatmap* variant entre 0 (*neutral*) et 1 (*probably damaging*).
- **SIFT** (Sorting Intolerant From Tolerant) (118) : attribue à un variant (SNV ou indel) un score prédisant l'effet de la substitution d'acide aminé qui en découle sur la fonction protéique, à partir de données d'homologies de séquence ainsi que des propriétés physico-chimiques de ces acides aminés. Ce score se situe entre 0 et 1, une valeur inférieure à 0,05 étant considérée comme la prédiction d'une substitution délétère.

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

Les variations détectées sont également annotées en tenant compte des informations présentes dans les bases de données de variations associées aux maladies humaines, telles que ClinVar (119), COSMIC (120) et HGMD (121) (interprétations du caractère pathogène ou bénin d'une variation déjà référencée) ou OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD, USA), <https://omim.org/> : existence d'un tableau clinique identifié associé à des variations de ce gène).

Deux interprétations des données d'ES sont réalisées en aveugle par deux lecteurs.

b. CNV constitutionnels

Un outil de détection des microdélétions et microduplications à partir des données d'exome est intégré au pipeline général (algorithmeXHMM (122)). Il utilise le principe de la comparaison profondeur de séquençage, qui sera détaillé dans le paragraphe suivant. Même si l'hypothèse d'un CNV constitutionnel n'est pas au premier plan pour les patients issus de la cohorte M.U.S.T.A.R.D., une recherche de ces variations est systématiquement effectuée.

c. Variations chromosomiques en mosaïque

Les données d'ES permettent d'explorer environ 21 522 gènes (à titre indicatif, avec la capture Agilent SureSelect All Exon V5), soit 357 999 exons. Environ 50 000 SNV sont détectés par individu, dont une vaste majorité de variations fréquentes.

Afin de rechercher des variations chromosomiques en mosaïque chez les patients avec dyschromie en mosaïque, nous proposons un usage original de ces données, avec 3 méthodes d'analyses indépendantes :

- une étude de la profondeur de séquençage adaptée aux variations à faible taux,
- une étude des fractions alléliques,
- une étude de la transmission parentale des SNV, pour les ES en trio.

Comme pour l'analyse des variations nucléotidiques, deux interprétations des données d'ES sont réalisées en aveugle par deux lecteurs.

Afin d'éviter un biais lié à l'étude de matériel génétique issu d'une biopsie de peau, organe photo-exposé qui pourrait accumuler des variations somatiques sans lien avec l'anomalie du développement, le pipeline de détection des anomalies chromosomiques en mosaïque est également appliqué aux patients de la cohorte M.U.S.T.A.R.D. sans dyschromie en mosaïque.

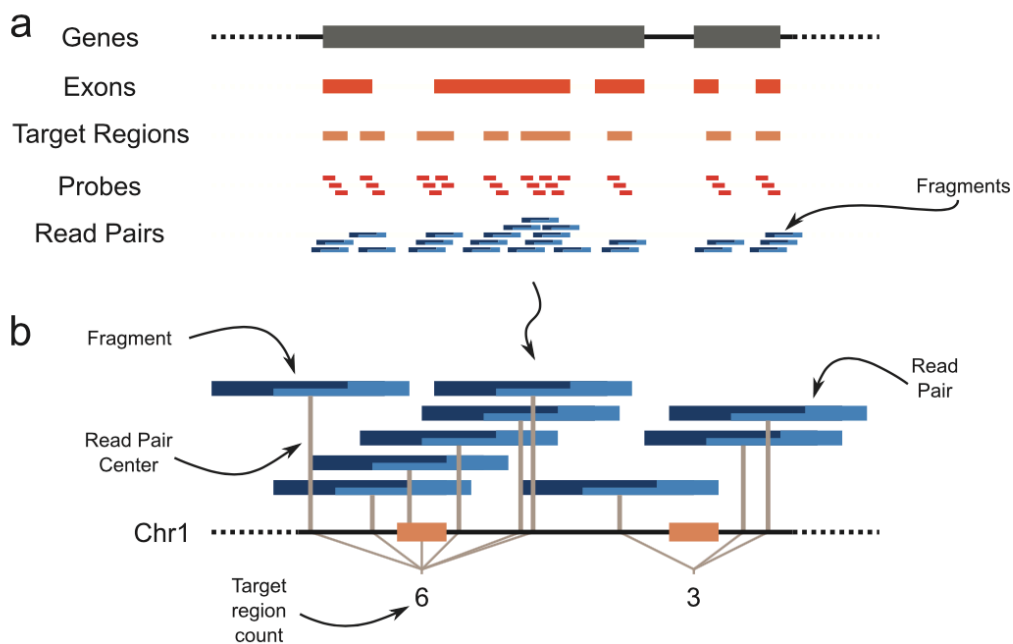
i. Outil 1 : Étude de la profondeur de séquençage

Objectif : détection de variation de nombre de copies

De nombreux logiciels permettent aujourd'hui de rechercher une variation chromosomique en mosaïque à partir de données d'ES, en utilisant une approche commune, l'étude de la profondeur de séquençage (Figure 8) : XHMM (122), WiseExome (123) ou encore ExomeCNV (124). À chaque exon, ou tout autre intervalle d'intérêt, peut être assigné une valeur, correspondant à la profondeur moyenne de séquençage de cette cible (soit le nombre de lectures s'alignant dans cette cible, divisé par la taille de la cible). Plusieurs étapes de

normalisations sont cependant nécessaires, afin de s'affranchir de différents biais (capture, amplification préférentielle de certaines régions, bruit de fond,...). À l'issue de ces normalisations intra-chromosomiques, inter-chromosomiques et inter-échantillons, une variation de cette valeur peut être corrélée à la quantité initiale d'ADN de cette région, et est donc un indicateur de la présence d'un mCV.

Figure 8 : Détection de CNV par la technique d'étude des variations de profondeur de séquençage en ES.



Adapté de Straver R. *et al.*, EJHG 2017 (123).

Cette approche est aujourd'hui validée pour la détection de CNV constitutionnels et tumoraux de taille variable : le logiciel XHMM est ainsi utilisé en routine au laboratoire GAD (Tisserant *et al.* (125), en préparation). La possibilité de détecter des CNV de l'ordre du Mb en mosaïque dans 40 à 50% des cellules a également été démontrée (126) Elle n'a cependant jamais été validée dans l'hypothèse de mCV de grande taille en mosaïque à faible taux.

La détection d'anomalies chromosomiques de grandes tailles, à des taux variables, tels que ceux rapportés par Virginia Sybert, implique de modifier les algorithmes de détection de variants constitutionnels. Par exemple, les seuils de détections fixés par XHMM (variation de

Z-score) ne sont pas adaptés aux CNV en mosaïque, et une analyse manuelle doit être effectuée. Nous proposons ici d'extraire les données de Z-score après normalisation, et de représenter ces données sous la forme d'un profil chromosomique (pour chaque chromosome) (Outil 1a) et d'une représentation des paramètres de distribution de cette variable sous la forme d'une « boîte à moustaches » (ou diagramme de Tukey : Outil 1b).

L'algorithme XHMM nécessitant un nombre élevé de contrôles (au minimum 50 échantillons, idéalement plusieurs centaines, indemnes de variations afin de pas masquer un évènement présent dans l'échantillon étudié lors des étapes de normalisation), l'ensemble des ES réalisés dans le cadre du diagnostic et de la recherche (hors cohorte M.U.S.T.A.R.D.) par l'équipe GAD peut être utilisé pour la normalisation (en pratique, actuellement 850 ES sont pris en compte dans le pool contrôle). Afin de détecter une anomalie gonosomique, chaque patient sera comparé à des contrôles du même sexe.

ii. Outil 2 : Étude des fractions alléliques

Objectif : détection de perte d'hétérozygotie ou d'aneuploïdie

L'étude de la distribution des fractions alléliques (FA) est effectuée à partir de l'ensemble des SNV détectés en ES. La distribution des SNV hétérozygotes s'apparent habituellement à une distribution normale centrée sur la valeur 50%, associée à un second pic à 100% correspondant aux variants homozygotes. Différents profils anormaux peuvent être anticipés :

- Répartition bimodale des SNV non-homozygotes : contribution d'un chromosome supplémentaire dans le cadre d'une trisomie
- Perte du pic à 50% : perte d'hétérozygotie, monosomie
- Pic à 50% aplati : CNV partiel, tétrasomie. Dans cette hypothèse, le profil pourra être généré de part et d'autre des bornes de l'évènement (localisées à l'aide de l'outil 1) pour éliminer le signal de la région non atteinte.

iii. Outil 3 : Étude des transmissions parent-enfant des SNP

Objectif : détection de perte d'hétérozygotie / disomies uniparentales

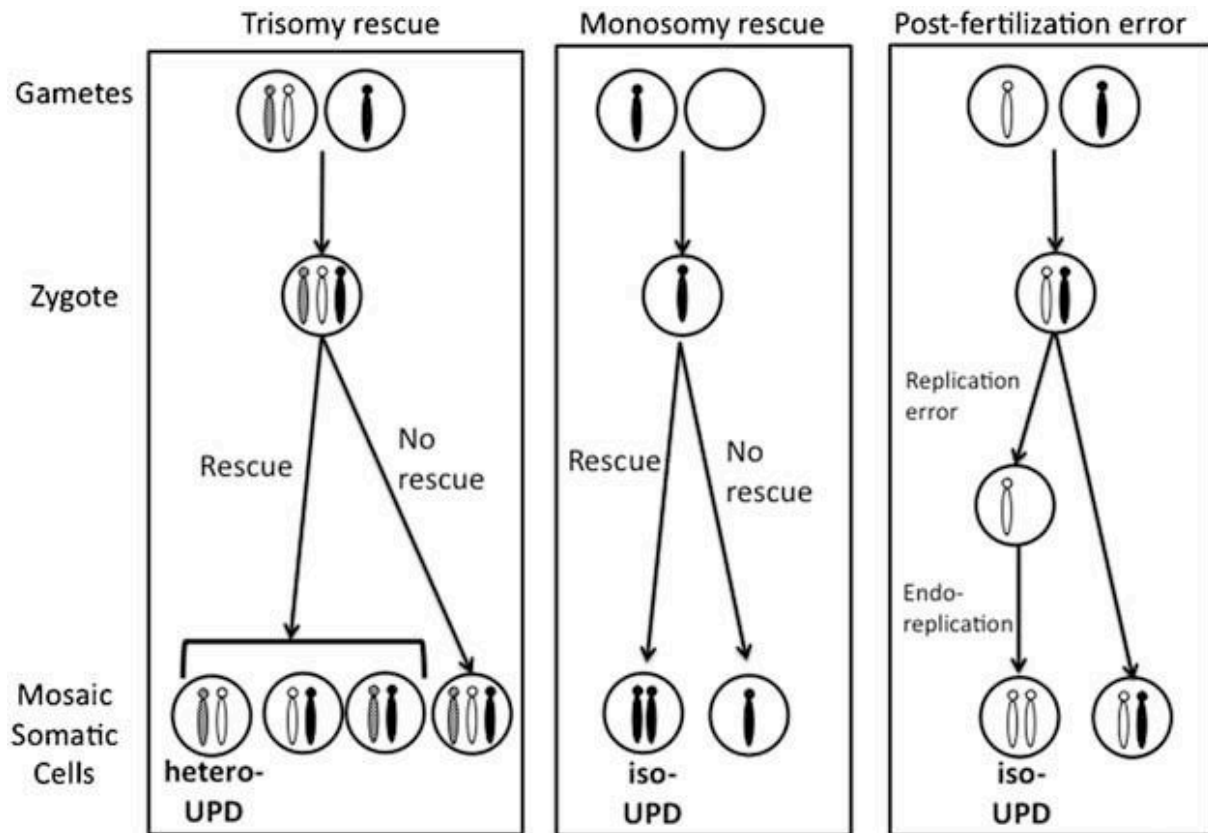
À l'aide de l'ES en trio, il est possible d'évaluer la transmission à l'enfant des allèles parentaux. Chaque parent contribuant de manière équivalente à chaque paire, par la transmission d'un chromosome homologue sur 2, dans le cadre d'une disjonction physiologique. Dans ce cas, 50% des SNV de chaque chromosome sont transmis à l'enfant. En cas d'erreur de méiose cependant, deux chromosomes homologues du même parent peuvent être transmis, causant pour le zygote une trisomie. Dans cette hypothèse, 100% des SNV sont transmis.

Seuls les SNV dits « informatifs » doivent être pris en compte dans cette évaluation, c'est-à-dire répondant aux critères suivants :

- SNV hétérozygotes chez un parent (car un SNV homozygote sera transmis dans 100 % des cas)
- Absents chez l'autre parent (afin de pouvoir identifier avec certitude l'origine parentale d'un SNV présent chez l'enfant)

Pour chaque SNV informatif chez un parent, on teste le statut de l'enfant. Un écart important de la valeur physiologique théorique de 50 % peut traduire une perte de l'allèle parental ou une double contribution parentale. Cette technique vise à détecter des anomalies telles qu'une hétérodisomie uniparentale, par correction de trisomie à la suite d'une erreur de méiose, ou une isodisomie uniparentale par exemple par correction de monosomie (Figure 9).

Figure 9 : Illustration des mécanismes conduisant à une disomie uniparentale : correction de trisomie ou de monosomie, erreur mitotique post-zygotique.



Adapté de Izumi *et al.*, 2013 (127)

Cette approche a déjà été abordée en SNP-array, en trio, dans le cas d'aneuploïdies telles que la trisomie 13, permettant d'identifier avec succès le mécanisme de pathogénicité de l'aneuploïdie (128), les disomies du chromosome 15 (129), ou le syndrome de Pallister-Killian (130). Son application aux variations chromosomiques en mosaïque, à partir de séquençage d'exome, contenant environ 6 fois moins de SNV, n'a en revanche pas été décrite.

7. Réplication des résultats et études fonctionnelles

a. Séquençage ciblé en profondeur, vérification des variants : Séquençage MiSeq

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

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

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

b. Validation des variations chromosomiques en mosaïque

La réalité biologique des événements détectés par au moins un des trois outils détaillés ci-dessus doit être confirmée par une technique de cytogénétique indépendante. En fonction de la nature de la variation et de la disponibilité du matériel, seront envisagées :

- **Analyse Chromosomique sur Puce à ADN (ACPA, Agilent 4x180k)** : pour confirmation d'un CNV de taille >25kb. La technique (puce est réalisée au sein du Laboratoire de Génétique Chromosomique et Moléculaire du CHU de Dijon. Un nouveau prélèvement (biopsie cutanée) pourra être proposé au patient si nécessaire. Pour confirmer le caractère somatique de l'évènement, l'ACPA est réalisée en paire (sur ADN de biopsie et de sang du patient),

- **SNP-array en trio** : pour confirmation d'une anomalie de transmission parentale de SNV, une analyse en SNP-array en trio pourra être réalisée dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire de Génétique de la Pitié Salpêtrière (Dr Boris Keren), sous réserve d'une quantité de matériel suffisante,
- **FISH** : pour confirmation d'un CNV ou remaniement chromosomique de taille supérieure ou égale à 1Mb, une FISH sur une apposition de biopsie fraîche pourra être réalisée. En effet, de même que pour les variations ponctuelles (voir en fin de paragraphe I.5), la mise en culture de la biopsie entraîne un risque de perte de la mosaïque chromosomique (ou d'apparition d'un artéfact de culture). L'apposition sans culture permet de limiter ce risque.
- **Étude des microsatellites** : la détermination du statut d'un sujet pour un ou plusieurs microsatellite(s) (répétition de longueur variable d'un motif de nucléotides) permet de rechercher la présence (ou l'absence) d'un allèle parental, par exemple dans l'hypothèse d'une disomie uniparentale ou d'une triploïdie en mosaïque.

c. Évaluation des conséquences fonctionnelles des variants détectés

Afin d'évaluer les conséquences fonctionnelles des variants nucléotidiques identifiés, en l'absence de ressources locales permettant ce type d'études, des collaborations externes doivent être mise en place, avec des équipes références selon le gène d'intérêt.

IV. Résultats

1. Cohorte

De janvier 2013 à août 2019, 1052 patients ont été inclus dans la cohorte M.U.S.T.A.R.D. Un phénotype pigmentaire était présent chez 191 d'entre eux. Pour 87 patients, ce phénotype ne répondait pas aux critères d'inclusion du présent travail (hyper- ou hypo-pigmentation de disposition évocatrice d'un mosaïcisme, sans être évocateur d'une cause précédemment identifiée impliquant par exemple les gènes *GNAS*, *NF1*, *TSC1*, *HRAS*, *KRAS*, ...), et ces patients n'ont donc pas été inclus dans ce travail. Trois patients ont également été exclus en raison d'informations cliniques insuffisantes (en particulier par manque d'information sur le territoire cutané prélevé : zone hyper/normo/hypopigmentée).

Au total, 101 patients ont donc été sélectionnés (Tableau 2), présentant majoritairement un tableau d'hypopigmentation (69%), plus rarement un tableau d'hyperpigmentation (27%) et exceptionnellement un tableau mixte (3%). Il s'agit à 59% d'une population féminine. Conformément aux critères d'inclusion initiaux de la cohorte M.U.S.T.A.R.D., qui privilégiaient initialement les anomalies pigmentaires syndromiques³, 89% des patients présentent un tableau syndromique.

³ La cohorte constituée en 2013 initialement intitulée « MOSAÏQUE » (Identifiant ClinicalTrials : NCT01950975), dont la cohorte M.U.S.T.A.R.D. est la continuité, prévoyait l'inclusion de 240 patients avec au moins 2 atteintes dont une cutanée : « *Eligibility Criteria : [...] Patients presenting at least two skin criteria, or one skin criterion and one non-skin criterion.*

Skin criteria: 1- extensive epidermal or sebaceous naevus, 2- Extensive "segmental" haemangioma, 3- Flat angioma or extensive complex vascular malformation, 4-Pigmentary disorders with patterns suggesting mosaicism (Blaschko lines)
Non-skin criteria: Cerebral, ocular, cardiac or genito-urinary malformation, asymmetric body, segmental hypertrophy of a limb, spinal dysraphism (only when associated with haemangioma). »

Tableau 2 : Description de la population étudiée.

Type d'anomalie pigmentaire	Effectif Total	Genre			Tableau clinique	
		Femme	Homme	NR	Syndromique	Isolé
Hypopigmentation	70 (69%)	43 (61%)	26 (37%)	1 (1%)	65 (93%)	5 (7%)
Hyperpigmentation	28 (27%)	15 (54%)	12 (43%)	1 (4%)	23 (82%)	5 (18%)
Mixte	3 (3%)	2 (67%)	1 (33%)	0	2 (67%)	1 (33%)
Total	101	60 (59%)	39 (39%)	2 (2%)	90 (89%)	11 (11%)

NR : donnée non renseignée.

2. Patients étudiés en NGS et résultats généraux

Après évaluation du phénotype des patients lors de la Réunion de Concertation Pluridisciplinaire du Centre de Référence MAGEC, et en fonction des échantillons d'ADN disponibles, il peut être proposé de réaliser un séquençage d'exome en profondeur en trio (éventuellement en paire – comparaison tissu atteint versus sang – en cas d'indisponibilité des parents), ou un séquençage ciblé en profondeur d'un gène candidat.

Un séquençage d'exome a été réalisé en première intention chez 44 patients. Pour 40 autres patients, au moins une hypothèse étiologique a pu être formulée, en fonction du type d'anomalies pigmentaires, et de leur intégration dans un cadre syndromique reconnaissable. Entre 1 et 3 gène(s) candidat(s) ont ainsi été étudiés. En seconde intention, pour 12 d'entre eux, devant la négativité de ces analyses, un séquençage d'exome a été réalisé.

Au total, 84 patients ont donc fait l'objet à ce jour d'une analyse en NGS, dont 56 en ES.

Des variations post-zygotiques candidates ont été identifiées chez 27 patients dans 6 gènes différents (32 %), et deux autres étaient porteurs de mutations gonosomiques dans un même gène, soit constitutionnelle soit en mosaïque, pouvant faire suspecter la participation d'un mosaïcisme fonctionnel (2 %). Enfin, des variations chromosomiques ont été identifiées chez 17 patients supplémentaires (20 %), portant à 46 le nombre de patients pour lesquels une étiologie a été mise en évidence par cette approche (55 % de la cohorte, Tableau 3).

Tableau 3 : Résultats généraux de la cohorte M.U.S.T.A.R.D., groupe pigmentaire

Type de variation	Gène ou mécanisme chromosomique	Nombre de patient		
		ES	TUDS	Total
Mutation post-zygotique	<i>MTOR</i>	1	13	14
	<i>DEPDC5</i>	1	0	1
	<i>KITLG</i>	1	0	1
	<i>RHOA</i>	3	3*	6
	<i>DOCK1</i>	3	0	3
	<i>GNA13</i>	1	1	2
Mutation post-zygotique ou constitutionnelle	<i>TFE3</i>	2	0	2**
Variations chromosomiques	Trisomie	5		17
	Tétrasomie	6		
	Monosomie	2		
	Triploïdie	4		

* une de ces variations a été détectée par la technique de Sanger. Même si cette technique est moins quantitative que le TUDS, le caractère post-zygotique de cette variation peut être affirmé par son absence du sang du patient.

** deux autres patientes étudiées au laboratoire GAD, mais appartenant à une autre cohorte, sont également porteuses d'une mutation du gène *TFE3*, voir *infra*.

Ces résultats seront détaillés dans les trois prochaines sections.

3. Variations ponctuelles postzygotiques : Publications découlant du travail de thèse

La recherche des anomalies génétiques responsables de dyschromies cutanées en mosaïque par séquençage haut débit chez des patients de la cohorte M.U.S.T.A.R.D. dans le cadre du présent travail a menée à l'identification de variations en mosaïque dans 4 gènes ayant fait l'objet d'un article publié ou en cours de soumission. Il s'agit soit de la première association du gène avec une pathologie du développement (variations postzygotiques de *RHOA*, variations *TFE3* avec mosaïcisme fonctionnel), soit de l'identification d'un nouveau phénotype reconnaissable lié à un gène par ailleurs déjà associé à une affection mendélienne dominante (variations postzygotiques de *KITLG* et *MTOR*).

Ces articles seront présentés dans les quatre paragraphes suivants.

a. Article 1 : Dysplasie ectodermique liée au gène *RHOA*

Article en co-1^{er} auteur, publié dans Nature Genetics :

BRIEF COMMUNICATION

<https://doi.org/10.1038/s41588-019-0498-4>

nature
genetics

Postzygotic inactivating mutations of *RHOA* cause a mosaic neuroectodermal syndrome

Pierre Vabres^{1,2,3,24*}, Arthur Sorlin^{1,2,3,4,24}, Stanislav S. Kholmanskih^{5,24}, Bénédicte Demeer⁶, Judith St-Onge^{1,2,7}, Yannis Duffourd^{1,2}, Paul Kuentz^{1,2,8}, Jean-Benoît Courcet^{1,2,4}, Virginie Carmignac^{2,3}, Philippine Garret^{1,2}, Didier Bessis⁹, Odile Boute¹⁰, Alain Bron¹¹, Guillaume Captier¹², Esther Carmi¹³, Bernard Devauchelle¹⁴, David Geneviève¹⁵, Catherine Gondry-Jouet¹⁶, Laurent Guibaud¹⁷, Arnaud Lafon¹⁸, Michèle Mathieu-Dramard⁶, Julien Thevenon^{1,2,4}, William B. Dobyns¹⁹, Geneviève Bernard^{7,20,21}, Satyamaanasa Polubothu²², Francesca Faravelli²², Veronica A. Kinsler²², Christel Thauvin^{1,2,4}, Laurence Faivre^{1,2,4,25}, M. Elizabeth Ross^{5,25} and Jean-Baptiste Rivière^{1,2,7,23,25*}

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

Linear hypopigmentation, which is commonly seen as a non-specific manifestation of mosaicism, is currently classified using poorly defined umbrella terms such as 'pigmentary mosaicism' and 'hypomelanosis of Ito'¹. Because of its frequent association with various extracutaneous anomalies (especially cerebral involvement and epilepsy), hypomelanosis of Ito is often considered as a neurocutaneous syndrome, the fourth most common after neurofibromatosis, tuberous sclerosis complex and Sturge-Weber syndrome². Apart from rare reports of nonrecurrent mosaic chromosomal anomalies³, the genetic causes of pigmentary mosaicism are largely unknown, which hinders diagnosis and patient care.

As part of our research program on mosaic skin disorders, we evaluated seven unrelated individuals with a remarkably similar constellation of features that did not match any known syndrome

(Fig. 1, Supplementary Figs. 1 and 2 and Supplementary Table 1). Key clinical features included linear hypopigmentation and hypotrichosis following the lines of Blaschko, symmetric or asymmetric facial dysmorphism (microstomia, malar hypoplasia, downsloped palpebral fissures and broad nasal bridge), acral anomalies (brachydactyly, syndactyly and broad first toe), teeth anomalies (oligodontia, microdontia, conical teeth and abnormal enamel) and ocular anomalies (microphthalmia, strabismus and myopia). Brain magnetic resonance imaging (MRI) was available for five patients and showed diffuse cystic leukoencephalopathy with mildly enlarged lateral ventricles (Fig. 1 and Supplementary Fig. 2) in four of them. Despite this striking brain phenotype, no intellectual deficiency or neurological impairment was noted in any affected individual. Linear hypopigmentation following Blaschko's lines, asymmetric craniofacial and brain features and sporadic occurrence were highly suggestive of mosaicism.

We hypothesized that this previously unrecognized mosaic neuroectodermal syndrome probably resulted from postzygotic mutations in the same gene. We conducted whole-exome sequencing (WES) in two parent-case trios (participants S1 and S2) using genomic DNA derived from participants' affected skin and parental blood samples (Methods and Supplementary Table 2). We identified the same postzygotic change of *RHOA* (NM_001664.3:c.139G>A;

¹Fédération Hospitalo-Universitaire Médecine Translationnelle et Anomalies du Développement, Centre Hospitalier Universitaire Dijon Bourgogne, Dijon, France. ²UMR Inserm 1231 Génétique des Anomalies du Développement, Université Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France. ³Centre de Référence MAGEC, Service de Dermatologie, Centre Hospitalier Universitaire Dijon Bourgogne, Dijon, France. ⁴Service de Pédiatrie 1 et de Génétique Médicale, Centre Hospitalier Universitaire Dijon Bourgogne, Dijon, France. ⁵Center for Neurogenetics, Feil Family Brain and Mind Research Institute, Weill Cornell Medicine, New York, NY, USA. ⁶Unité de Génétique Médicale et Oncogénétique, Centre Hospitalier Universitaire Amiens Picardie, Amiens, France. ⁷Child Health and Human Development Program, Research Institute of the McGill University Health Centre, Montreal, Quebec, Canada. ⁸Génétique Biologique Histologie, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Besançon, Besançon, France. ⁹Département de Dermatologie, Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Montpellier, France. ¹⁰Service de Génétique Clinique, Centre Hospitalier Universitaire Lille, Lille, France. ¹¹Service d'Ophtalmologie, Centre Hospitalier Universitaire Dijon Bourgogne, Dijon, France. ¹²Service de Chirurgie Orthopédique et plastique Pédiatrique, Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Montpellier, France. ¹³Dermatology Office, Amiens, France. ¹⁴Département de Chirurgie Maxillo-Faciale et Stomatologie, Centre Hospitalier Universitaire Amiens Picardie, Amiens, France. ¹⁵Département de Génétique Médicale, Maladies rares et Médecine Personnalisée, Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Montpellier, France. ¹⁶Département de Radiologie, Centre Hospitalier Universitaire Amiens Picardie, Amiens, France. ¹⁷Service d'Imagerie Pédiatrique et Foetale, Hôpital Femme-Mère-Enfant Louis Pradel, Hospices Civils de Lyon, Bron, France. ¹⁸Service d'Odontologie-Stomatologie, Centre Hospitalier Universitaire Dijon Bourgogne, Dijon, France. ¹⁹Center for Integrative Brain Research, Seattle Children's Research Institute, Seattle, WA, USA. ²⁰Departments of Neurology and Neurosurgery, and Pediatrics McGill University, Montreal, Quebec, Canada. ²¹Department of Medical Genetics, Montreal Children's Hospital, McGill University Health Centre, Montreal, Quebec, Canada. ²²Institute of Child Health, University College London, London, UK. ²³Department of Human Genetics, Faculty of Medicine, McGill University, Montreal, Quebec, Canada. ²⁴These authors contributed equally: Pierre Vabres, Arthur Sorlin, Stanislav S. Kholmanskih. ²⁵These authors jointly supervised this work: Laurence Faivre, M. Elizabeth Ross, Jean-Baptiste Rivière. *e-mail: pierre.vabres@chu-dijon.fr; jean-baptiste.riviere@mcgill.ca

i. Identification de variants post-zygotiques du gène RHOA

Le séquençage de l'exome complet en trio chez trois patients porteurs d'un syndrome neuro-ectodermique en mosaïque non décrit jusqu'à présent a permis l'identification de variants post-zygotiques dans un même gène, *RHOA* (c.139G>A; p.(Glu47Lys) chez les sujets S1 et S2, c.211C>T p.(Pro71Ser) chez le sujet 3). Ce gène, non rapporté en maladie humaine constitutionnelle, a par la suite été étudié en séquençage ciblé en profondeur (TUDS) chez 3 patients supplémentaires, partageant une présentation clinique comparable, menant à l'identification du variant c.139G>A chez deux d'entre eux. Enfin, une étude en séquençage ciblé par technique de Sanger réalisé par l'équipe du Pr Veronica Kinsler (Londres) a également montré la présence de la mutation c.139G>A p.(Glu47Lys) en mosaïque (absente du sang), chez une jeune patiente au phénotype très comparable (patiente 7 de la publication). Les deux variants étaient absents de la base de données publiques de variants en population normale gnomAD, et prédits pathogènes par l'ensemble des scores de prédiction utilisés.

ii. Phénotype associé aux variants post-zygotiques de RHOA

Les six patients porteurs de variants post-zygotiques de *RHOA* partagent un phénotype commun, non décrit à ce jour dans la littérature, qui pourrait être qualifié de « *RHOA-related mosaic ectodermal dysplasia* ». Il est défini par l'association d'une hypomélanose d'Ito avec hypotrichose en bandes, d'une asymétrie faciale, d'anomalies des extrémités, d'anomalies dentaires et oculaires évolutives et d'une atteinte de la substance blanche cérébrale apparemment non progressive, chez des patients sans atteinte intellectuelle (Tableau 4). Ce syndrome polymalformatif, même en l'absence de signe pathognomonique le caractérisant, est cliniquement reconnaissable. Sa définition devrait aider au diagnostic d'autres patients.

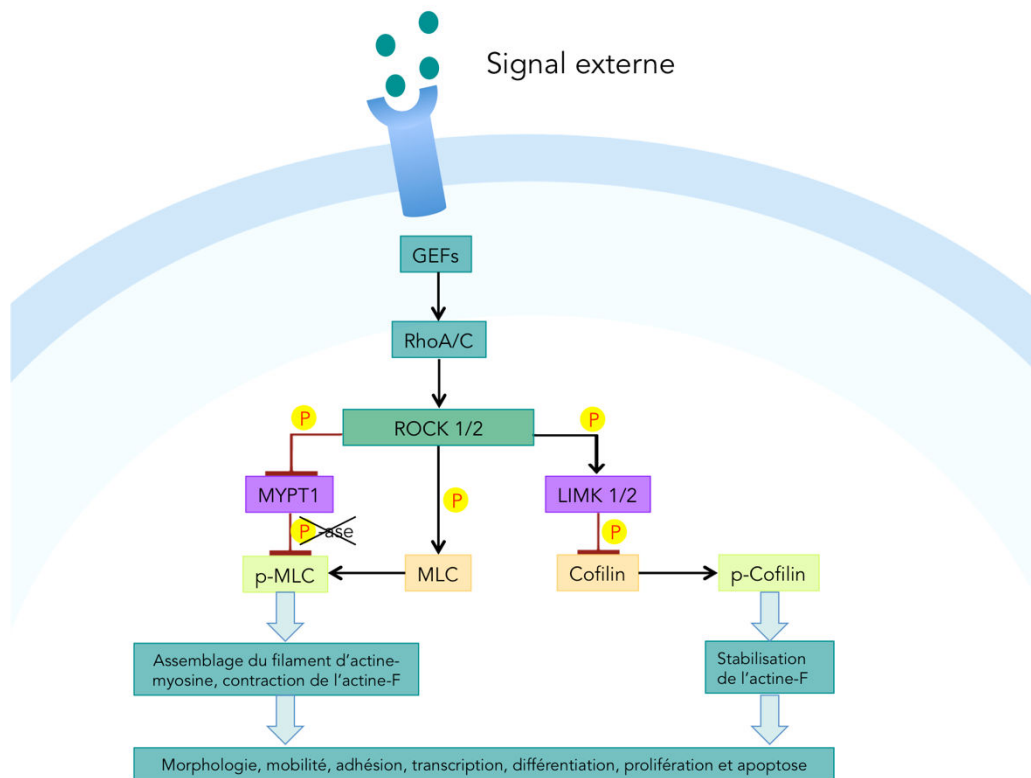
Tableau 4 : Dysplasie ectodermique en mosaïque associée aux mutations du gène *RHOA*

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

iii. Évaluation des conséquences fonctionnelles des variants

RHOA code la protéine RhoA (Ras homologue gene family, member A), une petite GTPase de la superfamille Ras dont le rôle a été particulièrement étudié en pathologie cancéreuse (131). Elle intervient notamment dans la polarité cellulaire, la migration et l'adhésion, à travers la dynamique du cytosquelette d'actine, la régulation de la formation des fibres de stress et des adhésions focales (132,133). L'action de RhoA passe par la kinase ROCK (Rho-associated protein kinase), qui contrôle l'équilibre d'activité entre MLC2 et Cofilin, dont dépendent ces fonctions. ROCK phosphoryle MLC2 (*Myosin light chain 2*), tout en empêchant la déphosphorylation de MLC2 en phosphorylant MYPT1 (*Myosin phosphatase target subunit 1*), ce qui conduit à son inactivation (Figure 10).

Figure 10 : Rôle de la protéine RhoA



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

Pour évaluer les conséquences fonctionnelles des variants de *RHOA* identifiés, nous avons comparé l'impact des substitutions c.139G>A p.(Glu47Lys), présente chez 5 patients, et c.211C>T p.(Pro71Ser), présente chez une patiente, avec ceux de mutations identifiées et documentées dans le cadre de processus tumoraux : c.41G>T p.(Gly14Val), entraînant une hyper-activation de RhoA, et c.56_57delCAinsAT p.(Thr19Asn), avec un effet dominant négatif (134,135).

Des cellules NIH 3T3 (lignée cellulaire standard, dérivée de fibroblastes) ont été transfectées par différents plasmides, porteurs de l'un des variants cités plus haut, ou de la séquence sauvage de *RHOA*.

Ces travaux montrent pour les deux variants, d'une part, en immunocytochimie, une diminution de l'étalement cellulaire et de la formation des fibres de stress, et d'autre part en Western Blot, une diminution de l'expression des formes phosphorylées actives des effecteurs d'aval de RhoA. L'effet des variants p.(Glu47Lys) et p.(Pro71Ser) est similaire à celui du variant dominant négatif p.Thr19Asn. Il s'agit donc de l'illustration d'un nouveau mécanisme de pathogénicité parmi les mutations post-zygotiques impliquées dans les anomalies du développement en mosaïque : elles ont jusqu'à présent toujours été décrites comme activatrices, responsables d'une dérégulation de la cascade de signalisation concernée (activation constitutive), qui expliquerait l'hypertrophie présente dans plusieurs de ces syndromes. Nous pouvons formuler l'hypothèse qu'une altération des fonctions de RhoA dans la morphogénèse, le chimiotactisme, la guidance axonale ou encore le cycle cellulaire, est susceptible d'entraîner les différentes atteintes tissulaires observées dans ce tableau de dysplasie neuroectodermique.

Nous supposons en particulier que l'atteinte hypopigmentée linéaire est le reflet d'une anomalie de migration des kératinocytes, plutôt que des mélanocytes. En effet, la disposition des atteintes primitivement mélanocytaires observée dans d'autres affections en mosaïque, comme les nævus mélanocytaires congénitaux, les angiomes plans ou la phacomatose pigmento-vasculaire, ne suit pas les lignes de Blaschko (90), mais plutôt deux types de topographie reconnaissables, l'une concentriques, l'autre quadrangulaire (136). En revanche, nous avons démontré, dans un tableau de LWNH, une surexpression kératinocytaire de *KITLG*, vraisemblablement responsable d'une augmentation de la mélanogénèse (137) (voir *infra*). Par ailleurs, l'hypotrichose associée à l'hypopigmentation peut également être imputée à une anomalie de migration des kératinocytes, constituants du follicule pileux, plutôt que des mélanocytes.

iv. Un gène nécessaire au développement : la survie par le mosaïcisme

La plupart des mutations des gènes impliqués dans les anomalies du développement en mosaïque, en particulier dans les syndromes hypertrophiques, sont des mutations activatrices, ayant pour conséquence une suractivation d'une voie de signalisation. Le mosaïcisme permet donc l'expression d'une mutation dont la présence à l'état constitutionnel serait létale. Il s'agit de la validation récente de l'hypothèse sur la physiopathologie des

anomalies en mosaïque formulée par le Professeur Happle en 1986 (59). Il est probable qu'une mutation perte de fonction à l'état constitutionnel de *RHOA* soit également létale chez l'humain, et que la poursuite du développement ne soit permise que par la présence de ces mutations de manière non homogène dans les cellules de l'organisme. Plusieurs arguments indirects peuvent être avancés :

Absence de variants de RhoA dans les bases de données en population dite « normale » – Dans la base de données ExAC, le nombre de mutations faux-sens observées est significativement inférieur au nombre attendu (5/66,9, z-score à 3,70) et aucune mutation tronquante n'est rapportée (contre 5,1 attendues, non significatif). Un total de 3 230 gènes sont ainsi exempts de variant tronquant, en majeure partie inconnus en maladie humaine (138). Des données plus complètes sont attendues avec la base gnomAD, mais ne sont pas encore disponibles. Une première approximation en est fournie par le score RVIS (*Residual Variation Intolerance Score*) (139). En tenant compte de la dernière version des données de gnomAD, ce score situe *RHOA* parmi les 38 % des gènes les plus intolérants aux variants – résultat également non significatif (classé « Edge case – Y »), en raison du trop faible nombre globale de variations pour ce gène.

Présence de RHOA dans les listes des gènes indispensables au développement – *RHOA* fait également partie des gènes nécessaires à la survie cellulaire, parmi 1 333 gènes mis en évidence à la fois par deux techniques d'identification par mutagenèse à grande échelle, induisant des pertes de fonction : une technique *gene-trap* ayant identifié 1 734 gènes dits du *core essentialome* (140), et une technique CRISPR-Cas9 ayant identifié 1 878 gènes (141). Dans ces deux études, et partiellement dans une troisième (142) (dans 2 lignées sur 5), il a été montré qu'un *knock-out* de *RHOA* est donc incompatible avec le développement.

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

être expliquée soit par l'origine mésodermique des leucocytes, dans l'hypothèse d'une mutation post-zygotique confinée à l'ectoderme, soit par une sélection négative des cellules sanguines mutantes (143).

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

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

Elle permet de formuler l'hypothèse du rôle encore non décrit d'une nouvelle voie de signalisation liée à *RHOA*, distincte des voies RAS-MAPK et PI3K-AKT-mTOR qui comportent la majorité des gènes identifiés dans ces affections. Par ailleurs, la pathogénicité des mutations post-zygotiques de cette voie pourrait passer par un nouveau mécanisme, différent de l'activation constitutive de la voie résultant d'une mutation gain de fonction.

La mise en évidence du rôle de *RHOA* dans les dyschromies en mosaïque a été déterminante dans l'identification chez d'autres patients de la cohorte de variations au sein des gènes *DOCK1* et *GNA13*, codant deux facteurs d'échange de nucléotides guanyliques (GEFs) pour les GTPases de la famille Rho (voir plus bas).

Postzygotic inactivating mutations of *RHOA* cause a mosaic neuroectodermal syndrome

Pierre Vabres^{1,2,3,24*}, Arthur Sorlin^{1,2,3,4,24}, Stanislav S. Kholmanskikh^{5,24}, Bénédicte Demeer⁶, Judith St-Onge^{1,2,7}, Yannis Duffourd^{1,2}, Paul Kuentz^{1,2,8}, Jean-Benoît Courcet^{1,2,4}, Virginie Carmignac^{2,3}, Philippine Garret^{1,2}, Didier Bessis⁹, Odile Boute¹⁰, Alain Bron¹¹, Guillaume Captier¹², Esther Carmi¹³, Bernard Devauchelle¹⁴, David Geneviève¹⁵, Catherine Gondry-Jouet¹⁶, Laurent Guibaud¹⁷, Arnaud Lafon¹⁸, Michèle Mathieu-Dramard⁶, Julien Thevenon^{1,2,4}, William B. Dobyns¹⁹, Geneviève Bernard^{7,20,21}, Satyamaanasa Polubothu²², Francesca Faravelli²², Veronica A. Kinsler²², Christel Thauvin^{1,2,4}, Laurence Faivre^{1,2,4,25}, M. Elizabeth Ross^{1,2,5,25} and Jean-Baptiste Rivière^{1,2,7,23,25*}

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

Linear hypopigmentation, which is commonly seen as a non-specific manifestation of mosaicism, is currently classified using poorly defined umbrella terms such as 'pigmentary mosaicism' and 'hypomelanosis of Ito'¹. Because of its frequent association with various extracutaneous anomalies (especially cerebral involvement and epilepsy), hypomelanosis of Ito is often considered as a neurocutaneous syndrome, the fourth most common after neurofibromatosis, tuberous sclerosis complex and Sturge–Weber syndrome². Apart from rare reports of nonrecurrent mosaic chromosomal anomalies¹, the genetic causes of pigmentary mosaicism are largely unknown, which hinders diagnosis and patient care.

As part of our research program on mosaic skin disorders, we evaluated seven unrelated individuals with a remarkably similar constellation of features that did not match any known syndrome

(Fig. 1, Supplementary Figs. 1 and 2 and Supplementary Table 1). Key clinical features included linear hypopigmentation and hypotrichosis following the lines of Blaschko, symmetric or asymmetric facial dysmorphism (microstomia, malar hypoplasia, downslanted palpebral fissures and broad nasal bridge), acral anomalies (brachydactyly, syndactyly and broad first toe), teeth anomalies (oligodontia, microdontia, conical teeth and abnormal enamel) and ocular anomalies (microphthalmia, strabismus and myopia). Brain magnetic resonance imaging (MRI) was available for five patients and showed diffuse cystic leukoencephalopathy with mildly enlarged lateral ventricles (Fig. 1 and Supplementary Fig. 2) in four of them. Despite this striking brain phenotype, no intellectual deficiency or neurological impairment was noted in any affected individual. Linear hypopigmentation following Blaschko's lines, asymmetric craniofacial and brain features and sporadic occurrence were highly suggestive of mosaicism.

We hypothesized that this previously unrecognized mosaic neuroectodermal syndrome probably resulted from postzygotic mutations in the same gene. We conducted whole-exome sequencing (WES) in two parent-case trios (participants S1 and S2) using genomic DNA derived from participants' affected skin and parental blood samples (Methods and Supplementary Table 2). We identified the same postzygotic change of *RHOA* (NM_001664.3:c.139G>A;

¹Fédération Hospitalo-Universitaire Médecine Translationnelle et Anomalies du Développement, Centre Hospitalier Universitaire Dijon Bourgogne, Dijon, France. ²UMR Inserm 1231 Génétique des Anomalies du Développement, Université Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France. ³Centre de Référence MAGEC, Service de Dermatologie, Centre Hospitalier Universitaire Dijon Bourgogne, Dijon, France. ⁴Service de Pédiatrie 1 et de Génétique Médicale, Centre Hospitalier Universitaire Dijon Bourgogne, Dijon, France. ⁵Center for Neurogenetics, Feil Family Brain and Mind Research Institute, Weill Cornell Medicine, New York, NY, USA. ⁶Unité de Génétique Médicale et Oncogénétique, Centre Hospitalier Universitaire Amiens Picardie, Amiens, France. ⁷Child Health and Human Development Program, Research Institute of the McGill University Health Centre, Montreal, Quebec, Canada. ⁸Génétique Biologique Histologie, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Besançon, Besançon, France. ⁹Département de Dermatologie, Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Montpellier, France. ¹⁰Service de Génétique Clinique, Centre Hospitalier Universitaire Lille, Lille, France. ¹¹Service d'Ophthalmologie, Centre Hospitalier Universitaire Dijon Bourgogne, Dijon, France. ¹²Service de Chirurgie Orthopédique et plastique Pédiatrique, Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Montpellier, France. ¹³Dermatology Office, Amiens, France. ¹⁴Département de Chirurgie Maxillo-Faciale et Stomatologie, Centre Hospitalier Universitaire Amiens Picardie, Amiens, France. ¹⁵Département de Génétique Médicale, Maladies rares et Médecine Personnalisée, Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Montpellier, France. ¹⁶Département de Radiologie, Centre Hospitalier Universitaire Amiens Picardie, Amiens, France. ¹⁷Service d'Imagerie Pédiatrique et Fœtale, Hôpital Femme-Mère-Enfant Louis Pradel, Hospices Civils de Lyon, Bron, France. ¹⁸Service d'Odontologie-Stomatologie, Centre Hospitalier Universitaire Dijon Bourgogne, Dijon, France. ¹⁹Center for Integrative Brain Research, Seattle Children's Research Institute, Seattle, WA, USA. ²⁰Departments of Neurology and Neurosurgery, and Pediatrics McGill University, Montreal, Quebec, Canada. ²¹Department of Medical Genetics, Montreal Children's Hospital, McGill University Health Centre, Montreal, Quebec, Canada. ²²Institute of Child Health, University College London, London, UK. ²³Department of Human Genetics, Faculty of Medicine, McGill University, Montreal, Quebec, Canada. ²⁴These authors contributed equally: Pierre Vabres, Arthur Sorlin, Stanislav S. Kholmanskikh. ²⁵These authors jointly supervised this work: Laurence Faivre, M. Elizabeth Ross, Jean-Baptiste Rivière. *e-mail: pierre.vabres@chu-dijon.fr; jean-baptiste.riviere@mcgill.ca

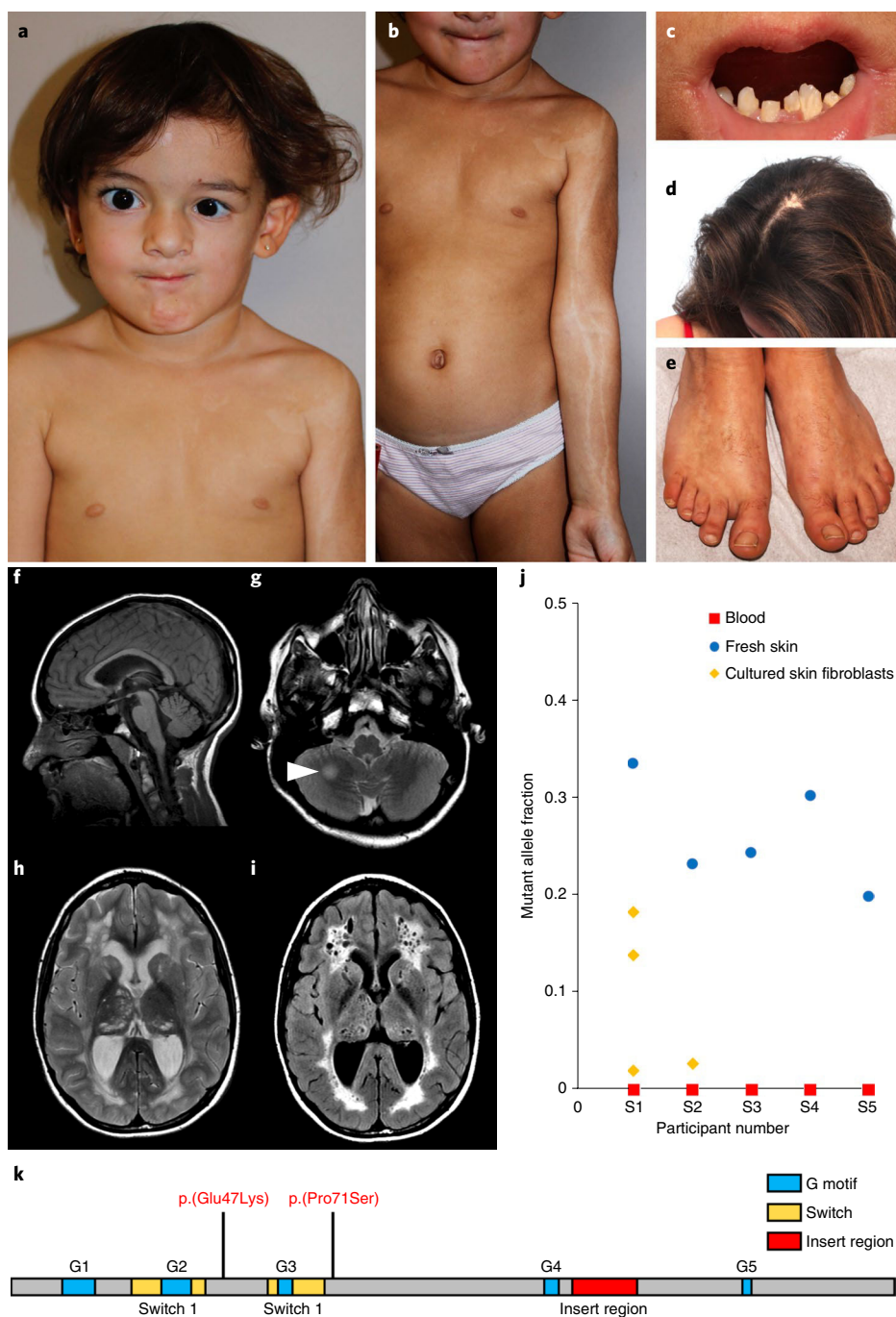


Fig. 1 | Main clinical features of *RHOA*-related mosaic ectodermal dysplasia and *RHOA* mutations. **a–e**, Craniofacial appearance (**a**) and linear hypopigmentation (**b**) in participant S4, and dental anomalies (**c**), alopecia (**d**) and acral anomalies (**e**) in participant S1. **f–i**, Brain MRI of participant S1 at 15 years. A second MRI, conducted 6 months later, did not show any substantial change. Participants S2 and S4 had similar but milder MRI abnormalities, including enlarged temporal horns of the lateral ventricles (Supplementary Fig. 2). Sagittal T1-weighted imaging revealed preserved midline structures (**f**). Axial T2-weighted imaging revealed a focal hyperintense lesion in the right hemisphere of the cerebellum (**g**, arrowhead) and diffuse cystic leukoencephalopathy with mildly enlarged lateral ventricles and cysts in the thalami and caudate nuclei (**h**). Leukoencephalopathy and presence of multiple cysts was confirmed on fluid-attenuated inversion recovery sequences (**i**). **j**, Mutant allele fraction of *RHOA* mutations in the five participants studied in WES or tough decoy sequencing. **k**, Linear representation of *RHOA* and localization of the two mutations.

NP_001655.1:p.(Glu47Lys)) supported by 30.6% (44 out of 144) and 2.6% (6 out of 228) of reads in participants S1 and S2, respectively (Supplementary Figs. 3 and 4 and Supplementary Table 3). We confirmed the presence and postzygotic nature of these mutations by targeted ultra-deep sequencing of the region spanning the c.139G>A substitution in all available DNA samples from the two patients and their parents (Methods and Supplementary Tables 4–6). Trio-based

WES in a third patient (participant S3) led to the identification of another postzygotic *RHOA* change (NM_001664.3:c.211C>T; NP_001655.1:p.(Pro71Ser)) supported by 24.3% (28 out of 115) of reads (Supplementary Fig. 5), thus confirming mutations of *RHOA* as the cause of this previously unknown syndrome. Amplicon-based ultra-deep sequencing of *RHOA* coding exons in skin-derived DNA from the remaining three affected individuals, and Sanger sequencing

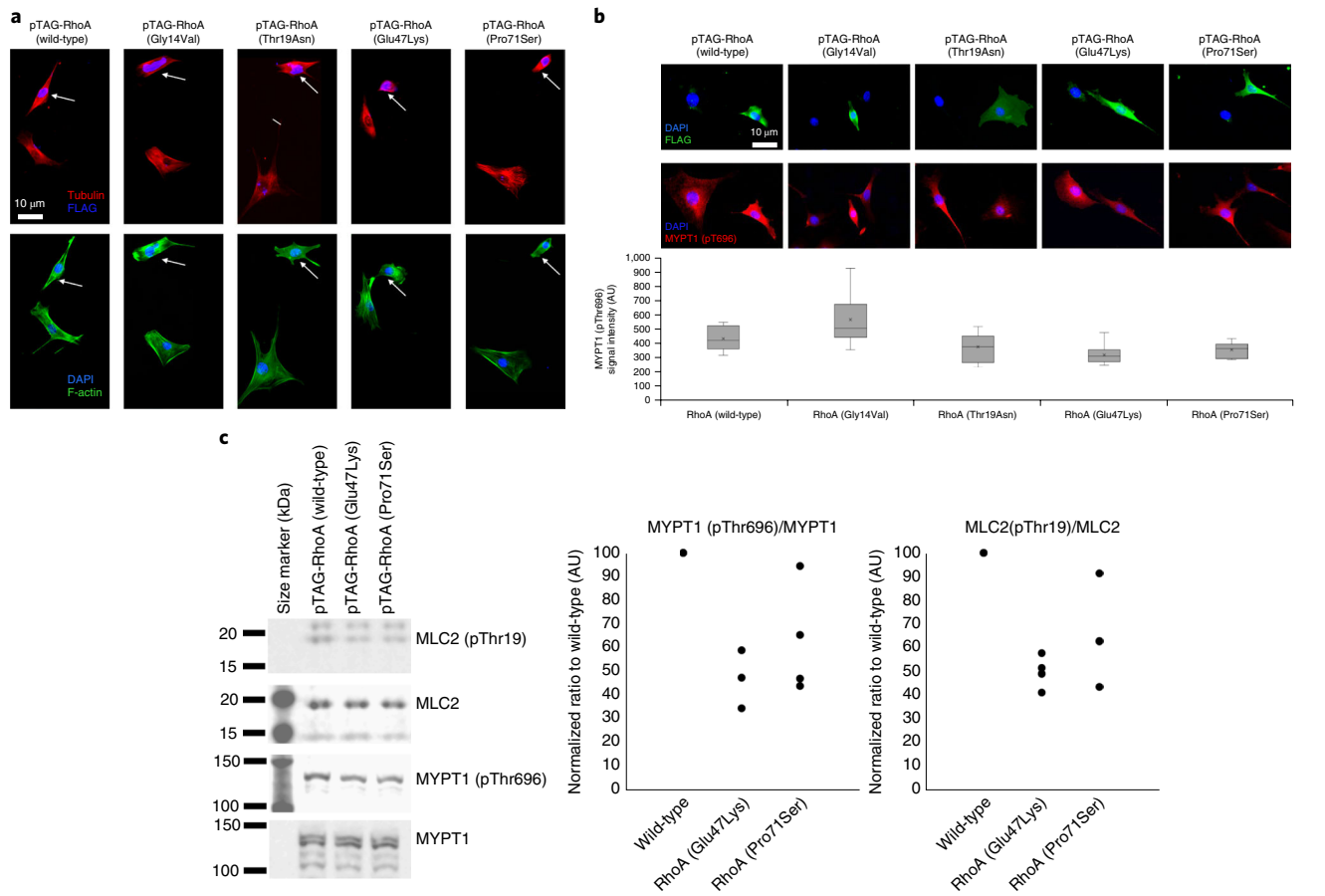


Fig. 2 | The inactivating effect of the two *RHOA* mutations. **a,b**, Cytoskeletal organization and morphology in NIH/3T3 cells transfected with wild-type, constitutively active p.(Gly14Val), dominant-negative p.(Thr19Asn), p.(Glu47Lys) and p.(Pro71Ser) forms of RhoA. **a**, Top: dual labeling for DAPI (blue) and α -tubulin (green) does not reveal significant differences in the gross organization of the microtubule cytoskeleton or nuclear morphology between different mutants. All cells ($n=20$ per group) selected at random across the coverslip that were individually examined showed reduced stress fibers and limited cell spreading. Bottom: cells transfected with constructs for expression of wild-type RhoA or the p.(Gly14Val) mutant display expected increase in F-actin staining, particularly with regard to stress fibers, which are brighter, thicker and more numerous. Cells transfected with constructs for expression of p.(Thr19Asn), p.(Glu47Lys) or p.(Pro71Ser) mutants barely contain any stress fibers at all. **b**, Top: FLAG staining does not reveal any visible differences in the subcellular localization of different *RHOA* mutants. All mutants tended to impair cell spreading, while wild-type *RHOA*-overexpressing cells maintain normal morphology. Middle: dual labeling for DAPI (blue) and pMYPT1 (red) shows decrease in signal intensity of MYPT1 (pThr696) staining on transfection with p.(Thr19Asn) (control), p.(Glu47Lys) or p.(Pro71Ser) mutants. Bottom: Quantification of MYPT1 (pThr696) staining shows significant decrease ($n=20, 24, 14, 30$ and 13 cells, for wild-type, p.(Gly14Val), p.(Thr19Asn), p.(Glu47Lys) and p.(Pro71Ser), respectively). The following box plot elements are shown: 5th and 25th percentiles, median, mean (cross), 75th and 95th percentiles. AU, arbitrary units. **c**, Levels of phosphorylated MYPT1 (pThr696) and MLC2 (pThr19). Left: cropped images of immunoblot experiment showing the expression levels of total MYPT1, pMYPT1, total MLC2 and pMLC2. There is a visible reduction in pMYPT1 and pMLC2 when *RhoA* p.(Thr19Asn) or *RhoA* p.(Glu47Lys) are overexpressed. Middle and right: dot plot of normalized ratio (four independent experiments) for pMYPT1 and pMLC2 normalized to total MYPT1 and MLC2, respectively, indicate a reduction in MYPT1 (pThr696) and MLC2 (pThr19) on *RhoA* p.(Glu47Lys) or *RhoA* p.(Pro71Ser) overexpression. Further analyses for p.(Glu47Lys) are shown in Supplementary Fig. 7. Full scans of the immunoblots are provided in Supplementary Fig. 8.

of *RHOA* in one extra individual, led to the identification of the recurrent c.139G>A change (encoding p.(Glu47Lys)) in three (S4, S5 and S7) out of a total of five participants with the exact same change (Supplementary Table 6). This G to A transition occurs at a CpG dinucleotide, which might at least partly explain its recurrence. Participant S6 could not be analyzed due to failed quality controls. Both *RHOA* mutations (c.139G>A and c.211C>T) were absent from the SNP database build 147 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>), major public variant databases and in-house WES data from approximately 1,500 individuals. They affect highly conserved nucleotides and amino acids and are predicted as pathogenic in silico (Supplementary Table 7). All mutations were absent from the blood samples of affected individuals. In skin-derived DNA samples, mutant allele fractions ranged from 1.9 to 33.5%, with higher levels in fresh skin than in cultured skin fibroblasts (Fig. 1j

and Supplementary Table 6), possibly due to negative selection of mutant cells during cell culture. WES in participant S2 also revealed a previously unknown familial NC_012920.1:m.11778G>A NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4 in mitochondrial complex I mitochondrial DNA, causing Leber's hereditary optic neuropathy and probably responsible for a more severe loss of visual acuity (Supplementary Fig. 6). No *RHOA* mutations were found in 24 additional participants with linear hypopigmentation associated with various extracutaneous features (Supplementary Table 8).

RHOA encodes a Ras-related Rho GTPase known to control a wide range of biological functions such as morphogenesis, chemotaxis, axonal guidance and cell cycle progression³. Transforming protein RhoA (RhoA) has been extensively studied for its central role in signal transduction and actin cytoskeleton dynamics, through the regulation of stress fibers and focal adhesion formation⁴. The two

amino acids at which alterations were identified here (p.(Glu47Lys) and p.(Pro71Ser)) are located just downstream of each of the two switch regions (Fig. 1k), at which GTP-dependent conformational changes regulate selective interaction of RhoA with downstream effectors⁵. To assess the impact of the p.(Glu47Lys) and p.(Pro71Ser) missense changes identified in four of our patients, we compared their effects with two well-characterized RhoA mutants, namely a dominant-negative mutant with a p.(Thr19Asn) substitution⁶ and a constitutively active mutant with a p.(Gly14Val) substitution⁷. We transfected NIH/3T3 cells with plasmids encoding FLAG-tagged mutants or wild-type RhoA. Immunocytochemical labeling of F-actin stress fibers and microtubules revealed marked cytoskeletal alterations in cells transfected with plasmid encoding either mutant identified in patients. Similarly to cells expressing the dominant-negative RhoA protein with the p.(Thr19Asn) substitution, cells expressing the mutant proteins with p.(Glu47Lys)- and p.(Pro71Ser) substitutions displayed reduced cell spreading and a decreased number of stress fibers, as well as microtubule disorganization (Fig. 2a,b), thus indicating a dominant-negative or otherwise inactivating effect for these two alterations. Consistent with these findings, immunoblot analysis of NIH/3T3 cells transfected with plasmids encoding dominant-negative RhoA with the p.(Thr19Asn) substitution or mutant RhoA protein with p.(Glu47Lys) or p.(Pro71Ser) revealed reduced levels of endogenous myosin phosphatase-targeting subunit 1 (MYPT1) phosphorylated at Thr696 (pThr696) and myosin light chain 2 (MLC2) phosphorylated at Thr19 (pThr19), both of which sites are targeted by Rho-associated protein kinase 1, a major downstream effector of activated RhoA⁸ (Fig. 2c and Supplementary Fig. 7).

We have delineated a clinical and molecular subset of pigmentary mosaicism, which we propose to name ‘*RHOA*-related mosaic ectodermal dysplasia’. Apart from recent reports of linear hypopigmentation in six patients with *MTOR*-related hemimegalencephaly⁹, no specific genes have been implicated in pigmentary mosaic disorders. Our findings highlight the value of careful clinical phenotyping combined with massively parallel sequencing for elucidating their genetic causes. The syndrome described in this study presents both similarities and notable differences with other mosaic syndromes involving the skin, such as disorders of the PI3K-Akt-mTOR and RAS-MAPK pathways¹⁰. Transforming protein RhoA is a highly conserved protein particularly intolerant to amino acid substitutions, with only five observed missense changes in the Exome Aggregation Consortium (66.9 expected variants; $z = 3.70$) and no loss-of-function alleles (5.1 expected)¹¹. Accordingly, *RHOA* is part of the ‘core essentialome’, a set of genes essential to cell viability^{12,13}, thus supporting the idea that *RHOA*-related mosaic ectodermal dysplasia should be added to the list of disorders resulting from lethal mutations surviving only by mosaicism, which includes Proteus, Sturge-Weber and some other mosaic syndromes¹⁴. All postzygotic mutations reported to date as causing such mosaic syndromes have been activating mutations also frequently found in somatic cancer¹⁵. Our data show that disease-causing lethal mutations surviving by mosaicism can act through a probably dominant-negative effect. Intriguingly, although both dominant-negative and activating *RHOA* mutations are known somatic driver mutations in several cancer types, neither of the two mutations identified in this study has been reported in cancer (Supplementary Table 9). The absence of both variants in blood, as commonly observed in mosaic development disorders¹⁶, is consistent with the known pivotal role of RhoA in hematopoietic stem cell and lymphocyte development¹⁷, suggesting negative selection of mutant blood cells. Hence, for diagnostic purpose, mutation testing in *RHOA*-related mosaic ectodermal dysplasia should be performed on a biopsy from affected skin, as in other mosaic conditions. We hypothesize that most clinical manifestations in *RHOA*-related mosaic ectodermal dysplasia result from anomalies in cell migration, particularly in the brain and eye. However, we cannot exclude additional mechanisms, such as inhibition of nuclear factor NFκB p105

subunit, or alteration of the Wnt pathway, similar to the male-lethal X-linked diseases incontinentia pigmenti or focal dermal hypoplasia, since RhoA is involved in the regulation of both pathways^{18–20}. Finally, similar to mosaic overgrowth disorders of the PI3K-Akt-mTOR pathway, identification of other genes causing ectodermal mosaic syndromes may pinpoint common pathogenesis pathways, which will help enhance our understanding of their causes and ultimately result in novel therapeutic opportunities.

Online content

Any methods, additional references, Nature Research reporting summaries, source data, statements of code and data availability and associated accession codes are available at <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0498-4>.

Received: 19 December 2016; Accepted: 15 August 2019;
Published online: 30 September 2019

References

1. Sybert, V. P. *J. Invest. Dermatol.* **103**, 141S–143S (1994).
2. Pavone, P., Praticò, A. D., Ruggieri, M. & Falsaperla, R. *Neuro. Sci.* **36**, 1173–1180 (2015).
3. Canman, J. C. et al. *Science* **322**, 1543–1546 (2008).
4. Hall, A. *Science* **279**, 509–514 (1998).
5. Vetter, I. R. & Wittinghofer, A. *Science* **294**, 1299–1304 (2001).
6. Pan, Z. K. et al. *J. Immunol.* **160**, 3038–3045 (1998).
7. Zhao, X. et al. *Cancer Res.* **69**, 483–491 (2009).
8. Maekawa, M. et al. *Science* **285**, 895–898 (1999).
9. Mirzaa, G. M. et al. *JAMA Neurol.* **73**, 836–845 (2016).
10. van Steensel, M. A. M. *J. Pediatr. Genet.* **4**, 144–153 (2015).
11. Lek, M. et al. *Nature* **536**, 285–291 (2016).
12. Blomen, V. A. et al. *Science* **350**, 1092–1096 (2015).
13. Wang, T. et al. *Science* **350**, 1096–1101 (2015).
14. Happle, R. *Hum. Genet.* **72**, 280 (1986).
15. Fernández, L. C., Torres, M. & Real, F. X. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 43–55 (2016).
16. Kuentz, P. et al. *Genet. Med.* **19**, 989–997 (2017).
17. Zhang, S., Zhou, X., Lang, R. A. & Guo, F. *PLoS ONE* **7**, e33773 (2012).
18. Tong, L. & Tergaonkar, V. *Biosci. Rep.* **34**, e00115 (2014).
19. Ordóñez-Morán, P. et al. *J. Cell Biol.* **183**, 697–710 (2008).
20. Rodrigues, P. et al. *Nat. Commun.* **5**, 5458 (2014).

Acknowledgements

We thank the participants and families involved in the study. We also thank the University of Burgundy Centre de Calcul (<https://haydn2005.u-bourgogne.fr/dsi-csub/>) for technical support and management of the informatics platform. This work was funded by the Agence Nationale de la Recherche (grant no. ANR-13-PDOC-0029 to J.-B.R.), the Programme Hospitalier de Recherche Clinique National 2010 (grant no. NCT01950975 to P.V.), the NIH (grant no. HD067244 to M.E.R.) and the Société Française de Dermatologie. G.B. has received a Research Scholar Junior 1 (2012–2016) salary award from the Fonds de Recherche en Santé and the New Investigator salary award (2017–2022) from the Canadian Institute for Health Research (no. MOP-G-287547, file no. 24805).

Author contributions

P.V. and J.-B.R. designed the study. A.S., J.S.-O., P.K., J.-B.C., V.C., S.P. and V.A.K. performed the genetics experiments. J.-B.R., Y.D. and P.G. performed the bioinformatics experiments. S.S.K. performed the functional experiments. P.V., A.S., B. Demeer, D.B., O.B., A.B., G.C., E.C., C.T., S.P., F.F., V.A.K., B. Devauchelle, D.G., C.G.-J., A.L., M.M.-D., J.T. and L.F. recruited and evaluated the study participants. L.G., G.B. and W.B.D. analyzed the brain MRI. P.V., L.F., M.E.R. and J.-B.R. supervised the study. P.V., A.S., S.S.K., M.E.R. and J.-B.R. wrote the manuscript. All authors revised the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0498-4>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to P.V. or J.-B.R.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature America, Inc. 2019

Methods

Study participants. The study included seven unrelated affected individuals and their unaffected parents. Individuals were phenotyped and recruited by geneticists and dermatologists in Dijon and elsewhere in France through a collaborative nationwide effort to identify genes causing mosaicism syndromes involving the skin (ClinicalTrials.gov registration no. NCT01950975; <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01950975?term=NCT01950975&rank=1>). Inclusion criteria consisted of the following: sporadic condition; congenital or early-childhood onset; and cutaneous lesions with a pattern suggestive of mosaicism associated with extracutaneous anomalies. We obtained written informed consent from all participants or their legal representatives. We also obtained written consent to publish the displayed photographs of individuals. The ethics committee of Dijon University Hospital approved the study. We extracted genomic DNA from fresh skin, cultured skin fibroblasts and blood samples using the Genra Puregene Blood and Tissue Extraction Kit (QIAGEN). We assessed genomic DNA integrity and quantity by agarose gel electrophoresis, NanoDrop spectrophotometry and Qubit fluorometry (Thermo Fisher Scientific).

WES. Exome capture and sequencing were performed at IntegraGen from 1 µg of genomic DNA per individual using the Agilent SureSelect Human All Exon V5 (trios S1 and S2) and Clinical Research Exome V1 (trio S3) kits. Libraries were sequenced on a HiSeq 2000 platform (Illumina) using paired-end 75-base pair reads. Sequences were aligned to the human genome reference sequence (GRCh37/hg19 build of the University of California Santa Cruz Genome Browser); single-nucleotide variants and small insertions/deletions were systematically detected as described previously²¹. Candidate de novo mutational events were identified by focusing on protein-altering and splice site changes: (1) supported by at least three reads and 10% of total reads in the proband; (2) absent in both parents, as defined by variant reads representing <5% of the total reads; (3) at base pair positions covered by at least four reads in the entire trio; and (4) present at a frequency <1% in the SNP database build 147 and 0.1% in the Exome Aggregation Consortium (<http://exac.broadinstitute.org/>)¹¹. Candidate low-level postzygotic changes of *RHOA* in participant S2 were detected as described previously²². Briefly, all coding and splice site bases of *RHOA* were systematically analyzed to count all sites with at least one read not matching the reference sequence, using a base quality threshold of 30.

Ultra-deep sequencing of *RHOA*. Coding exons of *RHOA* (reference accession no. NM_001664.2) were amplified using custom intronic primers (Supplementary Table 4) and standard PCR with the PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara Bio). PCR products were purified and libraries were prepared using the transposase-based Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (Illumina). Libraries were sequenced on a MiSeq instrument using 300-cycle MiSeq Reagent Kit v.2 (Illumina) and paired-end sequencing reactions of 150-base pair reads. Ultra-deep sequencing was performed to achieve a sequencing depth of at least 1,000 reads for all targeted coding bases and splice junctions (Supplementary Table 5). As described previously²², we identified candidate single-nucleotide variants and small insertions/deletions by recording all sites of *RHOA* coding exons and splice junctions with at least 4 reads not matching the reference sequence, using a base quality threshold of 30 and a mapping quality threshold of 20, with a mutant allele fraction of at least 0.01. We annotated variants with SeattleSeq Annotation 138 server (<http://snp.gs.washington.edu/SeattleSeqAnnotation138/>) and focused on protein-altering and splice site changes present at a frequency <0.1% in the Exome Aggregation Consortium¹¹.

In silico prediction. Nucleotide-level conservation and the impact of amino acid change of *RHOA* mutations were assessed with the genomic evolutionary rate profiling²³ and combined annotation-dependent depletion scores²⁴, respectively (Supplementary Table 7).

Cell culture and transfection. NIH/3T3 cells were obtained from ATCC (CRL-1658TM) and maintained in DMEM (Thermo Fisher Scientific) plus 10% FCS. Sixty percent confluent cultures were transfected using the Xfect transfection reagent (Clontech) according to the manufacturer's protocol and cultured for 48 h before lysis or fixation.

FLAG-tagged DNA constructs and mutagenesis. DNA constructs for mammalian expression, including FLAG-tagged wild-type, p.(Gly14Val) and p.(Thr19Asn) mutant *RHOA*, were obtained from the Missouri S&T cDNA Resource Center (www.cdna.org). Mutations encoding p.(Glu47Lys) and p.(Pro7Ser) were introduced into the wild-type *RHOA* sequence using the QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies), according to the manufacturer's

protocol along with the primers described in Supplementary Table 10. The wild-type or mutant *RHOA* ORFs were then moved to the pCMV-Tag2B mammalian expression vector (Stratagene) using standard cloning procedures to create proteins with FLAG tag at the N terminus.

Immunocytochemistry. NIH/3T3 cells were fixed with 0.25% glutaraldehyde and permeabilized with 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich). Mouse anti- α -tubulin (1:5,000; catalog no. T6074; Sigma-Aldrich) and goat anti-FLAG (1:500; catalog no. A190-101A; Bethyl Laboratories) antibodies were incubated overnight at 4 °C. Appropriate secondary Alexa Fluor-conjugated antibodies (catalog no. A11055, A100042 and 141571, 1:1,000; Thermo Fisher Scientific) along with Alexa Fluor 488-conjugated phalloidin to visualize F-actin (1:100; catalog no. A12379; Thermo Fisher Scientific) were applied for 1 h at room temperature. Coverslips were mounted in ProLong Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific) and visualized with a 100 \times oil immersion objective on an inverted microscope (Zeiss) fitted with a spinning disc confocal scanner (PerkinElmer). Imaging analysis was performed using the ImageJ (National Institutes of Health) software v.1.49 as follows: confocal stacks were projected onto a single plane (maximum intensity Z-project); images were thresholded; and fluorescence intensity was measured as a mean gray value. The investigator collecting the images was blinded to the experimental groups. During analysis of the immunocytochemistry data, the investigator was blinded to the identity of the experimental groups.

Immunoblotting. NIH/3T3 cells were rinsed once with PBS and lysed in M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific) supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). The protein concentrations of the lysates cleared of insoluble cell debris were determined using the Pierce 660 nm Protein Assay Reagent (Thermo Fisher Scientific). A total of 15 µg of protein in lithium dodecyl sulfate electrophoresis loading buffer (Thermo Fisher Scientific) was denatured for 10 min at 70 °C and separated on 4–12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis gel (Thermo Fisher Scientific). Proteins were transferred onto a 0.2-µm nitrocellulose membrane (Pall) and processed for immunoblotting. Primary antibodies were used at the following dilutions: goat anti-actin (1:4,000; catalog no. sc-1616; Santa Cruz Biotechnology); mouse anti-MYPT1 (1:4,000; catalog no. 612165; BD Biosciences); rabbit anti-pMYPT1(Thr696) (1:500; catalog no. ABS45; Merck Millipore); rabbit anti-RhoA (1:4,000; catalog no. 67B9; Cell Signaling Technology); rabbit anti-MLC2 (1:4,000; catalog no. 8505, Cell Signaling Technology); and mouse anti-pMLC2 (Thr18/Ser19) (1:500; catalog no. 3674; Cell Signaling Technology). Appropriate secondary IRDye-conjugated antibodies (LI-COR) were used at 1:10,000 dilutions. Proteins were detected using the Odyssey Imaging System v.4.0.21 (LI-COR). The investigator carrying out the immunoblot experiments was not blinded to the identity of the samples.

Myc-tagged DNA constructs and mutagenesis. DNA constructs of myc-tagged wild-type, p.(Gly14Val) and p.(Thr19Asn) *RHOA* for mammalian expression were obtained from the Missouri S&T cDNA Resource Center. The c.139G>A mutation (encoding p.(Glu47Lys)) was introduced into the wild-type *RHOA* sequence using the QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit according to the manufacturer's protocol; the primers are listed in Supplementary Table 10. Other steps were performed as described earlier, with anti-myc antibodies instead of anti-FLAG (1:500; Bethyl Laboratories).

Statistics. For fluorescence intensity quantification, a *t*-test assuming unequal variance was performed; $P < 0.05$ was deemed significant. For immunoblotting, four independent experiments for each transfection were performed; the average and s.d. reflect these replicates.

Reporting Summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

The data that support the findings of this study are available from the corresponding authors upon reasonable request.

References

- Thevenon, J. et al. *Clin. Genet.* **89**, 700–707 (2016).
- Rivière, J.-B. et al. *Nat. Genet.* **44**, 934–940 (2012).
- Cooper, G. M. et al. *Nat. Methods* **7**, 250–251 (2010).
- Kircher, M. et al. *Nat. Genet.* **46**, 310–315 (2014).

Reporting Summary

Nature Research wishes to improve the reproducibility of the work that we publish. This form provides structure for consistency and transparency in reporting. For further information on Nature Research policies, see [Authors & Referees](#) and the [Editorial Policy Checklist](#).

Statistics

For all statistical analyses, confirm that the following items are present in the figure legend, table legend, main text, or Methods section.

n/a Confirmed

- The exact sample size (n) for each experimental group/condition, given as a discrete number and unit of measurement
- A statement on whether measurements were taken from distinct samples or whether the same sample was measured repeatedly
- The statistical test(s) used AND whether they are one- or two-sided
Only common tests should be described solely by name; describe more complex techniques in the Methods section.
- A description of all covariates tested
- A description of any assumptions or corrections, such as tests of normality and adjustment for multiple comparisons
- A full description of the statistical parameters including central tendency (e.g. means) or other basic estimates (e.g. regression coefficient) AND variation (e.g. standard deviation) or associated estimates of uncertainty (e.g. confidence intervals)
- For null hypothesis testing, the test statistic (e.g. F , t , r) with confidence intervals, effect sizes, degrees of freedom and P value noted
Give P values as exact values whenever suitable.
- For Bayesian analysis, information on the choice of priors and Markov chain Monte Carlo settings
- For hierarchical and complex designs, identification of the appropriate level for tests and full reporting of outcomes
- Estimates of effect sizes (e.g. Cohen's d , Pearson's r), indicating how they were calculated

Our web collection on [statistics for biologists](#) contains articles on many of the points above.

Software and code

Policy information about [availability of computer code](#)

Data collection

See « Data analysis » (next section)

Data analysis

For exome sequencing and targeted sequencing, reads were aligned to the human genome reference sequence (GRCh37/hg19 build of UCSC Genome Browser) with the Burrows-Wheeler Aligner (BWA, v.0.6.2), and potential duplicate paired-end reads were marked with Picard v.1.77. The Genome Analysis Toolkit (GATK) v.2.6-4 was used for base quality score recalibration, indel realignment, and variant discovery. Variants were annotated with SeattleSeq SNP Annotation v138. Variants were systematically visualized on the Integrative Genomic Viewer v2.3. Imaging analysis was performed using ImageJ software v1.49. For WB, proteins were detected using Odyssey Image Studio v4.0.21 (LI-COR).

For manuscripts utilizing custom algorithms or software that are central to the research but not yet described in published literature, software must be made available to editors/reviewers. We strongly encourage code deposition in a community repository (e.g. GitHub). See the Nature Research [guidelines for submitting code & software](#) for further information.

Data

Policy information about [availability of data](#)

All manuscripts must include a [data availability statement](#). This statement should provide the following information, where applicable:

- Accession codes, unique identifiers, or web links for publicly available datasets
- A list of figures that have associated raw data
- A description of any restrictions on data availability

The manuscript includes the sentence "The data that support the findings of this study are available from the corresponding authors upon reasonable request." in the "Data availability" section

Field-specific reporting

Please select the one below that is the best fit for your research. If you are not sure, read the appropriate sections before making your selection.

Life sciences Behavioural & social sciences Ecological, evolutionary & environmental sciences

For a reference copy of the document with all sections, see [nature.com/documents/nr-reporting-summary-flat.pdf](https://www.nature.com/documents/nr-reporting-summary-flat.pdf)

Life sciences study design

All studies must disclose on these points even when the disclosure is negative.

Sample size	Seven patients with similar phenotypical features were included. Sample size could not be predetermined as it was conditioned by the number of human research participants / patients diagnosed with RHOA mutation participating in our study (7). These patients were enrolled in the M.U.S.T.A.R.D. cohort, registered in clinicaltrials.gov under the ref NCT01950975. At the time of this study, 31 patients with hypomelanosis of Ito were included in the cohorts, as described in Supp. Table 8. Only one skin biopsy was taken for each patient, in accordance to ethical limitation. Five transfected cell lines were generated and studied using IF and Western blot. Regarding IF, 20 cells in each group were selected at random across the cover slip and were individually examined. For Western Blot, four independent experiments for each transfection was performed, and average and standard deviation reflect these replicates.
Data exclusions	No data was excluded
Replication	To verify the reproducibility of the findings, we confirmed key findings of our study using several different and independent methodological approaches. After identification of the candidate gene with exome sequencing, we used targeted sequencing of this gene to study patients with similar phenotype, as well as patient with cutaneous pigmentary disorder with a different phenotype. All patients with similar phenotype carried a RHOA mutation except for one patient whose DNA was not analyzable due to failed quality control, whereas no RHOA variant was detected in patients with a different phenotype. We also used several independent experiments to evaluate the functional consequences of the mutations (Immunocytochemistry studies of the cytoskeletal organization and morphology in NIH/3T3 cells and quantification of MYPT1(pThr696); levels of two phosphorylated downstream effectors of RhoA by Western Blot), which showed concordant results. For Western Blot, four independent experiments for each transfection was performed. All attempts of replication were successful.
Randomization	Patients with mosaic pigmentary disorders involving the skin were allocated to this study by genotype (presence of a RHOA mutation). Due to the very limited number of patients with this condition, randomization was not possible.
Blinding	The investigator collecting images was blinded to the experimental groups. During analysis of immunocytochemistry data, the investigator was blinded to the identity of the experimental groups. The investigator carrying out the Western blot experiments was not blinded to the identity of the samples. Our use of the LI-COR Odyssey, fluorescent Western blot avoids two major issues with researcher bias. First, our protocol avoids selection bias or cherry picking of data points to be included in the analysis since in this report, all data points are included. Second, the fluorescence measurement using this Odyssey system is highly standardized. Measurement is done by the software without operator manipulation, which guarantee repeatability, that is, any other operator measuring the image using the same software will get the same numbers.

Reporting for specific materials, systems and methods

We require information from authors about some types of materials, experimental systems and methods used in many studies. Here, indicate whether each material, system or method listed is relevant to your study. If you are not sure if a list item applies to your research, read the appropriate section before selecting a response.

Materials & experimental systems

n/a	Involved in the study
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Antibodies
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Eukaryotic cell lines
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Palaeontology
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Animals and other organisms
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Human research participants
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Clinical data

Methods

n/a	Involved in the study
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> ChIP-seq
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Flow cytometry
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> MRI-based neuroimaging

Antibodies

Antibodies used

Immunocytochemistry: Mouse anti- α -tubulin (Sigma T9026, 1:5,000), goat anti-FLAG (A190-101A, Bethyl Laboratories, 1:500), AlexaFluor-conjugated antibodies (Life Technologies, 1:1,000), AlexaFluor-conjugated phalloidin to visualize F-actin (A12379, Life Technologies, 1:100), anti-Myc antibodies (Bethyl Laboratories, 1:500). Secondary antibodies: Donkey anti-Goat IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 Cat # A11055, Thermo Fisher Scientific, 1:1,000; Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568 Cat # A10042, Thermo Fisher Scientific, 1:1,000; Donkey anti-Mouse

Validation

IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 647 Cat # A31571, Thermo Fisher Scientific, 1:1,000.
 Western Blot: goat anti-actin (sc-1616, Santa-Cruz Biotechnology, 1:4,000), mouse anti-MYPT1 (612165, Becton-Dickinson, 1:4,000), rabbit anti-MYPT1(pT696) (ABS45, Millipore, 1:500), rabbit anti-RhoA (67B9, Cell Signaling, 1:4,000), rabbit anti-MLC2 (8505, Cell Signaling, 1:4,000), mouse anti-MLC2(pT19) (3674, Cell Signaling, 1:500). Secondary IRDye-conjugated antibodies: Donkey anti-mouse IRDye® 800CW LI-COR 926-32212 + donkey anti-rabbit IRDye® 680RD LI-COR 926-68073, both at 1:10,000.

Mouse anti- α -tubulin (Sigma T9026, 1:5,000), as per manufacturer validated for use in ICC and WB, validated for use in mouse, cited 2035 times <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t9026?lang=en®ion=US>

Rabbit anti-MYPT1(pT696) (ABS45, Millipore, 1:500), as per manufacturer validated for use in WB, validated for use in mouse, cited 16 times
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/abs45?lang=en®ion=US>

Goat anti-FLAG (A190-101A, Bethyl Laboratories, 1:500), as per manufacturer validated for use in WB and ICC, species specificity N/A, cited 15 times
<https://www.bethyl.com/product/A190-101A?referrer=search>

Goat anti-Myc (A190-104A, Bethyl Laboratories, 1:500), as per manufacturer validated for use in WB, species specificity N/A, cited 12 times
<https://www.bethyl.com/product/A190-104A?referrer=search#>

Goat anti-actin (sc-1616, Santa-Cruz Biotechnology, 1:4,000), as per manufacturer validated for use in WB and ICC, validated for use in mouse, cited 1700 times
<https://www.scbt.com/scbt/product/actin-antibody-i-19?requestFrom=search>

Mouse anti-MYPT1 (612165, Becton-Dickinson, 1:4,000), as per manufacturer validated for use in WB, validated for use in mouse,
<https://www.bdbiosciences.com/us/reagents/research/antibodies-buffers/cell-biology-reagents/cell-biology-antibodies/purified-mouse-anti-mypt1-20mypt1/p/612165>
 cited 8 times <https://www.citeab.com/antibodies/2411798-612165-purified-mouse-anti-mypt1?des=C6DA95FBD9320B2F>

Rabbit anti-RhoA (2117, Cell Signaling, 1:4,000), as per manufacturer validated for use in WB, validated for use in mouse, cited 122 times
<https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/rhoa-67b9-rabbit-mab/2117>

Rabbit anti-MLC2 (8505, Cell Signaling, 1:4,000), as per manufacturer validated for use in WB, validated for use in mouse, cited 28 times
<https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/myosin-light-chain-2-d18e2-rabbit-mab/8505>

Mouse anti-MLC2(pT19) (3675, Cell Signaling, 1:500), as per manufacturer validated for use in WB and ICC, validated for use in mouse, cited 130 times
<https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/phospho-myosin-light-chain-2-ser19-mouse-mab/3675>

Eukaryotic cell lines

Policy information about [cell lines](#)

Cell line source(s)	NIH/3T3 cells, obtained from ATCC, cat. # ATCC® CRL-1658™
Authentication	ATCC cell lines authentication process can be found here: https://www.atcc.org/Global/FAQs/E/A/Authenticating%20cell%20lines-249.aspx
Mycoplasma contamination	Mycoplasma free as per manufacturer's specification. Cells have been cultured in antibiotic free media to monitor for sterile technique
Commonly misidentified lines (See ICLAC register)	NIH/3T3 line is not in the latest database of commonly misidentified cell lines https://iclac.org/databases/cross-contaminations/

Human research participants

Policy information about [studies involving human research participants](#)

Population characteristics	Seven patients with similar phenotypical features were included.
Recruitment	Patients described in this study were addressed to the MAGEC reference center in Dijon to be analysed as part of the M.U.S.T.A.R.D. cohort (registered in clinicaltrials.gov under the ref NCT01950975), created in order to elucidate the genetic basis of mosaic disorders involving the skin. As it is a cohort at European scale, we postulate that it represents the diversity of patients carrying mosaic cutaneous disorder. All patients in this cohort with hypomelanosis of Ito were studied, without exclusion. Despite the apparently recurrent phenotype associated with RHOA mutation, we cannot exclude that these mutations may also cause a phenotype without cutaneous involvement (depending on the tissular distribution of the mosaic). In this case, we can expect that the phenotypic spectrum associated with RHOA mutations will broaden with further studies.

Ethics oversight

We obtained written informed consent from all subjects or their legal representatives, and the ethics committee of Dijon University Hospital approved the study.

Note that full information on the approval of the study protocol must also be provided in the manuscript.

In the format provided by the authors and unedited.

Postzygotic inactivating mutations of *RHOA* cause a mosaic neuroectodermal syndrome

Pierre Vabres ^{1,2,3,24*}, Arthur Sorlin ^{1,2,3,4,24}, Stanislav S. Kholmanskikh^{5,24},
Bénédicte Demeer⁶, Judith St-Onge^{1,2,7}, Yannis Duffourd^{1,2}, Paul Kuentz ^{1,2,8},
Jean-Benoît Courcet^{1,2,4}, Virginie Carmignac^{2,3}, Philippine Garret ^{1,2}, Didier Bessis⁹, Odile Boute¹⁰,
Alain Bron ¹¹, Guillaume Captier¹², Esther Carmi¹³, Bernard Devauchelle¹⁴, David Geneviève¹⁵,
Catherine Gondry-Jouet¹⁶, Laurent Guibaud¹⁷, Arnaud Lafon¹⁸, Michèle Mathieu-Dramard⁶,
Julien Thevenon^{1,2,4}, William B. Dobyns¹⁹, Geneviève Bernard^{7,20,21}, Satyamaanasa Polubothu²²,
Francesca Faravelli²², Veronica A. Kinsler²², Christel Thauvin^{1,2,4}, Laurence Faivre^{1,2,4,25},
M. Elizabeth Ross ^{5,25} and Jean-Baptiste Rivière ^{1,2,7,23,25*}

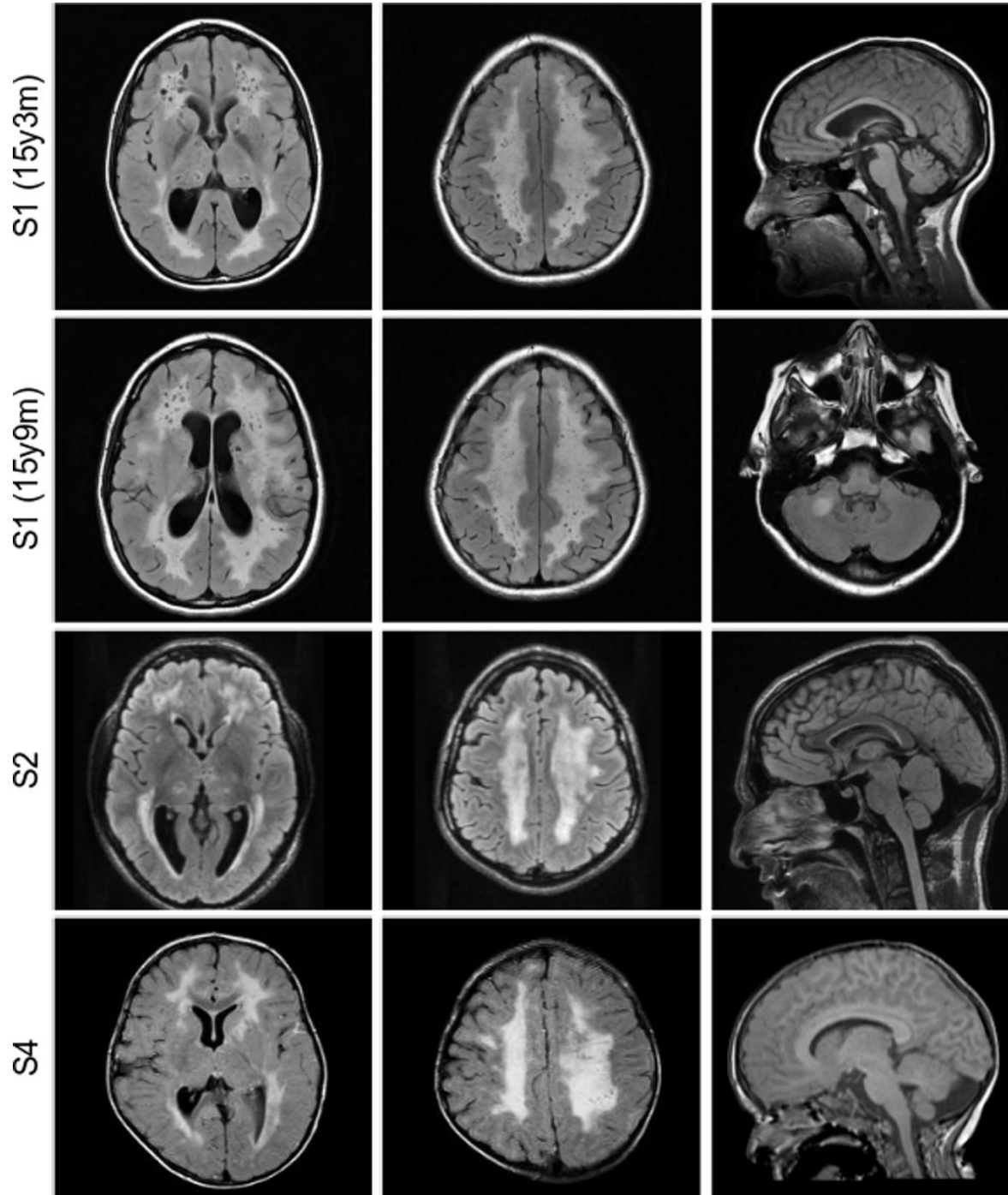
¹Fédération Hospitalo-Universitaire Médecine Translationnelle et Anomalies du Développement, Centre Hospitalier Universitaire Dijon Bourgogne, Dijon, France. ²UMR Inserm 1231 Génétique des Anomalies du Développement, Université Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France. ³Centre de Référence MAGEC, Service de Dermatologie, Centre Hospitalier Universitaire Dijon Bourgogne, Dijon, France. ⁴Service de Pédiatrie 1 et de Génétique Médicale, Centre Hospitalier Universitaire Dijon Bourgogne, Dijon, France. ⁵Center for Neurogenetics, Feil Family Brain and Mind Research Institute, Weill Cornell Medicine, New York, NY, USA. ⁶Unité de Génétique Médicale et Oncogénétique, Centre Hospitalier Universitaire Amiens Picardie, Amiens, France. ⁷Child Health and Human Development Program, Research Institute of the McGill University Health Centre, Montreal, Quebec, Canada. ⁸Génétique Biologique Histologie, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Besançon, Besançon, France. ⁹Département de Dermatologie, Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Montpellier, France. ¹⁰Service de Génétique Clinique, Centre Hospitalier Universitaire Lille, Lille, France. ¹¹Service d'Ophtalmologie, Centre Hospitalier Universitaire Dijon Bourgogne, Dijon, France. ¹²Service de Chirurgie Orthopédique et plastique Pédiatrique, Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Montpellier, France. ¹³Dermatology Office, Amiens, France. ¹⁴Département de Chirurgie Maxillo-Faciale et Stomatologie, Centre Hospitalier Universitaire Amiens Picardie, Amiens, France. ¹⁵Département de Génétique Médicale, Maladies rares et Médecine Personnalisée, Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Montpellier, France. ¹⁶Département de Radiologie, Centre Hospitalier Universitaire Amiens Picardie, Amiens, France. ¹⁷Service d'Imagerie Pédiatrique et Fœtale, Hôpital Femme-Mère-Enfant Louis Pradel, Hospices Civils de Lyon, Bron, France. ¹⁸Service d'Odontologie-Stomatologie, Centre Hospitalier Universitaire Dijon Bourgogne, Dijon, France. ¹⁹Center for Integrative Brain Research, Seattle Children's Research Institute, Seattle, WA, USA. ²⁰Departments of Neurology and Neurosurgery, and Pediatrics McGill University, Montreal, Quebec, Canada. ²¹Department of Medical Genetics, Montreal Children's Hospital, McGill University Health Centre, Montreal, Quebec, Canada. ²²Institute of Child Health, University College London, London, UK. ²³Department of Human Genetics, Faculty of Medicine, McGill University, Montreal, Quebec, Canada. ²⁴These authors contributed equally: Pierre Vabres, Arthur Sorlin, Stanislav S. Kholmanskikh. ²⁵These authors jointly supervised this work: Laurence Faivre, M. Elizabeth Ross, Jean-Baptiste Rivière. *e-mail: pierre.vabres@chu-dijon.fr; jean-baptiste.riviere@mcgill.ca



Supplementary Figure 1

Main clinical features of affected individuals.

a, Craniofacial appearance of affected individuals showing hemifacial microsomia in all subjects. **b**, Patchy alopecia of hair and beard. **c**, Teeth anomalies consisting of oligodontia, microdontia, and conical teeth. **d**, Variable degrees of acral anomalies including symmetric or asymmetric brachydactyly, syndactyly, and polydactyly. Photograph of subject S3 was taken after surgery. **e**, Linear hypopigmentation following Blaschko's lines on trunk, limbs, and face. See **Supplementary Table 1** for additional details. We obtained written consent to publish photographs of these individuals.

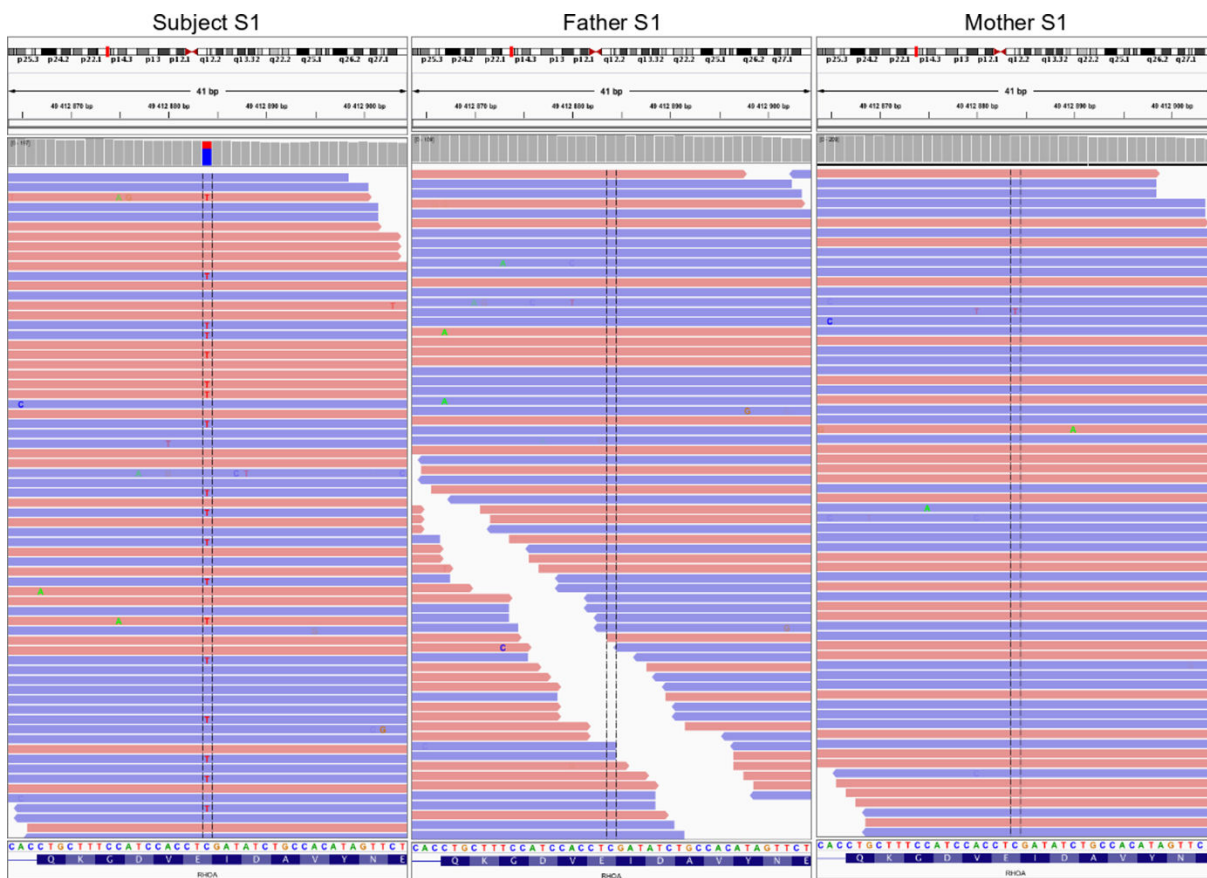


Supplementary Figure 2

Brain magnetic resonance imaging (MRI) for subjects S1, S2 and S4.

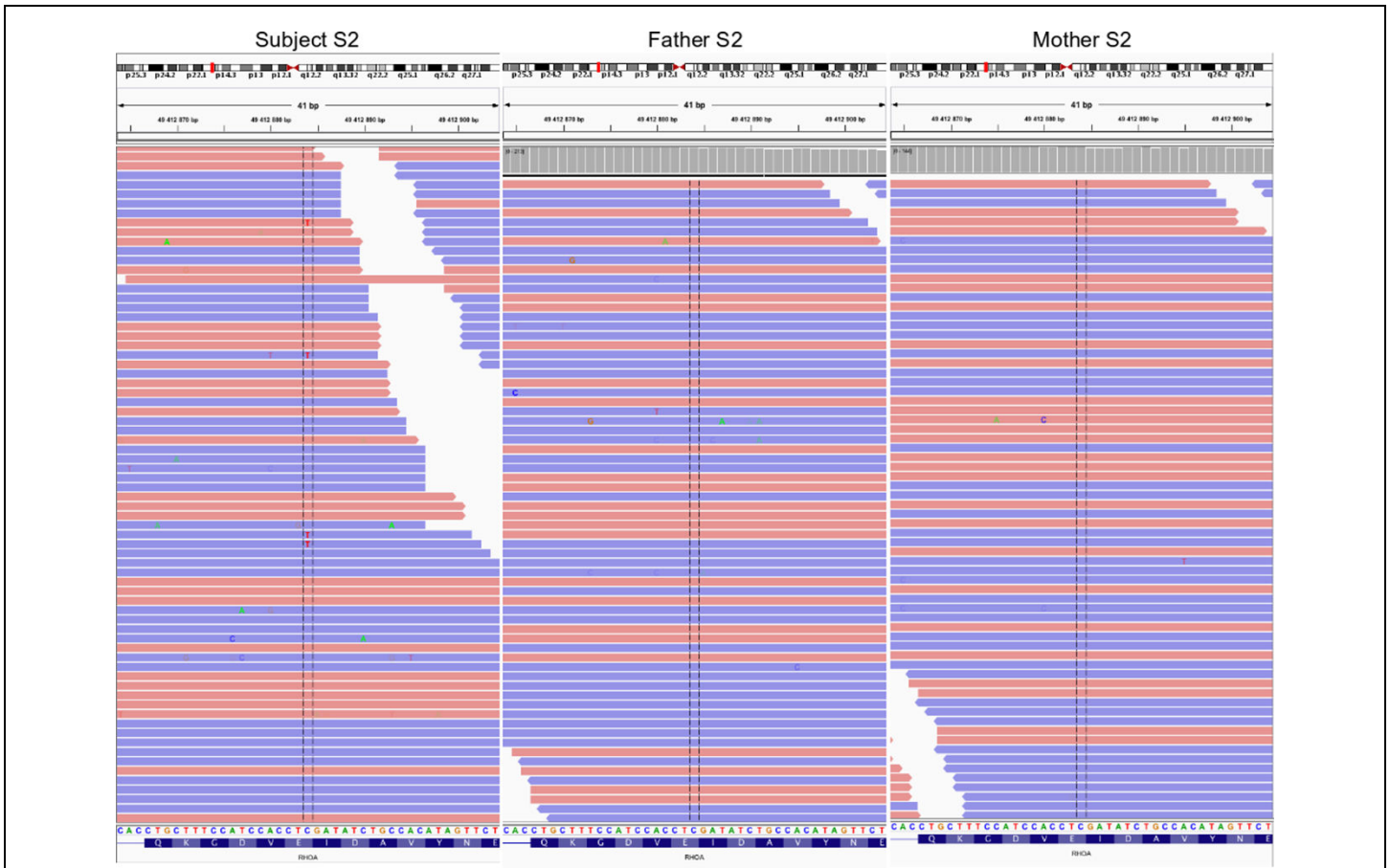
Brain magnetic resonance imaging (MRI) for subjects S1 (at 15 years and 3 months (first row) and six months later (second row)), S2 (third row), and S4 (fourth row). MRI revealed bilateral and symmetrical marked and diffuse hyperintensities on FLAIR images, with sparing of the subcortical white matter/U-fibers. White matter signal abnormalities extend to the anterior limb of the internal capsule, with sparing of the posterior limb of the capsule, associated with either cystic formation (S1) or relative dilatation of the Virchow-Robin spaces (S1, S2, and S4). Note that the corpus callosum is

spared. No significant anomalies of thalami and infratentorial cerebellar matter were noted in patients S2 and S4. A posterior fossa cyst is observed in 2 out of 3 patients (S2 and S4), with minimal mass effect on the cerebellum. One focal lesion of the cerebellar white matter was noticed in S1, with a hyperintensity on T2 weighted images. Lesions were stable on the 6-months follow-up MRI for subject S1. It is of interest to note that a leukoencephalopathy with enlarged Virchow-Robin spaces has been described in patients with mutations of *PTEN* (Vanderver, A. *et al. Am. J. Med. Genet. A.* **164A**, 627–633 (2014)), a gene that encodes an inhibitor of the PI3K-AKT-mTOR signaling pathway and is known to be regulated by *RHOA* (Li, Z. *et al. Nat. Cell Biol.* **7**, 399–404 (2005)).



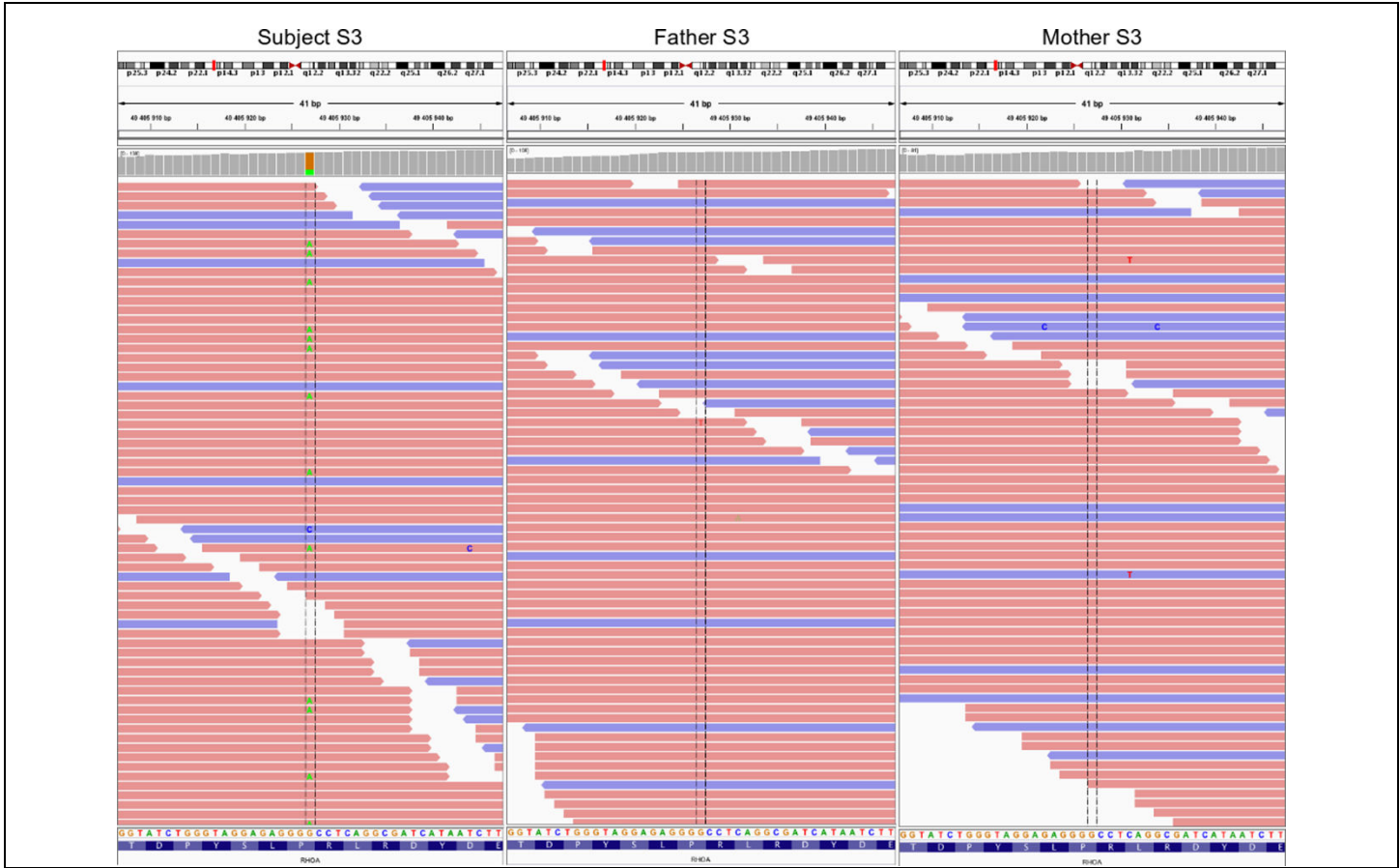
Supplementary Figure 3

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



Supplementary Figure 4

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



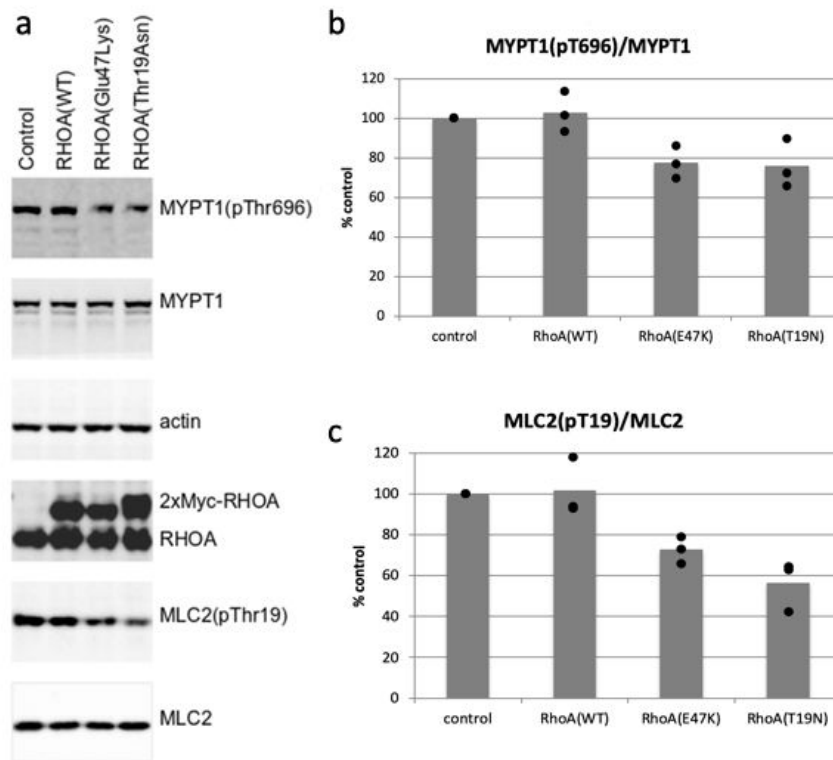
Supplementary Figure 5

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



Supplementary Figure 6

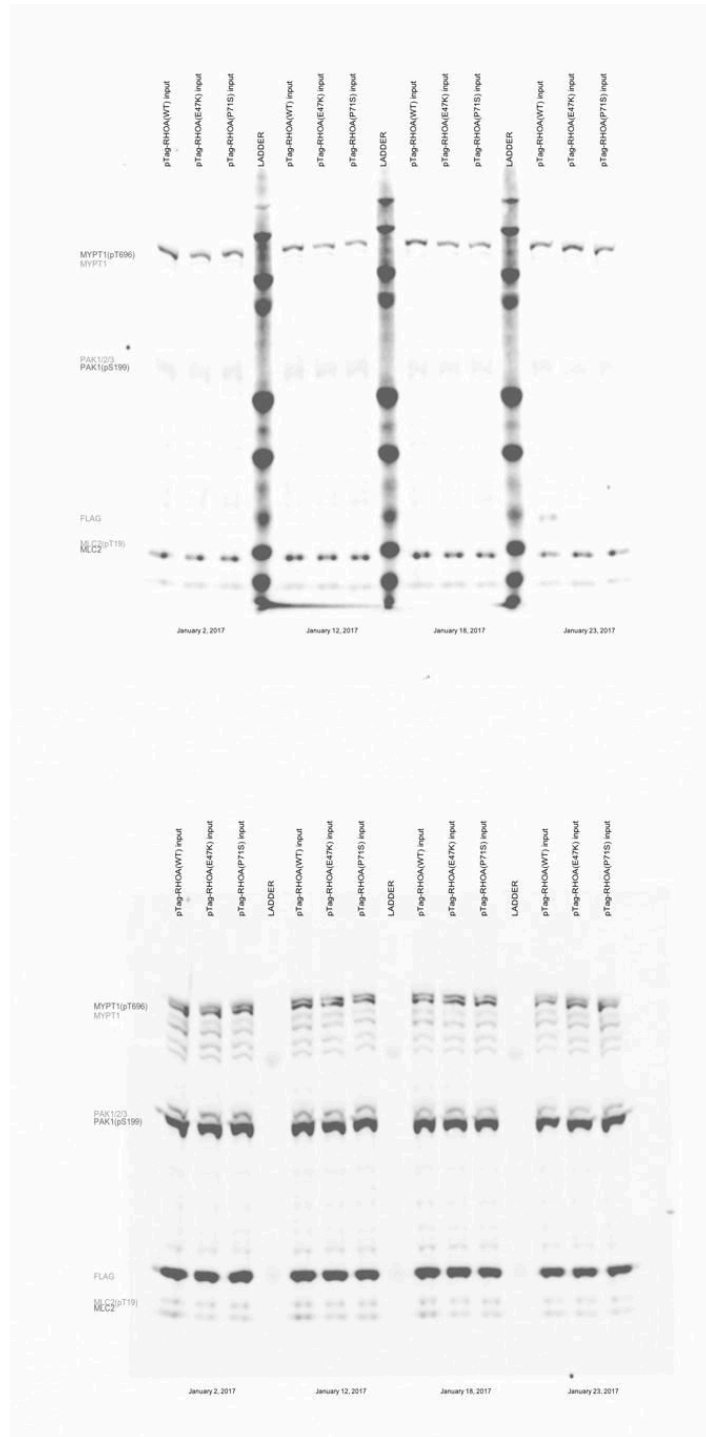
IGV screenshots of the NC_012920.1:m.11778G>A, MT-ND4 c.1019G>A, p.(R340H) substitution in S2 (left) and his mother (right).



Supplementary Figure 7

Expression levels of overexpressed wild-type or mutant myc-tagged RhoA, and endogenous RhoA, total MYPT1, phospho-MYPT1 (pThr696), total MLC2, actin, and phospho-MLC2 (pThr19).

a, Representative Western blots show similar protein loading (endogenous total MYPT1, actin, endogenous RhoA, and total MLC2) and similar overexpression of myc-tagged wild-type and mutant RhoA (three independent experiments). There is a visible reduction in phosphorylated MYPT1(pThr696) and MLC2(pThr19) when RhoA(Thr19Asn) or RhoA(Glu47Lys) are overexpressed. **b,c**, Levels of phosphorylated MYPT1(pThr696) and MLC2(pThr19) in endogenous and transfected NIH/3T3 cells. Cumulative data of average density values (overlaid with dots from the three independent experiments) for phosphorylated MLC2(pThr19) (**b**) and MYPT1(pThr696) (**c**) normalized to total MLC2 and MYPT1, respectively, indicate reduction in MLC2(pThr19) and MYPT1(pThr696) upon RhoA(Thr19Asn) or RhoA(Glu47Lys) overexpression.



Supplementary Figure 8

Full scans of blot used in Figure 2.

SUPPLEMENTARY TABLES

- p.2 **Supplementary Table 1.** Detailed clinical features of the six affected individuals.
- p.4 **Supplementary Table 2.** Metrics of trio-based whole-exome sequencing (WES) experiments.
- p.5 **Supplementary Table 3.** De novo candidates after ES in 3 subjects
- p.8 **Supplementary Table 4.** Amplicons used for *RHOA* ultra-deep sequencing.
- p.9 **Supplementary Table 5.** Summary of *RHOA* ultra-deep sequencing.
- p.10 **Supplementary Table 6.** Mutant allele fraction of the two *RHOA* mutations in all tested samples.
- p.11 **Supplementary Table 7.** *RHOA* mutations, frequency in public variant databases, and *in silico* predictions.
- p.12 **Supplementary Table 8.** Phenotype of patients with hypomelanosis of Ito in the M.U.S.T.A.R.D. cohort.
- p.15 **Supplementary Table 9.** Summary of the most frequent somatic mutations of *RHOA* reported in cancer.
- p.16 **Supplementary Table 10. Primers used for mutagenesis.**
- p.17 **SUPPLEMENTARY REFERENCES**

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

	Subject 1	Subject 2	Subject 3	Subject 4	Subject 5	Subject 6	Subject 7
RHOA change	c.139G>A p.(Glu47Lys)	c.139G>A p.(Glu47Lys)	c. 211C>T p.(Pro71Ser)	c.139G>A p.(Glu47Lys)	c.139G>A p.(Glu47Lys)	No mutation found (DNA not analyzable due to failed quality control)	c.139G>A p.(Glu47Lys)
Sex	Female	Male	Female	Female	Female	Female	Female
Age (age at last visit)	18 years (15 years)	28 years (25 years)	14 years (10 years)	6 years (3 years)	16 years (15 years)	9 years (10 years)	2 years (2 years)
Skin anomalies	Linear hypopigmentation Patchy scalp hair scarring alopecia.	Linear hypopigmentation on neck and upper and lower limbs with pilar dysplasia. Patchy scalp hair scarring alopecia.	Linear hypopigmentation on neck and upper and lower limbs with pilar dysplasia.	Linear hypopigmentation on upper and lower limbs.	Linear hypopigmentation on upper and lower limbs Patchy scalp hair scarring alopecia (right occiput and left frontoparietal regions)	Linear hypopigmentation on limbs	Linear hypopigmentation on upper and lower limbs Alopecia not reported
Facial dysmorphism	Facial asymmetry. Marked malar hypoplasia with retrognathic maxilla and malocclusion. Broad nasal bridge with thick alae nasi.	Facial asymmetry with left malar hypoplasia. Broad nasal bridge with thick alae nasi. Short philtrum.	Facial asymmetry with malar hypoplasia, microtia, and narrower palpebral fissure on the left side. Thick alae nasi. Cleft lip.	Facial asymmetry with left microsomia, left deviation of the maxilla and the mandible, and soft tissue atrophy.	Right malar hypoplasia and moderate right hemifacial microsomia.	Left hemifacial microsomia	Right malar hypoplasia Moderate right hemifacial microsomia, broad nasal bridge
Acral anomalies	Asymmetrical III, IV, V toes.	Bilateral brachydactyly. Bilateral short II, III, IV, and V toes Broad first toes.	Left foot postaxial polydactyly. Left III-IV syndactyly	Brachydactyly of the right third toe	Bilateral clinodactyly of second toes.	Bilateral brachydactyly of third toes.	Bilateral clinodactyly, brachydactyly, broad toes, sandal gap.
Teeth anomalies	Conical teeth, oligodontia and microdontia of deciduous and permanent teeth. Persistent decidual dentition. Linear enamel dysplasia.	Conical teeth, oligodontia and microdontia of deciduous and permanent teeth.	Agenesis of twelve tooth: two on the right, six on the left, and the four third molars.	Infraocclusion and conical teeth.	Multiple right dental agenesis	Multiple dental agenesis and bilateral microdontia.	Premature eruption of right teeth
Ocular anomalies	Right peripapillary chorioretinal atrophy, high-degree myopia, and strabismus.	Bilateral congenital nystagmus, myopia, astigmatism, asymmetric posterior capsular cataract. Right eye visual acuity: 20/100; Left: hand motion. Normal cornea, corectopia, bilateral pale fundus with diffuse retinal atrophy, papillary dysversion.	Strabismus. No microphthalmia on CT-scan.	Left microphthalmia Atrophy of the left optical nerve (visual evoked potentials) and oculomotor dyssynergia.	Normal examination (visual acuity, visual evoked potentials, fundus ophthalmoscopy, and slit lamp examination).	Myopia. Normal ophthalmoscopy.	Right congenital cataracts Right congenital glaucoma Bilateral retinal dystrophy Myopia
Brain anomalies	Non-progressive cystic leukoencephalopathy.	Leukoencephalopathy. Posterior fossa arachnoid cyst.	No brain MRI available. Enlarged lateral ventricle with no calcifications on CT-scan	Leukoencephalopathy with enlarged perivascular spaces. Posterior fossa arachnoid	Bilateral white matter anomalies predominating in the right hemisphere CT-scan: no calcifications	No MRI available	Normal MRI and CT at 6 weeks

				cyst vs. mega cisterna magna. Small calcifications in the basal ganglia, especially putamen, on CT-scan.			
Other features	NR	Asymmetrical hearing loss (left: 70% loss; right: normal), consecutive to an abnormal cochlear development.	Scoliosis, inequality of the lower limbs Bilateral vesicoureteral reflux	NR	Sigmoid and rectal atresia	NR	Bilateral hearing loss Inequality of the lower limbs: right leg > Left leg by 3 cm
Intelligence	Normal development and intellect.	Normal development and intellect.	Normal development and intellect.	Normal development and intellect.	Normal development and intellect.	Normal development and intellect.	Normal development and intellect.

Abbreviations: CT-scan: Computerized tomography scan; MRI: Magnetic resonance imaging.

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

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

^aIn gigabases. ^bBased on RefSeq coding exons and splice junctions. Depth-of-coverage metrics were calculated with the Genome Analysis Toolkit (GATK)¹ DepthofCoverage tool using reads with mapping quality \geq 20 and bases with base quality \geq 30. ^cCultured skin fibroblasts.

Supplementary Table 3. De novo candidates after WES in 3 subjects.

Individual	Gene	gene accessions	gDNA change (hg19)	cDNA change	Amino acid change	Allelic Balance	ExAC (Allele count - Allele frequency)	gnomAD (Allele count - Allele frequency)	OMIM
S1	<i>RHOA</i>	NM_001664.2	chr3:g.49412884C>T	c.139G>A	p.(Glu47Lys)	AD=140,44;AB=0.31	none	none	non OMIM
	<i>ANKRD36</i>	NM_001164315.	chr2:g.97827852C>T	c.1406C>T	p.(Pro469Leu)	AD=43,6;AB=0.12	263 - 0.01526	743 - 0.005736	non OMIM
	<i>MDC1</i>	NM_014641.2	chr6:g.30681077_30681081delGAAGG	c.638_642delCC TTC	p.(Ala213Glufs*5)	AD=26,10;AB=0.28	207 - 0.00182	560 - 0.002110	non OMIM
			chr6:g.30681083_30681101delAAAAGGCGGCC CAAGGCCG	c.618_636delCG GCCTTGGGCC GCCTTTT	p.(Gly207Profs*4)	AD=24,9;AB=0.27	206 - 0.001848	560 - 0.002135	non OMIM
	<i>SNAP29</i>	NM_004782.3	chr22:g.21224808C>A	c.421C>A	p.(Gln141Lys)	AD=16,4;AB=0.20	none	none - 1 variant affecting the same AA (1 - 0,000004070)	MIM609528 - unrelated phenotype - autosomal recessive
	<i>BIK</i>	NM_001197.4	chr22:g.43525234_43525235insTGCTGCTGGC GCTGCTGC	c.406_407insTG CTGCTGGCGCT GCTGC	p.(Leu143_Leu148dup)	AD=7,4;AB=0.36	738 - 0.006323	74 - 0.0002769	non OMIM
	<i>RHOA</i>	NM_001664.2	chr3:g.49412884C>T	c.139G>A	p.(Glu47Lys)	AD=6/222;AB=2.6	none	none	non OMIM
<i>PML</i>	NM_002675.3	chr15:g.74290351C>T	c.136C>T	p.(Pro46Ser)	AD=15,15;AB=0.50	none	none	MIM102578 - unrelated phenotype	
S2	<i>ISLR2</i>	NM_001130136.1	chr15:g.74425772C>A	c.677C>A	p.(Pro226His)	AD=24,6;AB=0.20	none	none	non OMIM
	<i>TSHZ3</i>	NM_020856.2	chr19:g.31768792G>A	c.1907C>T	p.(Ser636Phe)	AD=99,17;AB=0.15	none	none	non OMIM
	<i>RASSF2</i>	NM_014737.2	chr20:g.4771164G>A	c.470C>T	p.(Thr157Met)	AD=58,46;AB=0.44	9 - 0.00007673	10 - 0.00004665	non OMIM
	<i>AKAP4</i>	NM_003886.2	chrX:g.49957329C>T	c.2035G>A	p.(Glu679Lys)	AD=203,26;AB=0.11	none - 1 variant affecting the same AA (1 - 0.00001143)	none - 1 variant affecting the same AA (7 - 0.00003931)	non OMIM
	<i>EDA2R</i>	NM_001199687.2	chrX:g.65824274G>A	c.341C>T	p.(Ser114Phe)	AD=117,14;AB=0.11	none - 1 variant affecting the same AA (1 - 0.00001173)	none - 1 variant affecting the same AA (1 - 0,000005698)	non OMIM
	<i>PLXNB3</i>	NM_001163257.1	chrX:g.153032499C>T	c.286C>T	p.(Arg96Cys)	AD=133,18;AB=0.12	1 - 0.00001187	5 - 0,00002828	non OMIM
	S3	<i>RHOA</i>	NM_001664.2	chr3:g.49405927G>A	c.211C>T	p.(Pro71Ser)	AD=87:28;AB=0.24	none	none

<i>NBPF10</i>	NM_001039703.5	chr1:g.145297661C>A	c.536C>A	p.(Ala179Asp)	AD=39:6;AB=0.13	12 - 0.00009978	1421 - 0.005642	non OMIM
<i>LOR</i>	NM_000427.2	chr1:g.153233747_153233836delGGGGGCGGC TCCGGCTGCTTCTCCT CCGGTGGCGGGCGGCT CCTCCGGGGGCGGCT CCGGCTGCTTCTCCA GCGGTGGGGGCGGCT CCTCC	c.322_411delGG GGGCGGCTCC GGCTGCTTCTC CTCCGGTGGC GGCGGCTCCT CCGGGGGCGG CTCCGGCTGCT TCTCCAGCGGT GGGGGCGGCT CCTCC	p.(Ser121_Gly150del)	AD=26:6;AB=0.19	none	2 - 0.00007407	MIM604117 - unrelated phenotype
<i>CAB39</i>	NM_001130849.1	chr2:g.231678762_231678763delAG	c.628-2_628-1delAG	intronic	AD=29:4;AB=0.12	37 - 0.0003182	98 - 0.0004175	non OMIM
<i>FRG1</i>	NM_004477.2	chr4:g.190883039T>C	c.692T>C	p.(Leu231Pro)	AD=161:18;AB=0.10	none	4 - 0.0001317	non OMIM
<i>POLR3B</i>	NM_001160708.1	chr12:g.106820973delA	c.928-2delA	intronic	AD=79:19;AB=0.19	none	10 - 0.00005319	MIM614381 - unrelated phenotype - autosomal recessive
<i>SETD8</i>	NM_020382.3	chr12:g.123880924_123880925delTT	c.542_543delTT	p.(Leu181Hisfs*20)	AD=44:7;AB=0.14	none	none	non OMIM
<i>TSC2</i>	NM_000548.3	chr16:g.2137925_2137958delCCCTGCAGTGCA GGAAAGGTAGGGCCG GGTGGGG	c.5051_5068+16 delCCCTGCAGT GCAGGAAAGG TAGGGCCGGG TGGGG	intronic	AD=17:20;AB=0.54	270 - 0.002265	571 - 0.002071	MIM613254 - unrelated phenotype
<i>EPG5</i>	NM_020964.2	chr18:g.43460190T>C	c.5519-2A>G	intronic	AD=42:36;AB=0.46	none	1 - 0.00000457 8	MIM242840 - unrelated phenotype - autosomal recessive
<i>VCX</i>	NM_013452.2	chrX:g.7811958_7812017delGAGTCAGGAGAG CGAGATGGAAGAACC ACTGAGTCAGGAGAG CCAGGTGGAGGAACC ACC	c.522_581delGA GTCAGGAGAG CGAGATGGAA GAACCACTGAG TCAGGAGAGC CAGGTGGAGG AACCACC	p.(Pro183_Glu202del)	AD=84:39;AB=0.32	514 - 0.006246	439 - 0.002395	non OMIM

Candidate de novo mutational events were identified by focusing on protein-altering and splice-site changes as follows: (1) supported by at least three reads and 10% of total reads in the proband; (2) absent in both parents, as defined by variant reads representing less than 5% of total reads; (3) at base-pair positions covered by at least four reads in the entire trio; and (4) present at a frequency less than 1% in dbSNP (build 147) and 0.1% in the Exome Aggregation Consortium (ExAC). *RHOA* was the only candidate gene mutated in all three subjects, and no variants in other genes were found in more than one subject. Most candidate genes were rejected because of the high frequency of variants in public databases (*ANKRD36*, *BIK*, *CAB39*, *NBPF10*, *MDC1*, *RASSF2*, *TSC2*, *VCX*), their previous involvement in either unrelated autosomal recessive

(*EPG5*, *POLR3B*, *SNAP29*) or dominant (*LOR*) phenotypes, or their tolerance to variants in public databases (*AKAP4*, *FRG1*, *ISLR2*, *PLXNB3*, *TSHZ3*). *EDA2R* encodes a receptor for an isoform of ectodysplasin, mutated in hypohidrotic ectodermal dysplasia. However, the reference *EDA2R* sequence includes a high number of missense variants according to ExAC ($z = -1,63$). *SETD8*, a gene intolerant to loss-of-function variants in ExAC ($pLI = 0.95$), was found mutated in one subject only, and no evidence was found in the literature for its involvement in the observed phenotype.

Supplementary Table 4. Amplicons used for *RHOA* ultra-deep sequencing.

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

Abbreviations: bp: base pair. ^aBased on the human genome reference sequence GRCh37/hg19. *RHOA* RefSeq accession number: NM_001664.2. Exon 1 is non coding.

Supplementary Table 5. Summary of *RHOA* ultra-deep sequencing.

Individual	Tissue	Target	Mapped sequences ^c	Mean sequencing depth ^d	Percent target \geq 1000X ^d
S1	Fresh skin	Exon 2	12.9	80,873	100
	Fibroblasts (A) ^a	Exon 2	9.1	56,693	100
	Fibroblasts (N) ^b	Exon 2	1.6	10,336	100
	Fibroblasts (N) ^b	Exon 2	9.3	58,155	100
	Blood	Exon 2	9.0	56,261	100
Father S1	Blood	Exon 2	9.0	55,971	100
Mother S1	Blood	Exon 2	7.5	46,805	100
S2	Fresh skin	Exon 2	4.7	29,564	100
	Fibroblasts (A) ^a	Exon 2	4.1	25,954	100
	Blood	Exon 2	8.2	51,099	100
Mother S2	Blood	Exon 2	9.5	59,360	100
Father S2	Blood	Exon 2	7.8	48,453	100
S3	Fresh skin	Exon 3	1.4	11,482	100
	Blood	Exon 3	1.2	9,292	100
Mother S3	Blood	Exon 3	1.0	8,291	100
Father S3	Blood	Exon 2	1.5	11,871	100
S4	Fresh Skin	Exon 2	1.7	10,590	100
	Blood	Exon 2	1.4	8,506	100
S5	Fresh Skin	Exon 2	2.4	14,739	100
	Blood	Exon 2	2.0	12,225	100
S6	Fresh Skin	All coding exons	1.5	2,439	100

^aCultured skin fibroblasts derived from a biopsy of an affected (hypopigmented) skin lesion. ^bCultured skin fibroblasts derived from a biopsy in normal skin. ^cIn megabases. ^dBased on targeted coding bases and splice junctions. Depth-of-coverage metrics were calculated with the GATK DepthofCoverage tool using reads with mapping quality \geq 20 and bases with base quality \geq 30. *RHOA* RefSeq accession number: NM_001664.2.

Supplementary Table 6. Mutant allele fraction of the two *RHOA* mutations in all tested samples.

Individual	Tissue	Sequencing method	Alternative allele count ^c	Total reads count ^c	Mutant allele fraction ^c
<i>chr3:g.49412884C>T (c.139G>A; p.(Glu47Lys))</i>					
S1	Fresh skin	WES	44	144	30.6
		Targeted	30,761	91,492	33.5
	Fibroblasts (A) ^a	Targeted	11,534	63,041	18.3
	Fibroblasts (N) ^b	Targeted	1,632	11,924	13.7
	Fibroblasts (N) ^b	Targeted	1,186	63,208	1.9
Father S1	Blood	Targeted	56	58,126	0.1
		WES	0	89	0
Mother S1	Blood	Targeted	44	60,811	<0.1
		ES	0	173	0
S2	Fibroblasts	Targeted	57	49,274	0.1
		WES	6	228	2.6
	Fresh skin	Targeted	776	28,774	2.7
		Targeted	7,729	33,501	23.1
Father S2	Blood	Targeted	115	56,144	0.2
		WES	0	170	0
Mother S2	Blood	Targeted	31	51,869	0
		WES	0	123	0
S4	Fresh skin	Targeted	32	64,442	0.1
		Targeted	2,939	9,733	30.2
S5	Blood	Targeted	4	7,674	0.1
		Targeted	3,103	15,639	19.8
		Targeted	5	11,261	0.1
		Targeted			
<i>chr3:g.49405927G>A (c.211C>T; p.(Pro71Ser))</i>					
S3	Fresh skin	WES	28	115	24.3
		Targeted	3,381	11,651	29
	Blood	Targeted	7	9,305	0.1
Father S3	Blood	WES	0	79	0
		Targeted	10	11,774	0.1
Mother S3	Blood	WES	0	60	0
		Targeted	1	8,353	<0.1

Abbreviations: WES: whole exome sequencing. Targeted: targeted ultra-deep sequencing of *RHOA*. ^aCultured skin fibroblasts derived from a biopsy of an affected (hypopigmented) skin lesion. ^bCultured skin fibroblasts derived from a biopsy in normal skin. ^cOnly bases with base quality ≥ 30 were considered.

Supplementary Table 7. *RHOA* mutations, frequency in public variant databases, and *in silico* predictions.

<i>RHOA</i> variant ^a	dbSNP (build147)	COSMIC ^b	ExAC ^c	gnomAD ^c	GERP score	CADD score	PolyPhen-2 HumVar score ^d	SIFT score
chr3:g.49412884C>T c.139G>A p.Glu47Lys	Absent	Absent	None (~120,900 alleles sequenced)	None (~252,400 alleles sequenced)	5.9	35.0	0.855 (possibly damaging)	0.010 (damaging)
chr3:g.49405927G>A c.211C>T p.Pro71Ser	Absent	Absent	None (~121,400 alleles sequenced)	None (~248,700 alleles sequenced)	5.8	33.0	0.516 (possibly damaging)	0.002 (damaging)

Abbreviations: COSMIC: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer²; ExAC: Exome Aggregation Consortium³; gnomAD: Genome Aggregation Database⁴; GERP: Genomic Evolutionary Rate Profiling⁵; CADD: Combined Annotation-Dependent Depletion⁶; PolyPhen-2: Polymorphism Phenotyping v2⁷; SIFT: Sorting Tolerant From Intolerant⁸. ^aCoordinates of DNA changes are based on the human genome reference sequence GRCh37/hg19. The nomenclature of nucleotide and amino acid changes is based on *RHOA* RefSeq accession number NM_001664.2. ^bPresence in COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk/>, accessed in November 2016). ^cNumber of alleles found in ExAC (<http://exac.broadinstitute.org/>, accessed in November 2016) and gnomAD (<http://gnomad.broadinstitute.org/>, accessed in November 2016). ^dAmong the two scores provided by PolyPhen-2 the HumVar-trained model is the most appropriate for Mendelian diseases.

Supplementary Table 8. Phenotype of patients with hypomelanosis of Ito in the M.U.S.T.A.R.D. cohort.

Subject	<i>RHOA</i> 's related clinical manifestation							Other symptom	Test	Result
	Linear hypopigmentation	Craniofacial asymmetry	Acral anomalies	Teeth Anomalies	Ocular anomalies	Brain anomalies	Intellectual disability			
S1	+	+	+	+	+	+	-	-	WES	<i>RHOA</i>
S2	+	+	+	+	+	+	-	Asymmetrical hearing loss	WES	<i>RHOA</i> and m.11778 G>A
S3	+	+	+	+	-	+	-	Skeletal and vesicoureteral anomalies	WES	<i>RHOA</i>
S4	+	+	+	+	+	+	-	-	TUDS	<i>RHOA</i>
S5	+	+	+	+	-	-	-	Sigmoid and rectal atresia	TUDS	<i>RHOA</i>
S6	+	+	+	+	-	NA	-	-	TUDS	-
S7	+	+	+	+	+	NA	-	Bilateral hearing loss, asymmetrical lower limbs	Sanger Sequencing	<i>RHOA</i>
S8	+	+	+	-	-	-	-	Skeletal anomalies	WES	-
S9	+	-	-	-	+	+	+	Autism, Skeletal anomalies, seizure, spina bifida occulta	WES	Other postzygotic cause
S10	+	-	-	-	+	-	+	Atrial septal aneurysm, cryptorchidism	WES	Other constitutional cause

S11	+	-	+	-	+	+	+	Feeding difficulties, hypospadias, short stature, scoliosis, bilateral hearing loss, brachycephaly, hypertelorism	WES	Other postzygotic cause
S12	+	-	-	-	-	+	+	Autism, seizure	WES	Other postzygotic cause
S13	+	-	-	-	-	-	+	Fronto-nasal dysplasia, epilepsy, lower limbs hypoplasia	WES	Other constitutional cause
S14	+	-	+	-	-	-	+	Eczema, tongue protrusion	WES	-
S15	+	-	-	-	-	-	-	Skeletal anomalies, ichtiosis	WES	Other postzygotic cause
S16	+	-	-	-	-	-	+	Autism, hypotonia, feeding difficulties, hand stereotypies	WES	Other constitutional cause
S17	+	-	-	-	-	+	+	Low set hairline	WES	Other postzygotic cause
S18	+	-	-	-	-	-	+	Ptosis, Kawasaki disease, encopresia	WES	-
S19	+	-	-	-	-	+	-	Movement disorder	WES	Other postzygotic cause
S20	+	-	-	-	-	+	-	Scoliosis, kidney anomalies, leg length discrepancy	WES	-
S21	+	-	-	-	-	+	-	Progressive peripheral neuropathy	WES	Other postzygotic cause
S22	+	-	-	-	+	-	+	Seizures, autism	WES	-
S23	+	-	-	-	-	+	-	Macrocephaly	WES	-
S24	+	-	+	-	-	-	+	Leg length discrepancy, scoliosis, delayed puberty, cardiac valvular dysplasia	WES	Other postzygotic cause
S25	+	-	-	-	-	+	+	Obesity, synophris, blepharophimosis, ideomotor apraxia	WES	Other postzygotic cause

S26	+	-	-	-	-	-	-	Focal epilepsy	WES	Other postzygotic cause
S27	+	-	-	-	-	NA	+	Cryptorchidism, strabismus	TUDS	-
S28	+	-	-	+	-	NA	+	Microcephaly	TUDS	-
S29	+	-	-	-	NA	+	+	Feeding difficulties, atrial septal defect	TUDS	-
S30								-	TUDS	-
S31	+	-	-	+	+	-	+	-	TUDS	-

Supplementary Table 9. Summary of the most frequent somatic mutations of *RHOA* reported in cancer.

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

Abbreviations: COSMIC: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer². Only mutations reported at least five times in COSMIC are shown (accessed in November 2016). The nomenclature of amino acid changes is based on *RHOA* RefSeq accession number NM_001664.2.

Supplementary Table 10. Primers used for mutagenesis.

Variant	Sequence
E47K	Forward: TATGTGGCAGATATCAAGGTGGATGGAAAG Reverse: CTTCCATCCACCTTGATATCTGCCACATA
P71S	Forward: TGGGTAGGAGAGGGACCTCAGGCGATC Reverse: GATCGCCTGAGGTCCCTCTCCTACCCA

SUPPLEMENTARY REFERENCES

1. McKenna, A. *et al.* The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* **20**, 1297–1303 (2010).
2. Forbes, S. A. *et al.* COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res.* **43**, D805-811 (2015).
3. Lek, M. *et al.* Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* **536**, 285–291 (2016). Preprint <http://dx.doi.org/10.1101/531210>
4. Karczewski, K. *et al.*, Variation across 141,456 human exomes and genomes reveals the spectrum of loss-of-function intolerance across human protein-coding genes.
5. Cooper, G. M. *et al.* Single-nucleotide evolutionary constraint scores highlight disease-causing mutations. *Nat. Methods* **7**, 250–251 (2010).
6. Kircher, M. *et al.* A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat. Genet.* **46**, 310–315 (2014).
7. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet.* 2013 Jan;Chapter 7:Unit7.20. doi: 10.1002/0471142905.hg0720s76
8. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc.* 2009;4(7):1073-8
9. Nagata, Y. *et al.* Variegated RHOA mutations in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* **127**, 596–604 (2016).
10. Sakata-Yanagimoto, M. *et al.* Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat. Genet.* **46**, 171–175 (2014).
11. Kakiuchi, M. *et al.* Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma. *Nat. Genet.* **46**, 583–587 (2014).
12. Wang, K. *et al.* Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. *Nat. Genet.* **46**, 573–582 (2014).
13. O'Hayre, M. *et al.* Inactivating mutations in GNA13 and RHOA in Burkitt's lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma: a tumor suppressor function for the Gα13/RhoA axis in B cells. *Oncogene* **35**, 3771–3780 (2016).
14. Rohde, M. *et al.* Recurrent RHOA mutations in pediatric Burkitt lymphoma treated according to the NHL-BFM protocols. *Genes. Chromosomes Cancer* **53**, 911–916 (2014).

Reporting Summary

Nature Research wishes to improve the reproducibility of the work that we publish. This form provides structure for consistency and transparency in reporting. For further information on Nature Research policies, see [Authors & Referees](#) and the [Editorial Policy Checklist](#).

Statistics

For all statistical analyses, confirm that the following items are present in the figure legend, table legend, main text, or Methods section.

n/a Confirmed

- The exact sample size (n) for each experimental group/condition, given as a discrete number and unit of measurement
- A statement on whether measurements were taken from distinct samples or whether the same sample was measured repeatedly
- The statistical test(s) used AND whether they are one- or two-sided
Only common tests should be described solely by name; describe more complex techniques in the Methods section.
- A description of all covariates tested
- A description of any assumptions or corrections, such as tests of normality and adjustment for multiple comparisons
- A full description of the statistical parameters including central tendency (e.g. means) or other basic estimates (e.g. regression coefficient) AND variation (e.g. standard deviation) or associated estimates of uncertainty (e.g. confidence intervals)
- For null hypothesis testing, the test statistic (e.g. F , t , r) with confidence intervals, effect sizes, degrees of freedom and P value noted
Give P values as exact values whenever suitable.
- For Bayesian analysis, information on the choice of priors and Markov chain Monte Carlo settings
- For hierarchical and complex designs, identification of the appropriate level for tests and full reporting of outcomes
- Estimates of effect sizes (e.g. Cohen's d , Pearson's r), indicating how they were calculated

Our web collection on [statistics for biologists](#) contains articles on many of the points above.

Software and code

Policy information about [availability of computer code](#)

Data collection

See « Data analysis » (next section)

Data analysis

For exome sequencing and targeted sequencing, reads were aligned to the human genome reference sequence (GRCh37/hg19 build of UCSC Genome Browser) with the Burrows-Wheeler Aligner (BWA, v.0.6.2), and potential duplicate paired-end reads were marked with Picard v.1.77. The Genome Analysis Toolkit (GATK) v.2.6-4 was used for base quality score recalibration, indel realignment, and variant discovery. Variants were annotated with SeattleSeq SNP Annotation v138. Variants were systematically visualized on the Integrative Genomic Viewer v2.3. Imaging analysis was performed using ImageJ software v1.49. For WB, proteins were detected using Odyssey Image Studio v4.0.21 (LI-COR).

For manuscripts utilizing custom algorithms or software that are central to the research but not yet described in published literature, software must be made available to editors/reviewers. We strongly encourage code deposition in a community repository (e.g. GitHub). See the Nature Research [guidelines for submitting code & software](#) for further information.

Data

Policy information about [availability of data](#)

All manuscripts must include a [data availability statement](#). This statement should provide the following information, where applicable:

- Accession codes, unique identifiers, or web links for publicly available datasets
- A list of figures that have associated raw data
- A description of any restrictions on data availability

The manuscript includes the sentence "The data that support the findings of this study are available from the corresponding authors upon reasonable request." in the "Data availability" section

Field-specific reporting

Please select the one below that is the best fit for your research. If you are not sure, read the appropriate sections before making your selection.

Life sciences Behavioural & social sciences Ecological, evolutionary & environmental sciences

For a reference copy of the document with all sections, see [nature.com/documents/nr-reporting-summary-flat.pdf](https://www.nature.com/documents/nr-reporting-summary-flat.pdf)

Life sciences study design

All studies must disclose on these points even when the disclosure is negative.

Sample size	Seven patients with similar phenotypical features were included. Sample size could not be predetermined as it was conditioned by the number of human research participants / patients diagnosed with RHOA mutation participating in our study (7). These patients were enrolled in the M.U.S.T.A.R.D. cohort, registered in clinicaltrials.gov under the ref NCT01950975. At the time of this study, 31 patients with hypomelanosis of Ito were included in the cohorts, as described in Supp. Table 8. Only one skin biopsy was taken for each patient, in accordance to ethical limitation. Five transfected cell lines were generated and studied using IF and Western blot. Regarding IF, 20 cells in each group were selected at random across the cover slip and were individually examined. For Western Blot, four independent experiments for each transfection was performed, and average and standard deviation reflect these replicates.
Data exclusions	No data was excluded
Replication	To verify the reproducibility of the findings, we confirmed key findings of our study using several different and independent methodological approaches. After identification of the candidate gene with exome sequencing, we used targeted sequencing of this gene to study patients with similar phenotype, as well as patient with cutaneous pigmentary disorder with a different phenotype. All patients with similar phenotype carried a RHOA mutation except for one patient whose DNA was not analyzable due to failed quality control, whereas no RHOA variant was detected in patients with a different phenotype. We also used several independent experiments to evaluate the functional consequences of the mutations (Immunocytochemistry studies of the cytoskeletal organization and morphology in NIH/3T3 cells and quantification of MYPT1(pThr696); levels of two phosphorylated downstream effectors of RhoA by Western Blot), which showed concordant results. For Western Blot, four independent experiments for each transfection was performed. All attempts of replication were successful.
Randomization	Patients with mosaic pigmentary disorders involving the skin were allocated to this study by genotype (presence of a RHOA mutation). Due to the very limited number of patients with this condition, randomization was not possible.
Blinding	The investigator collecting images was blinded to the experimental groups. During analysis of immunocytochemistry data, the investigator was blinded to the identity of the experimental groups. The investigator carrying out the Western blot experiments was not blinded to the identity of the samples. Our use of the LI-COR Odyssey, fluorescent Western blot avoids two major issues with researcher bias. First, our protocol avoids selection bias or cherry picking of data points to be included in the analysis since in this report, all data points are included. Second, the fluorescence measurement using this Odyssey system is highly standardized. Measurement is done by the software without operator manipulation, which guarantee repeatability, that is, any other operator measuring the image using the same software will get the same numbers.

Reporting for specific materials, systems and methods

We require information from authors about some types of materials, experimental systems and methods used in many studies. Here, indicate whether each material, system or method listed is relevant to your study. If you are not sure if a list item applies to your research, read the appropriate section before selecting a response.

Materials & experimental systems

n/a	Involved in the study
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Antibodies
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Eukaryotic cell lines
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Palaeontology
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Animals and other organisms
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Human research participants
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Clinical data

Methods

n/a	Involved in the study
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> ChIP-seq
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Flow cytometry
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> MRI-based neuroimaging

Antibodies

Antibodies used

Immunocytochemistry: Mouse anti- α -tubulin (Sigma T9026, 1:5,000), goat anti-FLAG (A190-101A, Bethyl Laboratories, 1:500), AlexaFluor-conjugated antibodies (Life Technologies, 1:1,000), AlexaFluor-conjugated phalloidin to visualize F-actin (A12379, Life Technologies, 1:100), anti-Myc antibodies (Bethyl Laboratories, 1:500). Secondary antibodies: Donkey anti-Goat IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 Cat # A11055, Thermo Fisher Scientific, 1:1,000; Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568 Cat # A10042, Thermo Fisher Scientific, 1:1,000; Donkey anti-Mouse

Validation

IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 647 Cat # A31571, Thermo Fisher Scientific, 1:1,000.
 Western Blot: goat anti-actin (sc-1616, Santa-Cruz Biotechnology, 1:4,000), mouse anti-MYPT1 (612165, Becton-Dickinson, 1:4,000), rabbit anti-MYPT1(pT696) (ABS45, Millipore, 1:500), rabbit anti-RhoA (67B9, Cell Signaling, 1:4,000), rabbit anti-MLC2 (8505, Cell Signaling, 1:4,000), mouse anti-MLC2(pT19) (3674, Cell Signaling, 1:500). Secondary IRDye-conjugated antibodies: Donkey anti-mouse IRDye® 800CW LI-COR 926-32212 + donkey anti-rabbit IRDye® 680RD LI-COR 926-68073, both at 1:10,000.

Mouse anti- α -tubulin (Sigma T9026, 1:5,000), as per manufacturer validated for use in ICC and WB, validated for use in mouse, cited 2035 times <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t9026?lang=en®ion=US>

Rabbit anti-MYPT1(pT696) (ABS45, Millipore, 1:500), as per manufacturer validated for use in WB, validated for use in mouse, cited 16 times
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/abs45?lang=en®ion=US>

Goat anti-FLAG (A190-101A, Bethyl Laboratories, 1:500), as per manufacturer validated for use in WB and ICC, species specificity N/A, cited 15 times
<https://www.bethyl.com/product/A190-101A?referrer=search>

Goat anti-Myc (A190-104A, Bethyl Laboratories, 1:500), as per manufacturer validated for use in WB, species specificity N/A, cited 12 times
<https://www.bethyl.com/product/A190-104A?referrer=search#>

Goat anti-actin (sc-1616, Santa-Cruz Biotechnology, 1:4,000), as per manufacturer validated for use in WB and ICC, validated for use in mouse, cited 1700 times
<https://www.scbt.com/scbt/product/actin-antibody-i-19?requestFrom=search>

Mouse anti-MYPT1 (612165, Becton-Dickinson, 1:4,000), as per manufacturer validated for use in WB, validated for use in mouse,
<https://www.bdbiosciences.com/us/reagents/research/antibodies-buffers/cell-biology-reagents/cell-biology-antibodies/purified-mouse-anti-mypt1-20mypt1/p/612165>
 cited 8 times <https://www.citeab.com/antibodies/2411798-612165-purified-mouse-anti-mypt1?des=C6DA95FBD9320B2F>

Rabbit anti-RhoA (2117, Cell Signaling, 1:4,000), as per manufacturer validated for use in WB, validated for use in mouse, cited 122 times
<https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/rhoa-67b9-rabbit-mab/2117>

Rabbit anti-MLC2 (8505, Cell Signaling, 1:4,000), as per manufacturer validated for use in WB, validated for use in mouse, cited 28 times
<https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/myosin-light-chain-2-d18e2-rabbit-mab/8505>

Mouse anti-MLC2(pT19) (3675, Cell Signaling, 1:500), as per manufacturer validated for use in WB and ICC, validated for use in mouse, cited 130 times
<https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/phospho-myosin-light-chain-2-ser19-mouse-mab/3675>

Eukaryotic cell lines

Policy information about [cell lines](#)

Cell line source(s)	NIH/3T3 cells, obtained from ATCC, cat. # ATCC® CRL-1658™
Authentication	ATCC cell lines authentication process can be found here: https://www.atcc.org/Global/FAQs/E/A/Authenticating%20cell%20lines-249.aspx
Mycoplasma contamination	Mycoplasma free as per manufacturer's specification. Cells have been cultured in antibiotic free media to monitor for sterile technique
Commonly misidentified lines (See ICLAC register)	NIH/3T3 line is not in the latest database of commonly misidentified cell lines https://iclac.org/databases/cross-contaminations/

Human research participants

Policy information about [studies involving human research participants](#)

Population characteristics	Seven patients with similar phenotypical features were included.
Recruitment	Patients described in this study were addressed to the MAGEC reference center in Dijon to be analysed as part of the M.U.S.T.A.R.D. cohort (registered in clinicaltrials.gov under the ref NCT01950975), created in order to elucidate the genetic basis of mosaic disorders involving the skin. As it is a cohort at European scale, we postulate that it represents the diversity of patients carrying mosaic cutaneous disorder. All patients in this cohort with hypomelanosis of Ito were studied, without exclusion. Despite the apparently recurrent phenotype associated with RHOA mutation, we cannot exclude that these mutations may also cause a phenotype without cutaneous involvement (depending on the tissular distribution of the mosaic). In this case, we can expect that the phenotypic spectrum associated with RHOA mutations will broaden with further studies.


Ethics oversight

We obtained written informed consent from all subjects or their legal representatives, and the ethics committee of Dijon University Hospital approved the study.

Note that full information on the approval of the study protocol must also be provided in the manuscript.

b. Article 2 : Mutation post-zygotique du gène *KITLG* et
Hypermélanose nævoïde linéaire et en volutes

Article publié en premier auteur dans le *Journal of Investigative Dermatology*

<p data-bbox="1027 741 1372 792" style="text-align: right;"><i>A Sorlin et al.</i> Postzygotic <i>KITLG</i> Mutation in LWNH</p> <p data-bbox="212 835 1123 936">Mosaicism for a <i>KITLG</i> Mutation in Linear and Whorled Nevoid Hypermelanosis</p> <p data-bbox="212 958 898 981"><i>Journal of Investigative Dermatology</i> (2017) 137, 1575–1578; doi:10.1016/j.jid.2017.01.035</p> 
--

Chez un patient porteur d'une hypermélanoïse nævoïde linéaire et en volutes (LWNH), sporadique, sans atteinte extra-cutanée, nous avons identifié un variant faux-sens postzygotique au sein du gène *KITLG*, dont des mutations constitutionnelles ont précédemment été associées à un tableau d'hyper/hypo-pigmentation progressive familiale, autosomique dominant, avec (144) ou sans surdité (145–147). Cette variation faux-sens (NM_000899.3:c.329A>G p.(Asp110Gly)) est présente dans 28 % des lectures (52 % des cellules) dans l'ADN de biopsie de peau, et également présente dans le sang de manière plus faible, dans 18 % des lectures (36 % des cellules). Nous décrivons ici un tableau exclusivement pigmentaire, consistant en une hyperpigmentation suivant les lignes de Blaschko, non progressive, chez un jeune garçon. En immunohistochimie, sur une biopsie de peau réalisée en zone hyperpigmentée, nous observons une hyperexpression kératinocytaire du ligand de c-KIT, associée à une augmentation du nombre de mélanocytes.

Les mutations de *KITLG* impliquées dans ces différentes affections sont des mutations gain-de-fonction, responsables d'une anomalie primitivement kératinocytaire, le phénotype pigmentaire ne résultant que d'une atteinte secondaire mélanocytaire. En dehors d'une description de transmission autosomique récessive (148), les différents tableaux liés à ce gène se transmettent sur un mode d'hérédité autosomique dominant. Le phénotype cutané lié à la variation post-zygotique présente chez notre patient est sensiblement différent de celui présent dans les formes constitutionnelles. Il n'est pas exclu qu'il existe pour ce patient une possibilité de transmission germinale de cette variation, qui, à l'état constitutionnel dans sa descendance, pourrait être responsable d'un phénotype différent.

Par ailleurs, il existe dans la littérature des descriptions de formes familiales de LWNH, suggérant une transmission dominante liée à l'X et un mosaïcisme fonctionnel (149).

Nous n'avons connaissance que d'un autre patient porteur d'une LWNH associée à une mutation post-zygotique de *KITLG*, présenté par une équipe japonaise en communication affichée au congrès *International Investigative Dermatology* à Orlando en 2018, travail qui n'a pas été publié à ce jour. Dans notre cohorte, il n'a pas pu être trouvé de mutation post-zygotique de *KITLG* ou d'un autre gène, chez les autres patients présentant une LWNH isolée, même si certains sont toujours en cours d'étude. L'étude de patients supplémentaires est nécessaire afin de préciser la corrélation entre les différentes variations de ce gène et les

phénotypes variés qui y sont associées. En effet, l'identification d'une variation causale postzygotique dans le gène *KITLG* est d'importance pour le conseil génétique. En effet, l'existence de deux affections mendéliennes dominantes précédemment associées à ce gène - la première exclusivement pigmentaire (Hyper- et hypo-pigmentation familiale progressive, OMIM #145250 (146,147)), et la seconde présentant également une atteinte sensorielle (syndrome de Waardenbourg de type 2 ou Surdité dominante unilatérale ou asymétrique, OMIM #616697, (144,148)) – confère un risque pour notre patient de transmettre la variation, présente en mosa ique chez lui, à l'état constitutionnel et homogène à sa descendance. Compte tenu de la localisation protéique de sa variation en position 110, c'est-à-dire à distance du point-chaud mutationnel associé à la forme constitutionnelle exclusivement pigmentaire, le risque de transmission d'une forme syndromique avec atteinte sensorielle est à considérer.



Mosaicism for a *KITLG* Mutation in Linear and Whorled Nevoid Hypermelanosis

Journal of Investigative Dermatology (2017) 137, 1575–1578; doi:10.1016/j.jid.2017.01.035

TO THE EDITOR

Linear and whorled nevoid hypermelanosis (LWNH) has hitherto been considered a nonspecific manifestation of mosaicism. We performed deep-exome sequencing on skin from a patient with LWNH and identified a postzygotic mutation in *KITLG*, associated with increased *KITLG* and c-KIT epidermal expression. Because germline *KITLG* mutations have previously been described in a Mendelian disorder, familial progressive hyper- and hypopigmentation (FPHH), LWNH can be considered a mosaic presentation of FPHH.

Linear and whorled nevoid hypermelanosis was initially described as a macular hyperpigmentation following Blaschko's lines (Kalter et al., 1988). Differential diagnosis includes other linear pigmentary anomalies, such as the pigmentary stage of incontinentia pigmenti, the early stage of keratinocytic epidermal nevi, or hypomelanosis of Ito, the hypopigmented counterpart of LWNH, which can be associated with streaks of hyperpigmentation (Cohen et al., 2014). As for hypomelanosis of Ito, LWNH has been considered a nonspecific pigmentary manifestation of mosaicism (Happle, 2014) rather than a specific nosological entity. Indeed, various cytogenetic anomalies have been reported in association with hypomelanosis of Ito (Sybert, 1994) or LWNH, either in a mosaic or nonmosaic state. However, the molecular basis of LWNH has remained unknown. Here, we report identification of a postzygotic *KITLG* mutation in a sporadic case of LWNH.

A 6-year-old boy previously reported in infancy (Maruani et al., 2012) had congenital linear and mottled hyperpigmentation on his trunk and limbs, without previous rash or additional

cutaneous features. He had normal psychomotor, neurosensory, and general development after a 6-year follow-up. Hyperpigmentation increased in the first days of life and then remained stable. No hypopigmentation was found. Results of an audiogram performed because of chronic otitis were normal. Complete blood count and full clinical examination results were otherwise normal. Skin biopsy showed increased keratinocytic melanin content in the lower epidermis, without pigmentary incontinence (Figure 1). We performed deep whole-exome sequencing with a mean coverage of 150.64-fold on hyperpigmented skin from the patient and blood from his unaffected parents (see Supplementary Materials and Methods online). We identified a de novo postzygotic *KITLG* variant (NM_000899.3:c.329A>G; encoding p.Asp110Gly) in 41 out of 145 reads (Figure 2), which we confirmed by targeted next-generation sequencing using the Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, San Diego). The *KITLG* c.329A>G variant was found in 28% of reads in affected skin (mean coverage = 2279.8-fold) and in 18% of reads in blood (mean coverage = 927.2-fold). The identified substitution was absent from the COSMIC (i.e., Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) and ExAC (i.e., Exome Aggregation Consortium) databases. It alters an evolutionarily conserved nucleotide (Genomic Evolutionary Rate Profiling score = 5.950) and is predicted to be deleterious by in silico algorithms (Combined Annotation Dependent Depletion score = 17.270, Grantham score = 94, and PolyPhen score = 1). Paraffin-embedded skin section immunostaining using anti-*KITLG* polyclonal

antibody (anti-SCF, C19H6; Abcam, Cambridge, MA) showed intense nuclear and cytoplasmic staining of basal and spinous layer keratinocytes. In addition, c-KIT staining showed increased epidermal expression in basal keratinocytes, and HMB45 staining showed an increase in melanocytes in the basal epidermal layer (Figure 1).

Germline missense *KITLG* mutations in exon 2 have previously been found in patients with familial progressive hyper- and hypopigmentation (FPHH, OMIM 145250), who exhibit progressive early-onset diffuse hyperpigmentation with lentigines, hypopigmented macules, and larger café-au-lait macules (Amyere et al., 2011; Cuell et al., 2015; Wang et al., 2009; Zanardo et al., 2004; Zhang et al., 2016). LWNH is, therefore, a mosaic presentation of FPHH, as previously described for other Mendelian disorders. *KITLG*, also known as *SCF*, encodes the sole activating ligand for the tyrosine kinase c-KIT receptor, which acts exclusively in a melanocyte-autonomous manner (Aoki et al., 2015). *KITLG* controls melanocyte migration, proliferation, and survival, as well as melanin synthesis (Wehrle-Haller, 2003). All known *KITLG* mutations, including the one we identified, are predicted to affect both its soluble and transmembrane isoforms. They are located near KIT binding sites and may alter binding with c-KIT (Figure 2) (Yuzawa et al., 2007). Previously reported *KITLG* mutations in FPHH are clustered in exon 2 on binding site III, which interacts with the c-KIT D3 domain. These mutations are presumed to result in a gain of function, because injection of the mutant recombinant protein increases tyrosinase activity and melanin content in melanoma cell lines (Wang et al., 2009). Although no functional analyses were performed on keratinocytes from our patient, immunohistochemistry suggests that the variant encoding p.Asp110Gly in exon 4 results in increased epidermal expression of

Abbreviations: FPHH, familial progressive hyper- and hypopigmentation; LWNH, linear whorled nevoid hypermelanosis

Accepted manuscript published online 28 February 2017; corrected proof published online 17 May 2017

© 2017 The Authors. Published by Elsevier, Inc. on behalf of the Society for Investigative Dermatology.

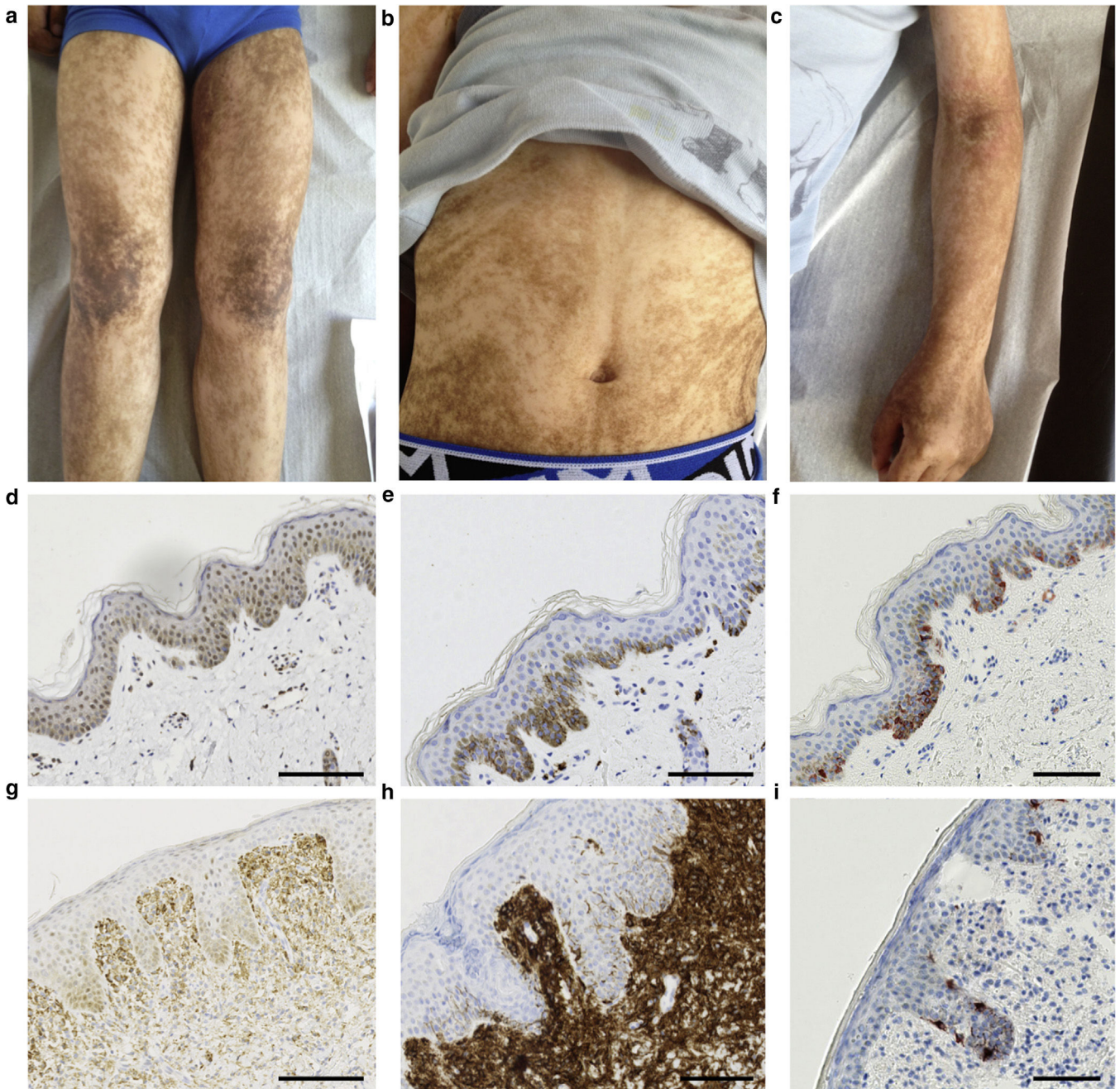


Figure 1. Clinical presentation and immunostaining studies. (a–c) Proband aged 6 years: mottled and linear hyperpigmentation on the limbs and abdomen. (d–f) Immunostaining of skin sections from the proband at age 1 month, showing (d) increased epidermal nuclear and cytoplasmic expression of KITLG (SCF) in basal and spinous keratinocytes (anti-SCF C19H6 polyclonal antibody specific for the liaison domain, dilution 1/800), (e) increased epidermal cytoplasmic C-KIT (CD117) expression in basal and suprabasal keratinocytes (dilution 1/500), and (f) increase in melanocytes in the basal epidermal layer (HMB45 staining, dilution 1/500). (g–h) Control immunostaining from a control with cutaneous mastocytosis aged 2 years: (g) KITLG expression in dermal mast cell infiltrate with faint cytoplasmic expression in basal keratinocytes (dilution 1/400), (h) C-KIT expression in dermal mast cells and epidermal dendritic melanocytes; absent expression in keratinocytes (dilution 1/500), and (i) HMB45 staining in control sample. Scale bar = 100 μ m.

KITLG and an increased number of epidermal melanocytes (Figure 1). This is consistent with previous findings on epidermal KITLG expression in FPHH (Zhang et al., 2016), solar lentigo (Hattori et al., 2004), or UV-induced hyperpigmentation (Hachiya et al., 2001). Hence, hyperpigmentation associated with *KITLG* mutations

appears to result from primary functional alteration of keratinocytes rather than melanocytes. Associated increased epidermal expression of c-KIT had not been reported in FPHH. This suggests that expression of the p.Asp110Gly variant in keratinocytes causes autocrine and paracrine up-regulation of c-KIT, resulting in

increased melanogenesis in melanocytes (Wehrle-Haller, 2003). Previously described *KITLG* mutations in exon 4 (near the KIT D2 binding site) have been reported in patients with non-syndromic unilateral and asymmetric hearing loss or Waardenburg syndrome type 2, where hypopigmentation without hyperpigmentation is present

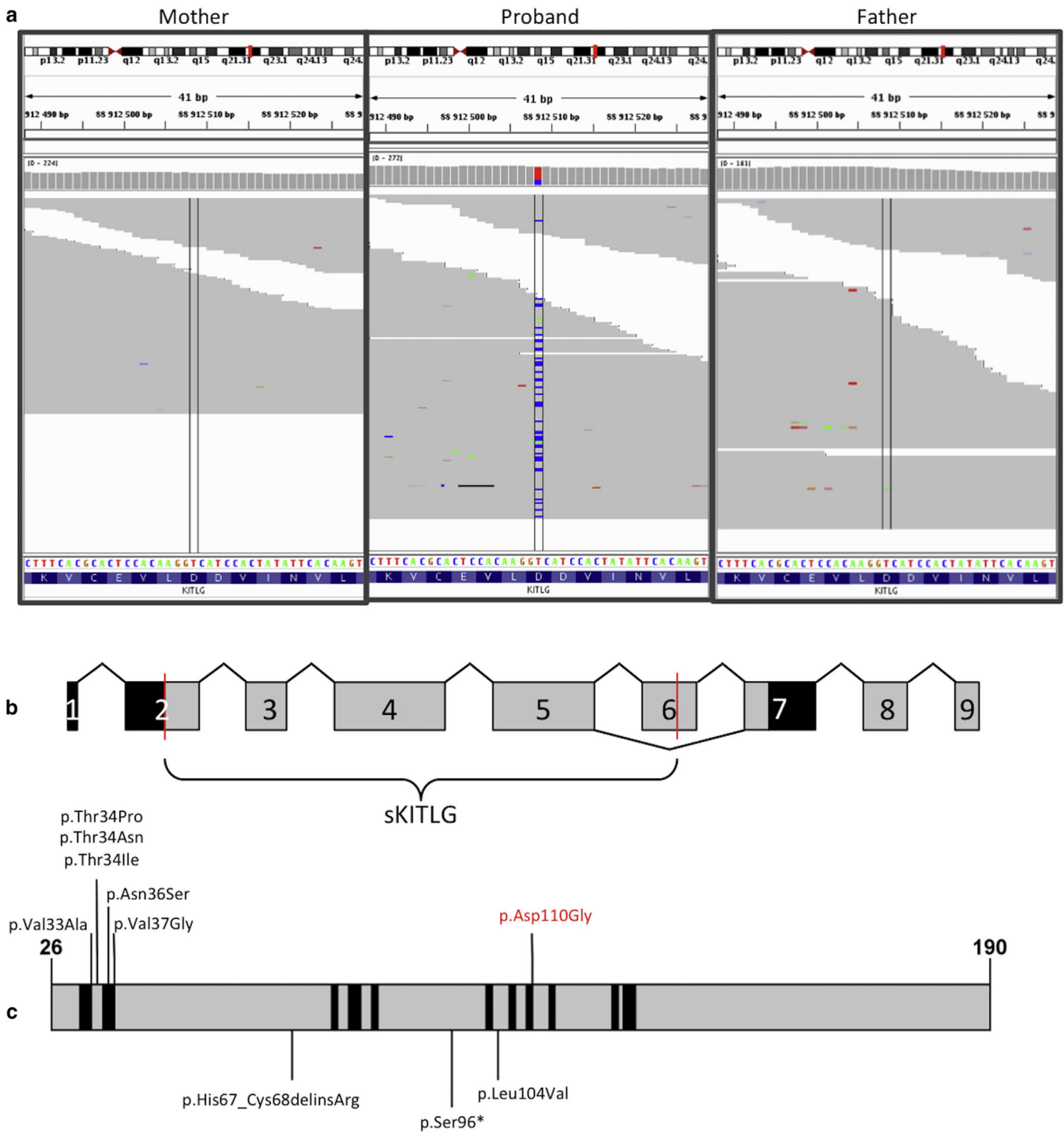


Figure 2. Integrative Genomics Viewer (Broad Institute, Cambridge, MA) screenshot of whole-exome sequencing for *KITLG* variant and summary of all known *KITLG* mutations in human disorders. (a) *KITLG*c.329A>G (p.Asp110Gly) variant was present in 28% of reads in the proband's skin and absent in parents' blood. (b) Genomic structure of *KITLG*. Membrane-bound and soluble *KITLG* isoforms result from alternative splicing of exon 6, which contains a cleavage site (red line). Protein domains: AA 1–25 (black), signal peptide; 26–214 (grey), extracellular domain; 215–237 (black), transmembrane domain; 238–273 (grey), cytoplasmic domain. (c) *KITLG* p.Asp110Gly variant (red) and sKITLG domain mutations identified in FPHH (top) and nonsyndromic unilateral and asymmetric hearing loss/Waardenburg Syndrome type 2 (bottom), localized near KIT-binding sites (black) (Yuzawa et al., 2007). FPHH, familial progressive hyper- and hypopigmentation.

(Zazo Seco et al., 2015). Our patient had normal audition and no hypopigmentation.

To conclude, this report of a molecular basis for LWNH as a mosaic presentation of FPHH due to *KITLG*

mutations expands the spectrum of nonlethal gene mutations involved in both constitutive and mosaic disorders. However, because we have not yet studied additional patients with LWNH, we cannot exclude involvement of

other genes in this pigmented phenotype. Nevertheless, identification of a previously unreported *KITLG* mutation in a mosaic state in LWNH extends the clinical spectrum of *KITLG*-related pigmentation anomalies and may

ultimately provide new insight into pigmentation regulation.

Written informed consent for genomic analysis and authorization for publication of photographs were obtained from parents. The study was approved by our regional institutional review board (CPP Est I) and registered as NCT01950975.

ORCID

Pierre Vabres: <http://orcid.org/0000-0001-8693-3183>

CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank the subject and his family involved in the study and the Centre de Calcul de l'université de Bourgogne (CCuB, <https://haydn2005.u-bourgogne.fr/dsi-ccub/>) for technical support and management of the information technology platform. This work was supported by the Conseil Régional de Bourgogne, Centre Hospitalier Universitaire Dijon-Bourgogne, Ministère des Affaires Sociales et de la Santé, Direction Générale de l'Offre de Soins (DGOS), through the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC), Société Française de Dermatologie (SFD), and Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-PDOC-0029).

Arthur Sorlin¹, Annabel Maruani^{2,3}, Marie-Hélène Aubriot-Lorton⁴, Paul Kuentz^{1,5,6}, Yannis Duffourd^{1,5}, Sandra Teyssie^{4,7}, Virginie Carmignac¹, Judith St-Onge^{1,8}, Martin Chevarin¹, Thibaud Jouan¹, Christel Chauvin-Robinet^{1,4,9,10}, Julien Thevenon^{1,4,9,10}, Laurence Faivre^{1,4,9,10}, Jean-Baptiste Rivière^{1,4,8,11} and Pierre Vabres^{1,4,7,9,*}

¹Université Bourgogne Franche-Comté, EA 4271 Génétique des Anomalies du Développement, Dijon, France; ²Service de Dermatologie, CHRU de Tours, Tours, France;

³Université François Rabelais, CIC-Inserm1415, Tours, France; ⁴Service de Pathologie, Plateau Technique de Biologie, CHU Dijon Bourgogne, France; ⁵Fédération Hospitalo-Universitaire Médecine Translationnelle et Anomalies du Développement, CHU Dijon Bourgogne, France; ⁶Génétique Biologique Histologie, CHRU de Besançon, Besançon, France; ⁷Service de Dermatologie, CHU Dijon Bourgogne, Dijon, France; ⁸Child Health and Human Development Program, Research Institute of the McGill University Health Centre, Montreal, Quebec, Canada; ⁹Centre de référence Anomalies du Développement et Syndromes Malformatifs, CHU Dijon Bourgogne, France; ¹⁰Service de Pédiatrie 1 et de Génétique Médicale, CHU Dijon Bourgogne, Dijon, France; and ¹¹Department of Human Genetics, Faculty of Medicine, McGill University, Montreal, Quebec, Canada
*Corresponding author e-mail: pierre.vabres@chu-dijon.fr

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is linked to the online version of the paper at www.jidonline.org, and at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2017.01.035>.

REFERENCES

- Amyere M, Vogt T, Hoo J, Brandrup F, Bygum A, Boon L, et al. KITLG mutations cause familial progressive hyper- and hypopigmentation. *J Invest Dermatol* 2011;131:1234–9.
- Aoki H, Tomita H, Hara A, Kunisada T. Conditional deletion of Kit in melanocytes: white spotting phenotype is cell autonomous. *J Invest Dermatol* 2015;135:1829–38.
- Cohen J 3rd, Shahrokh K, Cohen B. Analysis of 36 cases of Blaschkoid dyspigmentation: reading between the lines of Blaschko. *Pediatr Dermatol* 2014;31:471–6.
- Cuell A, Bansal N, Cole T, Kaur MR, Lee J, Loffeld A, et al. Familial progressive hyper- and hypopigmentation and malignancy in two families with new mutations in KITLG. *Clin Exp Dermatol* 2015;40:860–4.
- Hachiya A, Kobayashi A, Ohuchi A, Takema Y, Imokawa G. The paracrine role of stem cell

factor/c-kit signaling in the activation of human melanocytes in ultraviolet-B-induced pigmentation. *J Invest Dermatol* 2001;116:578–86.

Happle R. Mosaicism in human skin: understanding nevi, nevoid skin disorders, and cutaneous neoplasia. Berlin: Springer; 2014.

Hattori H, Kawashima M, Ichikawa Y, Imokawa G. The epidermal stem cell factor is over-expressed in lentigo senilis: implication for the mechanism of hyperpigmentation. *J Invest Dermatol* 2004;122:1256–65.

Kalter DC, Griffiths WA, Atherton DJ. Linear and whorled nevoid hypermelanosis. *J Am Acad Dermatol* 1988;19:1037–44.

Maruani A, Khallouf R, Machet MC, Lorette G. Diffuse linear and whorled nevoid hypermelanosis in a newborn. *J Pediatr* 2012;160:171.

Sybert VP. Hypomelanosis of Ito: a description, not a diagnosis. *J Invest Dermatol* 1994;103(5 Suppl.):141S–3S.

Wang ZQ, Si L, Tang Q, Lin D, Fu Z, Zhang J, et al. Gain-of-function mutation of KIT ligand on melanin synthesis causes familial progressive hyperpigmentation. *Am J Hum Genet* 2009;84:672–7.

Wehrle-Haller B. The role of Kit-ligand in melanocyte development and epidermal homeostasis. *Pigment Cell Res* 2003;16:287–96.

Yuzawa S, Opatowsky Y, Zhang Z, Mandiyan V, Lax I, Schlessinger J. Structural basis for activation of the receptor tyrosine kinase KIT by Stem Cell Factor. *Cell* 2007;130:323–34.

Zanardo L, Stolz W, Schmitz G, Kaminski W, Vikkula M, Landthaler M, et al. Progressive hyperpigmentation and generalized lentiginosis without associated systemic symptoms: a rare hereditary pigmentation disorder in south-east Germany. *Acta Derm Venereol* 2004;84:57–60.

Zazo Seco C, Serrão de Castro L, van Nierop JW, Morín M, Jhangiani S, Verver EJ, et al. Allelic mutations of KITLG, encoding KIT ligand, cause asymmetric and unilateral hearing loss and Waardenburg syndrome type 2. *Am J Hum Genet* 2015;97:647–60.

Zhang J, Cheng R, Liang J, Ni C, Li M, Yao Z. Report of a sporadic familial progressive hyper- and hypopigmentation child caused by a novel KITLG mutation. *Br J Dermatol* 2016;175:1369–71.

Skin Treatment with Detergent Promotes Protease Allergen-Dependent Epicutaneous Sensitization in a Manner Different from Tape Stripping in Mice

Journal of Investigative Dermatology (2017) 137, 1578–1582; doi:10.1016/j.jid.2017.02.970

Abbreviations: EC, epicutaneous; IN, intranasal; SDS, sodium dodecyl sulfate; Th, T helper; TSLPR, TSLP receptor

Accepted manuscript published online 1 March 2017; corrected proof published online 17 May 2017

© 2017 The Authors. Published by Elsevier, Inc. on behalf of the Society for Investigative Dermatology.



TO THE EDITOR

Skin is considered to be a major route for allergen sensitization in not only atopic dermatitis but also atopic

Supplementary Materials and Methods

Whole Exome Sequencing and data analysis

Exome capture and sequencing were performed from 1 µg of genomic DNA per sample using the SureSelect All Exon V5 design (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). DNA fragments were sequenced on a HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA) according to the manufacturer's recommendations for paired-end sequencing. The quality of sequencing reads was assessed with FastQC (v0.11.14)¹. Sequencing adapters and low-quality bases were removed using Trimmomatic (v0.35)². Reads were aligned to the human genome reference sequence GRCh37/hg19 with the Burrows-Wheeler Aligner (BWA, v0.7.12)³. Realignment around insertions and deletions was performed using the Genome Analysis Toolkit (GATK, v2.8-1)⁴. Picard⁵ and the GATK were used to collect quality-control, to perform sequencing depth and coverage metrics, to eliminate PCR duplicates and to recalibrate base quality score. As previously described⁶, candidate single-nucleotide variants and small insertions/deletions were identified by recording all sites of coding exons and splice junctions with at least four reads not matching the reference sequence, using a stringent base quality threshold of 30 and a mapping quality threshold of 20. Variants were annotated with SeattleSeq Annotation⁷. Candidate *de novo* mutational events were identified by focusing on protein-altering and splice-site changes: (1) supported by at least three reads and 10% of total reads in the proband; (2) absent in both parents, as defined by variant reads representing less than 5% of total reads; (3) at base-pair positions covered by at least four reads in the entire trio; (4) and present at a frequency less than 0.1% in the Exome Aggregation Consortium database (ExAC)⁸. Finally, the remaining candidate variants were classified according to the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) guidelines⁹.

Ultra-deep sequencing of *KITLG*

Using a targeted ultra-deep sequencing strategy, as previously described¹⁰, *KITLG* exon 4 (RefSeq accession number NM_000899.3) was screened for validation of the c.329A>G mutation and comparison of the alternative allele frequency in all available samples from the patient and his parents. The region of interest was amplified using custom intronic primers (Forward primer: AGGTGCCTCATTTTCCCAAC; Reverse primer: GCACAGGATTGGGGTTGGAA) and long-range polymerase chain reactions (PCR) with the PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara Bio, Saint-Germain-en-Laye, France). We pooled, purified, and quantified PCR amplicons from each sample. We prepared libraries using the Nextera XT DNA Sample Preparation kit (Illumina, Paris, France), which involves simultaneous fragmentation and tagging of DNA fragments by in vitro transposition¹¹. We carried out paired-end sequencing reactions of 150-bp reads on a MiSeq platform using 300-cycle reagent kits v2 (Illumina, Paris, France). We performed Ultra-deep sequencing data analysis with the same pipeline as described for the whole exome sequencing data analysis (without the elimination of PCR duplicates and the recalibration of base quality score recalibration steps).

Patient consent

We obtained written informed consent from the patient legal representatives.

References for Supplementary Materials and Methods

1. FastQC. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
2. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinforma Oxf Engl*. 2014;30(15):2114-2120.
3. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinforma Oxf Engl*. 2010;26(5):589-595.
4. McKenna A, Hanna M, Banks E, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 2010;20(9):1297-1303.
5. Picard. <https://broadinstitute.github.io/picard/>.
6. Rivière J-B, Mirzaa GM, O’Roak BJ, et al. De novo germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. *Nat Genet*. 2012;44(8):934-940.
7. SeattleSeq Annotation 138. <http://snp.gs.washington.edu/SeattleSeqAnnotation138/>.
8. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016;536(7616):285-291.
9. 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 Off J Am Coll Med Genet*. 2015;17(5):405-424.
10. Kuentz P, Fraitag S, Gonzales M, Dhombres F, St-Onge J, Duffourd Y et al. Mosaic-activating FGFR2 mutation in two fetuses with papillomatous pedunculated sebaceous naevus. *Br J Dermatol*. 2016 Apr 20. doi: 10.1111/bjd.14681.

11. Caruccio N. Preparation of next-generation sequencing libraries using Nextera™ technology: simultaneous DNA fragmentation and adaptor tagging by in vitro transposition. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2011;733:241-255.

c. Article 3: Hypomélanose de Ito liée à *MTOR*

Article en cours de rédaction :

Phenotypic and histological spectrum of MTOR-related hypomelanosis of Ito.

Carmignac V, Parker VER, Blanchard-Laumonie E, Aubriot-Lorton M-H, Mignot C, **Sorlin A**, Courcet J-B, Duffourd Y, Kuentz P, Rodriguez D, Knox RG, Boland A, Olaso R, Delepine M, Darmency V, Polubothu S, Quelin C, Rollier P, Gougeon L, Grotto S, Capri Y, Jacquemont M-L, Odent S, Amram D, Chevarin M, Vincent-Delorme C, Catteau B, Guibaud L, Arzimanoglou A, Keddar M, Callier P, Bessis D, Geneviève D, Kinsler V, Deleuze J-F, Semple RK, Philippe C, Faivre L, Rivière J-B, Vabres P.

Contribution personnelle : recrutement de patients, analyse des données de séquençage, analyse phénotypique des patients porteurs de mutations de *MTOR*.

Des mutations constitutionnelles du gène *MTOR* ont été rapportées dans le syndrome de Smith-Kingsmore (OMIM #616638), un syndrome de déficience intellectuelle syndromique, avec macrocéphalie, épilepsie et particularités de la morphologie faciale, en particulier hypoplasie de l'étage moyen, hypertélorisme, fentes palpébrales orientées en bas et en dehors, lèvre supérieure fine, et philtrum plat (14,150–152). Au sein de certaines séries de patients, une minorité présentait une mutation post-zygotique, associée à un phénotype différent, comportant une hypopigmentation linéaire (Figure 1 de l'article) et une hémimégalencéphalie (14,153). Il s'agit du seul exemple à ce jour d'atteinte pigmentaire en mosaïque à type d'hypomélanose d'Ito associée à un gène de la voie PI3K-AKT-MTOR.

De manière concomitante à l'identification de ces premiers patients atypiques, une mutation post-zygotique a été détectée en ES chez un patient de la cohorte. Après identification des patients de la cohorte présentant une HI avec épilepsie et macrocéphalie, la réplication de ce résultat en séquençage ciblé (TUDS) a permis l'identification de variations post-zygotiques chez 13 d'entre eux⁴.

Cet article présente les données phénotypiques de la plus grande cohorte de patients porteurs de mutations post-zygotiques de *MTOR* responsable d'une HI publiée à ce jour.

Une étude en microscopie électronique des biopsies de peau de deux sujets a également été réalisée, permettant d'évaluer la maturation de mélanocytes. Ces derniers sont présents en territoire hypopigmenté, mais en quantité diminuée. De plus, les mélanocytes comportent une proportion augmentée de mélanosomes de type I, immatures, et une diminution des mélanosomes matures (Figure 6 de l'article). L'HI dans ce syndrome résulte donc à la fois d'une anomalie de nombre et de maturation des mélanocytes, ce qui est concordant avec des observations réalisées dans des atteintes hypochromes liées au gène *TSC1*, présent dans la même cascade de signalisation.

⁴ Ainsi que chez 1 patient supplémentaire, inclus dans la cohorte après la date limite des inclusions pour ce manuscrit. Ce patient n'est donc pas compris dans les données présentées en section IV.2.

Les mutations en mosaïque du gène *MTOR* sont donc associées à un phénotype distinct du syndrome de Smith-Kingsmore, et l'association d'une héli-mégalencéphalie et d'une hypopigmentation linéaire doit faire suspecter cette forme reconnaissable d'hypomélanose d'Ito.

TITLE PAGE

Title

Phenotype and skin characteristics of MTOR-related hypomelanosis of Ito.

Authors

Virginie Carmignac^{1,2}, Victoria E.R. Parker³, Emmanuelle Blanchard-Laumonier^{4,5}, Marie-Hélène Aubriot-Lorton⁶, Cyril Mignot^{7,8}, Arthur Sorlin^{1,9,10}, Jean-Benoît Courcet^{1,9,10}, Yannis Duffourd^{1,9}, Paul Kuentz^{1,9}, Diana Rodriguez⁸, Rachel G Knox³, Anne Boland¹¹, Robert Olaso¹¹, Marc Delepine¹¹, Véronique Darmency¹⁰, Satyamaanasa Polubothu^{12,13}, Chloé Quelin¹⁴, Paul Rollier¹⁴, Louise Gougeon¹⁴, Sarah Grotto¹⁵, Yline Capri¹⁵, Marie-Line Jacquemont¹⁶, Sylvie Odent¹⁴, Daniel Amram¹⁷, Martin Chevarin^{1,18}, Catherine Vincent-Delorme¹⁹, Benoît Catteau²⁰, Laurent Guibaud²¹, Alexis Arzimanoglou^{22,23}, Malika Keddar²⁴, Patrick Callier^{1,9,24}, Didier Bessis²⁵, David Geneviève²⁶, Veronica Kinsler^{12,13}, Jean-François Deleuze¹¹, Robert K. Semple³, Christophe Philippe^{1,17}, Laurence Faivre^{1,9}, Jean-Baptiste Rivière^{1,9*}, Pierre Vabres^{1,9*}

Affiliations

¹INSERM UMR1231, Burgundy Franche-Comté university, Dijon, France.

² MAGEC-Mosaïque reference center, Dijon university hospital, Dijon France

³The University of Cambridge Metabolic Research Laboratories, Institute of Metabolic Science, Cambridge, United Kingdom.

⁴Anatomy and pathologic Cytology, Cellular Biology and electronic microscopy unit

⁵ INSERM U1259 « Morphogenèse et Antigénicité du VIH et des virus des hépatites »

⁶ Pathology department, Dijon-Burgundy university hospital, Dijon, France.

⁷Neuropediatrics and development pathology department, Trousseau Hospital, AP-HP, Paris, France.

- ⁸ Genetic department and Reference Center of rare causes of Intellectual Disability, Pitié-Salpêtrière hospital, AP-HP, Paris, France.
- ⁹Fédération Hospitalo-Universitaire Médecine Translationnelle et Anomalies du Développement (TRANSLAD), Dijon-Burgundy university hospital, Dijon, France.
- ¹⁰Pediatrics and medical genetic department, Dijon-Burgundy university hospital, Dijon, France.
- ¹¹ Genotyping National Center, Genomic Institute, CEA, Evry, France.
- ¹²Genetics and Genomic Medicine, University College London GOS Institute of Child Health, London, WC1N 1EH, UK
- ¹³Paediatric Dermatology, Great Ormond St Hospital for Children NHS Foundation Trust, London, WC1N 3JH, UK
- ¹⁴Clinical genetics department, Rennes university Hospital, Rennes, France
- ¹⁵ Genetics Department, AP-HP, Robert-Debré University Hospital, Paris, France
- ¹⁶Medical Genetics Unit, CHU La Réunion, Saint-Pierre, France
- ¹⁷Clinical genetic department, Créteil hospital, France
- ¹⁸ « Innovation en diagnostic génétique des maladies rares » unit, Dijon university hospital, France
- ¹⁹ Medical genetic department, Jeanne de Flandre hospital, Lille, France.
- ²⁰Dermatology department, Lille university hospital, Lille, France
- ²¹Pediatric and Fetal imagery department, Hospices Civils de Lyon, Bron, France.
- ²²« Epilepsie, Sommeil et Explorations Fonctionnelles Neuropédiatriques (ESEFNP) » department, Hospices Civils de Lyon, Bron, France.
- ²³Brain Dynamics and Cognition (DYCOG) Team, Lyon Neuroscience Research Centre, Lyon, France.
- ²⁴Cytogenetic department, Dijon university hospital, Dijon, France.
- ²⁵Dermatology department, Montpellier university hospital, Montpellier, France.
- ²⁶Medical genetic department, Montpellier university hospital, Montpellier, France.

*Authorship note: Authors contributed equally to this work.

Correspondence:

Pierre Vabres,

Centre de référence MAGEC Mosaïque,

Service de Dermatologie,

Centre Hospitalo-Universitaire Dijon Bourgogne,

14 rue Paul Gaffarel BP 77908,

21079 Dijon cedex,

France.

Phone: +33 3 80 29 33 36.

Fax: +33 3 80 29 30 28.

Email: pierre.vabres@chu-dijon.fr.

ABSTRACT

Hypomelanosis of Ito consists of hypopigmentation along Blaschko's lines, often associated with neurological features. Except for inconstant mosaic chromosomal anomalies, its genetic basis has long remained elusive. Germ line *MTOR* mutations have been reported in patients with Smith-Kingsmore syndrome. Mosaic *MTOR* mutations have been described in unrelated patients with hemimegalencephaly and linear pigmentation defects. Here we report on clinical, histological and ultrastructural features in 15 unrelated patients with mosaic *MTOR* post-zygotic mutations in their skin (variant allele fraction: 10 to 40%). All had Blaschko-linear or flag-like hypopigmentation, combined with epileptic seizures, macrocephaly, unilateral overgrowth, and variable intellectual disability. Cultured skin fibroblasts from a patient carrying a p.(Glu2419Lys) *MTOR* mutation showed constitutive activation of the PI3K-AKT pathway. A reduced number of epidermal melanocytes was found on biopsies from hypopigmented and pigmented skin in three patients. In two patients, transmission electron microscopy on hypopigmented skin showed a predominance of early stage I melanosomes in melanocytes and a reduced number of melanosomes in keratinocytes. A decrease in intrakeratinocytic melanosomes had previously been reported both in hypomelanosis of Ito and in hypochromic patches of tuberous sclerosis. In both conditions, the pigmentary phenotype appears to result from mTOR activation.

INTRODUCTION

Depigmentation along Blaschko's lines is the major feature of hypomelanosis of Ito (HI). Although in his initial description, Ito (Ito, 1952) did not report extracutaneous features, HI was later recognized as a neurocutaneous disorder, because of the frequency of brain involvement and epilepsy (Hamada et al., 1979; Pavone et al., 2015; Schwartz et al., 1977), as well as hemihypertrophy and additional development anomalies (Glover et al., 1989; Pascual-Castroviejo et al., 1998). It has also been recognized as a hallmark of mosaicism, because of numerous reports of non-recurrent mosaic

chromosomal anomalies (Sybert, 1994; Thomas et al., 1989). Hence, the denomination “Pigmentary mosaicism of the Ito type (or linear hypomelanosis in narrow bands)” has been suggested by Happle (Happle, 2014).

In contrast with chromosomal anomalies, few mosaic single-gene anomalies have been reported in pigmentary mosaicism so far. In the negative counterpart of HI, linear and whorled nevoid hypermelanosis, we have found mosaic mutations in the *KITLG* gene (Sorlin et al., 2017). Linear hypopigmentation has been reported in association with hemimegalencephaly and mosaic *MTOR* mutations (Mirzaa et al., 2016). The *MTOR* gene encodes the mechanistic target of rapamycin (mTOR), a highly conserved serine-threonine kinase and core component of the MTORC1 and MTORC2 complexes. The PI3K-AKT-mTOR signaling pathway is pivotal in cell growth, protein synthesis, autophagy, and cytoskeletal dynamics (Jacinto et al., 2004; Thoreen et al., 2012; Zoncu et al., 2011). Germline *MTOR* mutations have been reported in 28 patients with Smith-Kingsmore syndrome (OMIM #616638) (Supplementary Figure 1). This condition manifests as intellectual disability associated with macrocephaly, epileptic seizures and facial dysmorphism (mid-face hypoplasia, hypertelorism, downslanted palpebral fissures, depressed nasal bridge, thin upper lip, flat philtrum) (Gordo et al., 2018; Moosa et al., 2017; Rodríguez-García et al., 2019; Smith et al., 2013). Central nervous system abnormalities and ventriculomegaly can also be present. Somatic *MTOR* mutations have also been reported in 28 cases of isolated hemimegalencephaly (Supplementary Figure 1) (Baynam et al., 2015; D’Gama et al., 2015; EPI4K Consortium and Epilepsy Phenome/Genome project, 2013; Handoko et al., 2019; Lee et al., 2012; Lim et al., 2015; Mirzaa et al., 2016; Pelorosso et al., 2019; Smith et al., 2013). Only 12 subjects with either germline or postzygotic mutations had pigmentary features : café-au-lait spots, hypomelanosis of Ito, Blaschko-linear hyperpigmentation or cutis tricolor. *MTOR* mutations were detected in blood or buccal swab, but genetic testing was not routinely performed on skin biopsy (Supplementary table 1) (Baynam et al., 2015; Gordo et al., 2018; Handoko et al., 2019; Lee et al., 2012; Mirzaa et al., 2016; Pelorosso et

al., 2019).

To better characterize the genetic basis of hypomelanosis of Ito, we performed exome and targeted ultra-deep sequencing (TUDS) on fresh hypopigmented skin and blood-derived DNA in patients with hypomelanosis of Ito, brain or somatic overgrowth, and intellectual impairment or epilepsy, a clinical syndrome that had been recognized by several authors prior to reports of *MTOR* mutations, or subsequently (Supplementary Table 2)(Assogba et al., 2010; Auriemma et al., 2000; Battistella et al., 1990; Chapman and Cardenas, 2008; Cuddapah et al., 2015; Gordo et al., 2018; Handoko et al., 2019; Lee et al., 2012; Malherbe et al., 1993; Mirzaa et al., 2016; Okanari et al., 2014; Pelorosso et al., 2019; Peserico et al., 1988; Sharma et al., 2009; Steiner et al., 1996; Tagawa et al., 1994; Williams and Elster, 1990). Based on in-depth phenotyping, we now provide further delineation of the cutaneous and extracutaneous spectrum associated with *MTOR* post-zygotic mutations, including microscopic and ultra-structural features.

RESULTS

We studied 15 patients (10 females and 5 males) with skin segmental hypopigmentation phenotype including fourteen patients diagnosed with hypomelanosis of Ito defined as hypopigmentation along Blaschko's lines, and one patient with hypopigmented scalp hair and cutaneous flag-like patch, and heterochromia irides (Figure 1-2, Table 1). Intellectual disability is present in 80% of patients but with variable severity, epileptic seizures are frequently observed (67%), autistic-like behavior is observed in 4 patients an (Figure 2, Table 2). Macrocephaly is present in 67% of patients and body overgrowth in 53% without any sign of overgrowth syndrome (Figure 2, Table 1). Other features could also be noticeable (Figure 2, Table 3): Hypertelorism in 9/15 subjects, facial features as prominent forehead (11/15), depressed nasal bridge (8/15), downslanting palpebrale fissures (6/15). Diverse ocular defects are observed (8/13 patients assessed) as well as hair anomalies (4 subjects). Only two patients had hyperechogenic cortex observed after kidney ultrasounds. Psychomotor delay

is present but with variable presentation ranging from mild (walking age around 20 months) to severe (sitting age at 6 year-old).

In-depth whole-exome sequencing on DNA from a skin biopsy of a hypopigmented streak of affected individual PED1004 and blood-derived DNA from her unaffected parents (Supplementary Table 3) identified a *de novo* missense change of *MTOR* (c.7255G>A, encoding p.Glu2419Lys present in 21 of 74 reads (28%). The mutation was absent from public variant databases, found to affect a highly conserved nucleotide and amino acid, and predicted as likely deleterious *in silico*. Ultra-deep sequencing of the region spanning the c.7255G>A substitution in all tissue samples available from this subject confirmed the mutation in 29% of alleles from the skin sample. The variant was nearly undetectable (in less than 1% of reads) in blood, thus confirming its mosaic nature (Figure 3). In the fourteen additional unrelated subjects, targeted deep sequencing was performed on hypopigmented skin and blood DNA samples when available. In these patients, ten additional postzygotic *MTOR* substitutions were identified, encoding p.Lys1452Asn, p.Cys1483Tyr, p.Ala1519Val, p.Ala1519Thr, p.Glu1799Lys; p.Thr1977Ile, p.Ile2017Thr, p.Ser2413Ile, p.Leu2427Pro and p.Ile2501Phe with variable levels of mosaicism depending on the tissue tested (Figure 3 and Supplementary Table 4). *MTOR* pGlu1799Lys was found in two individuals, p.Thr1977Ile was found in three and p.Glu2419Lys substitution was found in two. Among all, five variations (p.Lys1452Asn, p.Ala1519Thr, p.Ala1519Val, p.Ile2017Thr, p.Ser2413Ile) have never been reported previously.

Identified *MTOR* mutations have been shown to increased mTOR activity. Indeed, previous mutagenesis studies of yeast mTOR orthologs have identified several activating mutations, including the p.Glu2419Lys and p.Ile2017Thr found our cohort of subjects. Both mutations result in constitutive mTOR complex 1 (mTORC1) activity *in vitro* and *in vivo* (Ohne et al., 2008; Urano et al., 2007; Wagle et al., 2014). Primary skin fibroblasts of PED1004 were used to test p.Glu2419Lys mTOR activity by assessing AKT and p70 ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) phosphorylation status (Keppler-Noreuil et al., 2015; Lindhurst et al., 2012) (Figure 4, Supplementary Figure 2).

Immunoblotting and ELISA experiments showed increased levels of phosphorylated AKT^{ser473} and p70S6K^{thr389} in mutant cells as compared to controls following amino acid deprivation, similar to skin fibroblasts from individuals with activating *PIK3CA* mutations and increased PI3K-AKT-mTOR signaling (Figure 4). However, in contrast to *PIK3CA* mutant lines, the p.Glu2419Lys mutant showed no constitutive activity in amino acid-rich conditions (Supplementary Figure 2). We found no significant differences in median cell diameter between mutant and control cells (Supplementary Figure 2). In comparison, fibroblasts harboring the p.Ala1519Val mutation did not exhibit increased phosphorylation at baseline, nor under amino acid deprivation, consistent with low-level mosaicism found in the primary culture (inferior to 1%).

Decreased in melanocyte number and maturation has been reported in TSC-hypochromic skin. In *MTOR* mutated subjects, comparison to control of Haematoxylin-eosin (HE) staining and Melan-A immuno-labeling on skin biopsies taken from pigmented and hypopigmented areas in patient PED1004, VK1 and VK2 indicates a lower number of melanocytes in patient skins compared to controls (Figure 5). Those cells could be positive to MITF labeling (PED1004) but absence of labeling could also be found (VK1 and VK2).

Ultra-structural studies using transmission electron microscopy (TEM) on dark and pale areas from subjects PED1004 and PED4820 indicates a maturity defect in melanosome differentiation in melanocytes (Figure 6) with an increased number of immature type I melanosomes in pale skin specimens. Determination of melanosome number in keratinocytes showed also a high decrease in hypopigmented skin of both patients tested.

DISCUSSION

Here we report mosaicism for activating *MTOR* mutations in a peculiar subset of patients with hypomelanosis of Ito. Our patients were characterized by brain overgrowth and a variable combination of features such as unilateral overgrowth, macrocephaly, ocular anomalies, intellectual

disability and epilepsy (**Table 2, 3**). This combination of features has previously been reported (**Supplementary Table 2**), but had not been recognized as a distinctive syndrome in the absence of a common underlying genetic basis. Although germline or somatic *MTOR* mutations have previously been reported in patients with epilepsy, isolated hemimegalencephaly, or focal cortical dysplasia (summarized in **Supplementary Table 1**) (Baynam et al., 2015; D’Gama et al., 2015; EPI4K Consortium and Epilepsy Phenome/Genome project, 2013; Lee et al., 2012; Lim et al., 2015; Smith et al., 2013), only twelve of them were also diagnosed with hypomelanosis of Ito, without further clinical description (Baynam et al., 2015; Gordo et al., 2018; Lee et al., 2012). Brain overgrowth, particularly hemimegalencephaly, is a hallmark of this subtype of hypomelanosis of Ito. Brain overgrowth can also result – among others – from mosaic activating mutations in *PIK3CA* or *AKT3*, additional core components of the PI3K-AKT-mTOR pathway (Conti et al., 2015; Kuentz et al., 2017; Lee et al., 2012; Poduri et al., 2012; Rivière et al., 2012). However, *MTOR*-related hemimegalencephaly appears clinically recognizable and distinct from *PIK3CA*- and *AKT3*-related subtypes, since cortical dysplasia or polymicrogyria were absent in our patients (**Supplementary Figure 3**), whereas they are hallmarks of hemimegalencephaly caused by *PIK3CA* or *AKT3* alterations. (Paragraphe à ajouter par Cyril) sur difference germline mosaïque.

Linear hypopigmentation has been considered as a non-specific manifestation of mosaicism, hence the currently accepted denomination of "pigmentary mosaicism". It has even been suggested that the term hypomelanosis of Ito should be abandoned (Happle, 2014; Sybert, 1994), since it could not previously be assigned to a single gene defect. However, our results suggest that at least this overgrowth-associated subtype is a well-defined mTOR-related single gene entity, for which the denomination hypomelanosis of Ito could still apply. We consider it as clinically and pathophysiologically relevant, since cutaneous hypomelanosis likely results directly from mTOR hyperactivation. Several *in vitro* studies of melanoma cell lines and mice models have shown that

activation of mTOR results in suppression of melanogenesis in Tuberous Sclerosis (Buscà et al., 1996; Ho et al., 2011; Jeong et al., 2011; Ohguchi et al., 2005; Yang et al., 2018a, 2018b). Clinically, ash-leaf or confetti-like hypopigmented macules are specific findings in TSC, a condition resulting from loss of function of *TSC1* or *TSC2*, upstream inhibitors of mTOR (Józwiak and Galus, 2008). In addition, mTOR inhibition with topical rapamycin has resulted in repigmentation of hypomelanotic macules in TSC (Wataya-Kaneda et al., 2015). This results in induction of melanogenesis through upregulation of MITF and its downstream targets, namely tyrosinase, TRP1, and TRP2 (Buscà et al., 1996; Ho et al., 2011; Jeong et al., 2011; Ohguchi et al., 2005; Yang et al., 2018a). Our findings of activating *MTOR* mutations and increased AKT and p70S6K phosphorylation in dermal fibroblasts are consistent with direct involvement of mTOR upregulation in defective melanogenesis in hypomelanosis of Ito. Skin biopsies evaluation using histological and ultrastructural studies found out a decrease in melanocytes numbers, a defect in the maturation process of melanosomes in melanocytes and therefore a lower number of melanosomes in keratinocytes. This further supports the role of mTOR as a negative regulator of melanogenesis. Interestingly, pigmented skin biopsies from patients didn't shown a normal pattern. Indded genotyping of hyperpigmented skin in one patient from our cohort shown 25% of mutation whereas hypipigmented skin only 10% of mutation pointing out that mutated cells might encountered cell death in pale areas, maybe through autophagy process as shown recently in TSC (Yang et al., 2018a). This is reinforces by immunohistological studies of dark skin biopsies from PED1004, where a lower number of melanocyte was found (Figure 5).

Our results highlight the value of fine clinical phenotyping of mosaic syndromes and allow us to conclude that hypomelanosis of Ito should no longer be considered only as a manifestation of chromosomal mosaicism, although other genetic defects remain to be identified in a number of patients with nevus depigmentosus and various associated manifestations. Identification of mosaic *MTOR* mutations in hypomelanosis of defines a clinical and molecular entity, with direct implications

for genetic diagnosis. DNA from the skin or other affected tissues is required for genetic testing purposes, since we observed much lower levels of mosaicism in blood as compared with skin. Last, clinical consequences of mTOR upregulation may be amenable to tailored treatment with mTOR inhibitors.

MATERIALS AND METHODS

Study subjects

The study included fifteen unrelated affected individuals. Informed consent was obtained from all subjects and participating family members. The study was approved by the Ethics Research Committee of Dijon University Hospital. Individuals were diagnosed and recruited by geneticists and dermatologists in Dijon and elsewhere in France, through a collaborative nationwide effort for identification of genes involved in cutaneous mosaic syndromes. Genomic DNA was extracted from blood, biopsies of hypopigmented skin, cultured skin fibroblasts, buccal swabs and saliva specimens using Genra Puregene kits (Qiagen) according to the manufacturer's protocol.

Exome sequencing

Exome capture and sequencing were performed at the Centre National de Génotypage (CNG), Evry, France, from 3 µg of genomic DNA per individual. Samples included skin-derived DNA from a hypopigmented region in subject PED1004, and blood-derived DNA from her unaffected parents. Targeted regions were captured using the SureSelect Human All Exon V5 kit (Agilent) according to the manufacturer's recommendations. Sequencing of paired-end 100-bp reads was carried out on a HiSeq 2000 (Illumina). In-depth whole-exome sequencing of the index subject was performed to achieve a sequencing depth of 100 reads or more for at least 80% of RefSeq coding exons (Supplementary Table 2). Reads were aligned to the human genome reference sequence (GRCh37/hg19 build of UCSC Genome Browser, <http://genome.ucsc.edu/>) with the Burrows-Wheeler Aligner (BWA, v.0.6.2) (Li and Durbin, 2009). Duplicate paired-end reads were marked with Picard v.1.77 (<http://picard.sourceforge.net/>). The Genome Analysis Toolkit (GATK) v.2.6-4 was used for base quality score recalibration, indel realignment, and variant discovery (DePristo et al., 2011). Variants were annotated with SeattleSeq SNP Annotation (<http://snp.gs.washington.edu/SeattleSeqAnnotation138/>). Candidate *de novo* events were

systematically identified by focusing on protein-altering and splice-site variants present at a frequency less than 1% in dbSNP 141 (dbSNP: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), absent from 50 local exomes of unrelated normal individuals, and supported by at least two reads in the index subject and absent in both parents (less than two variant reads) at base-pair positions covered by at least four reads in the entire trio.

Targeted deep sequencing

All 57 coding regions of *MTOR* (reference accession LRG_734_t1) were amplified using custom intronic primers and standard long-range PCR protocols (primer sequences are listed in **Supplementary Table 5**). PCR products were purified and libraries were prepared using the transposase-based Nextera XT DNA Sample Preparation kit (Illumina). Samples were then pooled and sequenced on a MiSeq instrument (Illumina) according to the manufacturer's recommendations for paired-end 150-bp reads. In-depth sequencing was performed to achieve a sequencing depth of at least 100 reads for all coding bases and splice junctions of *MTOR*. Identification of candidate variants was performed as described previously (Rivière et al., 2012). Briefly, all coding and splice-site bases of *MTOR* were systematically screened to count all sites with at least one read not matching the reference sequence, using a base-quality threshold of 30 and a mapping quality threshold of 20. All candidate postzygotic variants were confirmed by at least one independent experiment in all DNA samples available from the affected individual.

Variant databases and *in silico* predictions

We assessed the presence of the identified *MTOR* variants in several public variant databases, namely dbSNP 141, the Genome Aggregation Database (Gnomad, <http://gnomad.broadinstitute.org/>) and the Catalogue of somatic mutations in cancer (COSMIC, <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>). Nucleotide-level conservation and

impact of amino acid substitutions were assessed using Genomic Evolutionary Rate Profiling (GERP), Polyphen-2 (HumVar-trained model), and Combined Annotation-Dependent Depletion (CADD) scores (Adzhubei et al., 2010; Cooper et al., 2005; Kircher et al., 2014). All prediction scores are listed in Supplementary Table 3.

Analysis of skin fibroblasts

Skin fibroblasts were obtained from a skin biopsy of subjects PED1004 and PED2094 using standard procedures (Villegas and McPhaul, 2005). Genomic DNA was extracted to verify the presence of the postzygotic c.7255G>A (encoding p.Glu2419Lys) and c.4556C>T substitutions (encoding p.Ala1519Val) in respective cultured cells. Exons 31 and 53 of *MTOR* were amplified by standard PCR using custom intronic primers. Sanger sequencing was performed with the ABI BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (v.3.1) and an ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Targeted deep sequencing was carried out as described above.

Cell culture methods and amino acid deprivation protocol

Skin fibroblasts described above, wild type controls and subjects with confirmed mosaic *PIK3CA* mutations with subject ID, *PIK3CA* variant and respective mutation burden; M020 (p.Gly1049Arg 40%), M098 (p.Gly418Lys 32%), M018 (p.Gln546Lys 40%) and M032 (p.His1047Arg 30%) were used in the experiments. Cells were maintained at 37°C in a humidified incubator in DMEM supplemented with 10% FBS, 1,000 u/l penicillin, 0.1 g/l streptomycin, and 2 mmol/l L-glutamine. Amino acid deprivation studies were conducted according to a previously described method (Bar-Peled et al., 2013; Lindhurst et al., 2012). In brief, cells were serum-starved in medium supplemented with 1% bovine serum albumin (BSA) for 16 hours and then washed in warmed PBS prior to incubation for 50 minutes in glucose-containing RPMI medium (Sigma Aldrich, UK) with or without amino acid supplementation (Sigma Aldrich, UK). Finally, cells were washed twice in PBS prior to

harvesting.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Using a direct ELISA assay kit (InstantOne®, eBioscience, Cambridge, UK) according to the manufacturer's instructions the degree of phosphorylation of AKT at residue 473 was evaluated. Results were expressed relative to control levels and pooled; statistical analysis was performed using one-way ANOVA with Tukey's post-hoc analyses.

Immunoblotting

Immunoblotting was used to assess phosphorylation of p70S6K at residue 389. Antibodies Calnexin (#2679) and p70S6Kthr389 (#9234) were purchased from Cell Signalling Technology.

Cell size determination

Skin fibroblasts were incubated with or without amino acids and then trypsinised and re-suspended in PBS containing 10% fetal calf serum, 25 mmol/l HEPES and 1 mmol/l EDTA. Cell size was analyzed using an MS3 multi-sizer (Beckmann-Coulter). Ten thousand cells were counted in each run.

Histological studies

Immunohistochemical and immunofluorescence studies were performed on paraffin-embedded skin biopsies from PED1004 (hypopigmented area and adjacent normal-appearing skin), VK1 and VK2 hypopigmented skin and two control samples. Primary antibodies used included mouse monoclonal anti-MITF (Leica, #NCL-L-MITF, 1:500) and mouse monoclonal anti-MelanA (1:200; ab731; Abcam). Antigen retrieval with Tris-EDTA buffer pH9 and an endogenous peroxidase inhibition with H₂O₂ were followed by BSA3% saturation and labelling. Revelation was made with Novolink

Polymer Detection Systems (Leica, RE7140-CE).

Ultrastructural studies

Skin biopsies from PED1004 and PED4820 were fixed for 48h at 4°C in 2.5% glutaraldéhyde (EMS) in Sorensen phosphate buffer (0.1M, pH 7.3). Samples were prepared following standard procedures (Ref demander à Emmanuelle). Ultrafine sections (120 nm-thick) were observed on a JEOL JEM-1011 transmission electron microscope (JEOL) operating at 80 kV and pictures taken using a ES1000W Erlangshen CCD camera (GATAN).

CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank the subjects and families involved in the study, the Centre National de Génotypage (CNG, Evry, France) for the whole-exome sequencing experiments, the University of Burgundy Centre de Calcul (CCuB) for technical support and management of the informatics platform, the Centre de Ressources Biologiques (CRB) Ferdinand Cabanne for collection and conservation of skin fibroblasts, and all investigators of the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) National Mosaïque (coordinated by P.V.) for patient recruitment. A full list of investigators is provided in **Supplementary Note**. We would like to thank the Exome Aggregation Consortium and the groups that provided exome variant data for comparison. A full list of contributing groups can be found at <http://exac.broadinstitute.org/about/>.

This work was funded by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-PDOC-0029 to J.-B.R), the Groupe Interrégional de Recherche Clinique et d'Innovation (GIRCI) Est (to J.-B.R), the

Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) National (to P.V.), and the Société Française de Dermatologie (to P.V.). R.K.S. and V.E.R.P. are supported by the Wellcome Trust (Senior Research Fellowship in Clinical Science 098498/Z/12/Z and Clinical Research Training Fellowship 097721/Z/11/Z, respectively), and R.K.S., V.E.R.P. and R.G.K. are supported by the UK National Institute for Health Research (NIHR) Cambridge Biomedical Research Centre, and by the UK Medical Research Council Centre for Obesity and Related Metabolic Diseases. V.E.R.P. is supported by the Sackler fund.

REFERENCES

- Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S., and Sunyaev, S.R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7, 248–249.
- Assogba, K., Ferlazzo, E., Striano, P., Calarese, T., Villeneuve, N., Ivanov, I., Bramanti, P., Sessa, E., Pacheva, I., and Genton, P. (2010). Heterogeneous seizure manifestations in Hypomelanosis of Ito: report of four new cases and review of the literature. *Neurological Sciences* 31, 9–16.
- Auriemma, A., Agostinis, C., Bianchi, P., Bellan, C., Salvoni, L., Manara, O., and Colombo, A. (2000). Hemimegalencephaly in hypomelanosis of Ito: early sonographic pattern and peculiar MR findings in a newborn. *European Journal of Ultrasound* 12, 61–67.
- Bar-Peled, L., Chantranupong, L., Cherniack, A.D., Chen, W.W., Ottina, K.A., Grabiner, B.C., Spear, E.D., Carter, S.L., Meyerson, M., and Sabatini, D.M. (2013). A tumor suppressor complex with GAP activity for the Rag GTPases that signal amino acid sufficiency to mTORC1. *Science* 340, 1100–1106.
- Battistella, P.A., Peserico, A., Bertoli, P., Drigo, P., Laverda, A.M., and Casara, G.L. (1990). Hypomelanosis of Ito and hemimegalencephaly. *Childs Nerv Syst* 6, 421–423.
- Baynam, G., Overkov, A., Davis, M., Mina, K., Schofield, L., Allcock, R., Laing, N., Cook, M., Dawkins, H., and Goldblatt, J. (2015). A germline MTOR mutation in Aboriginal Australian siblings with intellectual disability, dysmorphism, macrocephaly, and small thoraces. *American Journal of Medical Genetics Part A* 167, 1659–1667.
- Buscà, R., Bertolotto, C., Ortonne, J.-P., and Ballotti, R. (1996). Inhibition of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/p70S6-Kinase Pathway Induces B16 Melanoma Cell Differentiation. *J. Biol. Chem.* 271, 31824–31830.
- Chapman, K., and Cardenas, J.F. (2008). Hemimegalencephaly in a Patient With a Neurocutaneous Syndrome. *Seminars in Pediatric Neurology* 15, 190–193.
- Conti, V., Pantaleo, M., Barba, C., Baroni, G., Mei, D., Buccoliero, A.M., Giglio, S., Giordano, F., Baek, S.T., Gleeson, J.G., et al. (2015). Focal dysplasia of the cerebral cortex and infantile spasms associated with somatic 1q21.1-q44 duplication including the AKT3 gene. *Clinical Genetics* 88, 241–247.
- Cooper, G.M., Stone, E.A., Asimenos, G., Green, E.D., Batzoglou, S., and Sidow, A. (2005). Distribution and intensity of constraint in mammalian genomic sequence. *Genome Res* 15, 901–913.
- Cuddapah, V.A., Thompson, M., Blount, J., Li, R., Guleria, S., and Goyal, M. (2015). Hemispherectomy for

Hemimegalencephaly Due to Tuberous Sclerosis and a Review of the Literature. *Pediatric Neurology* 53, 452–455.

DePristo, M.A., Banks, E., Poplin, R.E., Garimella, K.V., Maguire, J.R., Hartl, C., Philippakis, A.A., del Angel, G., Rivas, M.A., Hanna, M., et al. (2011). A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet* 43, 491–498.

D’Gama, A.M., Geng, Y., Couto, J.A., Martin, B., Boyle, E.A., LaCoursiere, C.M., Hossain, A., Hatem, N.E., Barry, B., Kwiatkowski, D.J., et al. (2015). mTOR Pathway Mutations Cause Hemimegalencephaly and Focal Cortical Dysplasia. *Ann Neurol* 77, 720–725.

EPI4K Consortium, and Epilepsy Phenome/Genome project (2013). De novo mutations in the classic epileptic encephalopathies. *Nature* 501, 217–221.

Glover, M.T., Brett, E.M., and Atherton, D.J. (1989). Hypomelanosis of ito: Spectrum of the disease. *The Journal of Pediatrics* 115, 75–80.

Gordo, G., Tenorio, J., Arias, P., Santos-Simarro, F., García-Miñaur, S., Moreno, J.C., Nevado, J., Vallespin, E., Rodriguez-Laguna, L., Mena, R. de, et al. (2018). mTOR mutations in Smith-Kingsmore syndrome: Four additional patients and a review. *Clinical Genetics* 93, 762–775.

Hamada, K., Tanaka, T., Ohdo, S., Hayakawa, K., Kikuchi, I., and Katsuya, H. (1979). Incontinentia pigmenti achromians as part of a neurocutaneous syndrome: A case report. *Brain and Development* 1, 313–317.

Handoko, M., Emrick, L.T., Rosenfeld, J.A., Wang, X., Tran, A.A., Turner, A., Belmont, J.W., Lee, B.H., Bacino, C.A., and Chao, H.-T. (2019). Recurrent mosaic MTOR c.5930C > T (p.Thr1977Ile) variant causing megalencephaly, asymmetric polymicrogyria, and cutaneous pigmentary mosaicism: Case report and review of the literature. *Am J Med Genet A* 179, 475–479.

Happle, R. (2014). *Mosaicism in human skin: Understanding nevi, nevoid skin disorders, and cutaneous neoplasia*. Springer-Verlag.

Ho, H., Kapadia, R., Al-Tahan, S., Ahmad, S., and Ganesan, A.K. (2011). WIP1 Coordinates Melanogenic Gene Transcription and Melanosome Formation via TORC1 Inhibition. *J Biol Chem* 286, 12509–12523.

Ito, M. (1952). Incontinentia pigmenti achrominans. A singular case of nevus depigmentosus systematicus bilateralis.

Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Ruegg, M.A., Hall, A., and Hall, M.N. (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature Cell Biology* 6, 1122–1128.

Jeong, H.-S., Lee, S.H., Yun, H.-Y., Baek, K.J., Kwon, N.S., Park, K.-C., and Kim, D.-S. (2011). Involvement of mTOR signaling in sphingosylphosphorylcholine-induced hypopigmentation effects. *J Biomed Sci* 18, 55.

Józwiaik, J., and Galus, R. (2008). Molecular Implications of Skin Lesions in Tuberous Sclerosis. *The American Journal of Dermatopathology* 30, 256.

Keppler-Noreuil, K.M., Rios, J.J., Parker, V.E.R., Semple, R.K., Lindhurst, M.J., Sapp, J.C., Alomari, A., Ezaki, M., Dobyns, W., and Biesecker, L.G. (2015). PIK3CA-Related Overgrowth Spectrum (PROS): Diagnostic and Testing Eligibility Criteria, Differential Diagnosis, and Evaluation. *Am J Med Genet A* 0, 287–295.

Kircher, M., Witten, D.M., Jain, P., O’Roak, B.J., Cooper, G.M., and Shendure, J. (2014). A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet* 46, 310–315.

Kuentz, P., St-Onge, J., Duffourd, Y., Courcet, J.-B., Carmignac, V., Jouan, T., Sorlin, A., Abasq-Thomas, C., Albuisson, J., Amiel, J., et al. (2017). Molecular diagnosis of PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS) in 162 patients and recommendations for genetic testing. *Genetics in Medicine* 19, 989–997.

Lee, J.H., Huynh, M., Silhavy, J.L., Kim, S., Dixon-Salazar, T., Heiberg, A., Scott, E., Bafna, V., Hill, K.J., Collazo, A., et al. (2012). De novo somatic mutations in components of the PI3K-AKT3-mTOR pathway cause hemimegalencephaly. *Nat Genet* 44, 941–945.

- Li, H., and Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754–1760.
- Lim, J.S., Kim, W., Kang, H.-C., Kim, S.H., Park, A.H., Park, E.K., Cho, Y.-W., Kim, S., Kim, H.M., Kim, J.A., et al. (2015). Brain somatic mutations in MTOR cause focal cortical dysplasia type II leading to intractable epilepsy. *Nature Medicine* 21, 395–400.
- Lindhurst, M.J., Parker, V.E., Payne, F., Sapp, J.C., Rudge, S., Harris, J., Witkowski, A.M., Zhang, Q., Groeneveld, M.P., Scott, C.E., et al. (2012). Mosaic Overgrowth with Fibroadipose Hyperplasia is Caused by Somatic Activating Mutations in PIK3CA. *Nat Genet* 44, 928–933.
- Malherbe, V., Pariente, D., Tardieu, M., Lacroix, C., Venencie, P.Y., Hibon, D., Vedrenne, J., and Landrieu, P. (1993). Central nervous system lesions in hypomelanosis of Ito: an MRI and pathological study. *J. Neurol.* 240, 302–304.
- Mirzaa, G.M., Campbell, C.D., Solovieff, N., Goold, C., Jansen, L.A., Menon, S., Timms, A.E., Conti, V., Biag, J.D., Adams, C., et al. (2016). Wide spectrum of developmental brain disorders from megalencephaly to focal cortical dysplasia and pigmentary mosaicism caused by mutations of MTOR. *JAMA Neurol* 73, 836–845.
- Moosa, S., Böhler-Rabel, H., Altmüller, J., Beleggia, F., Nürnberg, P., Li, Y., Yigit, G., and Wollnik, B. (2017). Smith–Kingsmore syndrome: A third family with the MTOR mutation c.5395G>A p.(Glu1799Lys) and evidence for paternal gonadal mosaicism. *American Journal of Medical Genetics Part A* 173, 264–267.
- Ohguchi, K., Banno, Y., Nakagawa, Y., Akao, Y., and Nozawa, Y. (2005). Negative regulation of melanogenesis by phospholipase D1 through mTOR/p70 S6 kinase 1 signaling in mouse B16 melanoma cells. *Journal of Cellular Physiology* 205, 444–451.
- Ohne, Y., Takahara, T., Hatakeyama, R., Matsuzaki, T., Noda, M., Mizushima, N., and Maeda, T. (2008). Isolation of Hyperactive Mutants of Mammalian Target of Rapamycin. *Journal of Biological Chemistry* 283, 31861–31870.
- Okanari, K., Miyahara, H., Itoh, M., Takahashi, A., Aizaki, K., Nakagawa, E., Otsuki, T., and Izumi, T. (2014). Hemimegalencephaly in a Patient With Coexisting Trisomy 21 and Hypomelanosis of Ito. *J Child Neurol* 29, 415–420.
- Pascual-Castroviejo, I., Roche, C., Martinez-Bermejo, A., Arcas, J., Lopez-Martin, V., Tendero, A., Esquiroz, J.L.H., and Pascual-Pascual, S.-I. (1998). Hypomelanosis of ITO. A study of 76 infantile cases. *Brain and Development* 20, 36–43.
- Pavone, P., Praticò, A.D., Ruggieri, M., and Falsaperla, R. (2015). Hypomelanosis of Ito: a round on the frequency and type of epileptic complications. *Neurological Sciences* 36, 1173–1180.
- Pelorusso, C., Watrin, F., Conti, V., Buhler, E., Gelot, A., Yang, X., Mei, D., McEvoy-Venneri, J., Manent, J.-B., Cetica, V., et al. (2019). Somatic double-hit in MTOR and RPS6 in hemimegalencephaly with intractable epilepsy. *Hum. Mol. Genet.*
- Peserico, A., Battistella, P.A., Bertoli, P., and Drigo, P. (1988). Unilateral Hypomelanosis of Ito with Hemimegalencephaly. *Acta Paediatrica* 77, 446–447.
- Poduri, A., Evrony, G.D., Cai, X., Elhosary, P.C., Beroukhi, R., Lehtinen, M.K., Hills, L.B., Heinzen, E.L., Hill, A., Hill, R.S., et al. (2012). Somatic Activation of AKT3 Causes Hemispheric Developmental Brain Malformations. *Neuron* 74, 41–48.
- Rivière, J.-B., Mirzaa, G.M., O’Roak, B.J., Beddaoui, M., Alcantara, D., Conway, R.L., St-Onge, J., Schwartzentruber, J.A., Gripp, K.W., Nikkel, S.M., et al. (2012). De novo germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. *Nat Genet* 44, 934–940.
- Rodríguez-García, M.E., Cotrina-Vinagre, F.J., Bellusci, M., Aragón, A.M. de, Hernández-Sánchez, L., Carnicero-Rodríguez, P., Martín-Hernández, E., and Martínez-Azorín, F. (2019). A novel de novo MTOR gain-of-function variant in a patient with Smith-Kingsmore syndrome and Antiphospholipid syndrome. *Eur J Hum Genet* 27, 1369–1378.
- Schwartz, M.F., Esterly, N.B., Fretzin, D.F., Pergament, E., and Rozenfeld, I.H. (1977). Hypomelanosis of Ito (incontinentia pigmenti achromians): A neurocutaneous syndrome. *The Journal of Pediatrics* 90, 236–240.

- Sharma, S., Sankhyan, N., Kabra, M., and Kumar, A. (2009). Hypomelanosis of Ito with hemimegalencephaly. *Dermatol. Online J.* *15*, 12.
- Smith, L., Saunders, C.J., Dinwiddie, D.L., Atherton, A.M., Miller, N.A., Soden, S.E., Farrow, E.G., Abdelmoity, A.T.G., and Kingsmore, S.F. (2013). Exome Sequencing Reveals De Novo Germline Mutation of the Mammalian Target of Rapamycin (MTOR) in a Patient with Megalencephaly and Intractable Seizures. *Journal of Genomes and Exomes* *2*, 63–72.
- Sorlin, A., Maruani, A., Aubriot-Lorton, M.-H., Kuentz, P., Duffourd, Y., Teysseire, S., Carmignac, V., St-Onge, J., Chevarin, M., Jouan, T., et al. (2017). Mosaicism for a KITLG Mutation in Linear and Whorled Nevroid Hypermelanosis. *Journal of Investigative Dermatology* *137*, 1575–1578.
- Steiner, J., Adamsbaum, C., Desguerres, I., Lalande, G., Raynaud, F., Ponsot, G., and Kalifa, G. (1996). Hypomelanosis of Ito and brain abnormalities: MRI findings and literature review. *Pediatr Radiol* *26*, 763–768.
- Sybert, V.P. (1994). Hypomelanosis of Ito: A Description, Not a Diagnosis. *Journal of Investigative Dermatology* *103*, S141–S143.
- Tagawa, T., Otani, K., Futagi, Y., Arai, H., Mushiake, S., Nakayama, M., and Morita, Y. (1994). [Hypomelanosis of Ito associated with hemimegalencephaly]. *No To Hattatsu* *26*, 518–521.
- Thomas, I.T., Frias, J.L., Cantu, E.S., Lafer, C.Z., Flannery, D.B., and Graham, J.G. (1989). Association of pigmentary anomalies with chromosomal and genetic mosaicism and chimerism. *Am J Hum Genet* *45*, 193–205.
- Thoreen, C.C., Chantranupong, L., Keys, H.R., Wang, T., Gray, N.S., and Sabatini, D.M. (2012). A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature* *485*, 109–113.
- Urano, J., Sato, T., Matsuo, T., Otsubo, Y., Yamamoto, M., and Tamanoi, F. (2007). Point mutations in TOR confer Rheb-independent growth in fission yeast and nutrient-independent mammalian TOR signaling in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 3514–3519.
- Villegas, J., and McPhaul, M. (2005). Establishment and Culture of Human Skin Fibroblasts. *Current Protocols in Molecular Biology* *71*, 28.3.1-28.3.9.
- Wagle, N., Grabiner, B.C., Van Allen, E.M., Hodis, E., Jacobus, S., Supko, J.G., Stewart, M., Choueiri, T.K., Gandhi, L., Cleary, J.M., et al. (2014). Activating mTOR mutations in a patient with an extraordinary response on a phase I trial of everolimus and pazopanib. *Cancer Discov* *4*, 546–553.
- Wataya-Kaneda, M., Tanaka, M., Yang, L., Yang, F., Tsuruta, D., Nakamura, A., Matsumoto, S., Hamasaki, T., Tanemura, A., and Katayama, I. (2015). Clinical and Histologic Analysis of the Efficacy of Topical Rapamycin Therapy Against Hypomelanotic Macules in Tuberous Sclerosis Complex. *JAMA Dermatol* *151*, 722–730.
- Williams, D.W., and Elster, A.D. (1990). Cranial MR imaging in hypomelanosis of Ito. *J Comput Assist Tomogr* *14*, 981–983.
- Yang, F., Yang, L., Wataya-Kaneda, M., Hasegawa, J., Yoshimori, T., Tanemura, A., Tsuruta, D., and Katayama, I. (2018a). Dysregulation of autophagy in melanocytes contributes to hypopigmented macules in tuberous sclerosis complex. *Journal of Dermatological Science* *89*, 155–164.
- Yang, F., Yang, L., Wataya-Kaneda, M., Yoshimura, T., Tanemura, A., and Katayama, I. (2018b). Uncoupling of ER/Mitochondrial Oxidative Stress in mTORC1 Hyperactivation-Associated Skin Hypopigmentation. *Journal of Investigative Dermatology* *138*, 669–678.
- Zoncu, R., Sabatini, D.M., and Efeyan, A. (2011). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* *12*, 21–35.

Table 1. Skin features and growth parameters of the fifteen affected individuals with *MTOR* mutations.

Patient ID	PED1979	PED5185	PED2094	PED5389	VK1	VK2	PED5125	PED1885	PED4336	PED2097	PED4820	PED1004	PED2153	PED4321	PED3155
Nevus depigmentosus	Linear	Linear	Linear	Linear	Linear	Linear	Linear	Linear	Linear	Flag-like	Linear	Linear	Linear	Linear	Linear
	Back R dorsal LL	R side	Arm (L)	LL (L), shoulder (R)	Extensive arms, trunk, legs	Extensive arms, trunk, legs	LL (R, external, posterior sides)	Trunk, back, 4 limbs	Trunk, back, limbs	Shoulder (L), R side, scalp hair patch	R side: trunk, back, groin	L side: abdomen, leg, arm	Trunk (R)	Arm (R), back (R)	L side (trunk, back and limbs)
Heterochromia irides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ (R)	-	-	-	-	+ (L)
Unilateral overgrowth	LL length	Right	-	-	-	-	-	LL Length	Right	LL length	-	Left	-	-	-
Macrocephaly	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+

R: right; L: left; LL: Lower limb; OFC, occipito-frontal circumference; SD, standard deviation; WM, white matter; NA, not available

Table 2: Neurological involvement in the fifteen affected individuals.

Patient ID		PED197 9	PED518 5	PED209 4	PED538 9	VK 1	VK 2	PED512 5	PED188 5	PED433 6	PED209 7	PED482 0	PED100 4	PED215 3	PED432 1	PED3155
Age* (Y)		12	3	27	7	3	6	9	4	2,5	2,5	7	14	5,5	1	30
Neurologic al signs	Epilepsy	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
	ID	+	+	++	-	-	++	-	+++	+	++	+++	+++	+++	+	+++
	ASD	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
Brain MRI	Thick cerebral cortex	0	0	0		0	0	0	ND	0	+	0	+	0	0	0
	Increased WM volume	0	0	+		0	0	0	ND	0	+	0	+	0	0	0
	Thick Corpus callosum	+	0	0		0	0	0	ND	0	0	0	+L	0	0	0
	Altered ventricle shape	0	+	+		0	0	0	ND	+	+	0	+	0	+	Para-ventricular cysts
	Segmental enlargement cerebral /cerebellar hemisphere	0	+	0		0	0	0	ND	+	+R	0	+L	0	0	0

* :at last examination, Y: year, ID: intellectual disability, ASD: autistic spectrum disorder; WM:white matter; ND: not determined; R: right; L:Left.

Table 3: Psychomotor development, facial features and renal involvement in the fifteen subjects.

Patient ID	PED1979	PED5185	PED2094	PED5389	VK1	VK2	PED5125	PED1885	PED4336	PED2097	PED4820	PED1004	PED2153	PED4321	PED3155
Age *(Y)	12	3	27	7	3	6	9	4	2,5	2,5	7	14	5,5	1	30
Psychomotor delay	+	+++	+	-	-	++	-	+++	+	+	++	+++	++	++	+
Distal joint hyperlaxity	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-
Hypertelorism	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-
Downslanting palpebrales fissures	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Depressed nasal bridge	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-
Scalp hair	Woolly	Curly	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sparse	Woolly	-
Anteverted nares	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
Teeth malposition	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
High forehead	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Frontal bossing	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-
Other dysmorphic facial features	Low hair line, microstomia	Thick upper lip, epicanthus	Synophris, low hair line, dysplastic ears	Long philtrum, thin upper lip	Sandal gap	Facial asymetry	-	Telecantus epicanthus	-	-	Thick upper lip, high-arched palate	-	-	-	-
Ocular anomalies	ND	Suspected	S	H	-	-	-	S, H, amblyopia	A, myopia	Coloboma	ND	RP	-	-	Left partial cataract
Nephromegaly	-	-	ND	ND	-	-	-	ND	-	Right	-	-	-	-	-
Hyperchogenic cortex	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-	+	-	+	-	-	-

* at last examination ; ND : not determined ; Y : year; S: strabismus; H: hypermetropia; A:astigmatism; RP: Retinitis pigmentosa

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Pigmentary phenotype in two patients. (a, b) PED 4820 Abdomen. (a) Unilateral linear and whorled hypopigmentation in multiple large bands with ragged border and sharp midline limitation. **(b)** Wood's lamp illumination (enhanced contrast). **(c) PED1004 left leg. (d)** Wood's lamp illumination (enhanced contrast) of PED1004 left arm.

Figure 2. Clinical features distribution in *MTOR* affected individuals. (a) Histogram of number of patients with remarkable neurological and overgrowth signs. **(b)** Dot plot of standard deviations representing OFC in dark grey and height in light grey. **(c)** Histogram of number of patient presenting with recurrent features. Percentage is calculated to number of patients with available data. Ocular anomalies include strabismus, hypermetropia, myopia, coloboma, amblyopia or retinitis pigmentosa; Hair anomalies include woolly, curly or sparse hair. # data missing in two patients, * data missing in three patients, □ data missing in four patients.

Figure 3. Distribution of post-zygotic mTOR variations. Mutant allele frequencies of mosaic *MTOR* mutations based on targeted deep sequencing of *MTOR* coding regions in skin and blood DNA samples from affected individuals. Circle represents one allele with wild type allelic fraction in white and variation in black. Variation details are summarized in **Supplementary Table 4**. HEAT repeats: huntingtin, elongation factor 3, a subunit of protein phosphatase 2A, and TOR1; FAT: FRAP, ATM and TRRAP domain; FRB: FKBP12-rapamycin binding (FRB) domain; Kinase: serine-threonine kinase kinase domain; FATC: FAT, FRAP, ATM and TRRAP carboxy-terminal domain; FIT: Found in TOR domain; PS: pigmented skin; HPS: hypo-pigmented skin; B: blood.

Figure 4. Evaluation of AKT^{ser473} and p70S6K^{thr389} phosphorylation in *MTOR* mutant cell

lines following amino acid deprivation. (a) ELISA based evaluation of AKT^{ser473} phosphorylation following 50 minutes of amino acid deprivation in wild type control dermal fibroblasts (Ctrls, n=3), *PIK3CA* mutant fibroblast cell lines (n=4 with respective mutation burdens; M020 [p.G1049R 40%], M098 [p.E418K 32%], M018 [p.Q546K 40%] and M032 [p.H1047R 30%]) and *MTOR* mutant fibroblast cell lines p.E2419K (40% mutation burden) and p.A1519K (<1% mutation burden). Skin fibroblasts from patients with *PIK3CA* mutations were used as positive controls. Data is pooled from three independent experiments and error bars represent standard error of the mean (SEM). **** p < 0.0001 One-way ANOVA, Tukey's post-hoc analyses. **(b)** Western blot of p70S6K phosphorylation with or without 50 minutes of amino acid deprivation of control wild type cells (C1-C3), a *PIK3CA* mutant cell line (M18, p.Q546K 40%) and two *MTOR* mutant cell lines (p.E2419K and p.A1519V). Representative of four independent experiments; calnexin has been used as a loading control.

Figure 5. Morphological studies on paraffin embedded skin biopsies. (a) Dot plot representing melanocyte number found in whole histological section (thirteen and twenty four fields for controls and six fields for patients slides), stained with haematoxylin eosin (HE). **(b)** HE staining from VK2 hypopigmented area. **(c)** Melan-A immunohistochemistry from PED1004 pigmented skin biosy (up) and hypopigmented skin (down). **(d)** MITF labeling from PED1004 pigmented skin biosy (up) and hypopigmented skin (down). Scale bar: 100 µm. Melanocytes are shown by arrowhead.

Figure 6. Ultrastructural study. (a) Melanosome differentiation : Histogram representing type I (up bars) and type IV (low bars) number of melanosomes in melanocytes in skin biopsies taken in pigmented (black) and hypopigmented area (white) from patient PED1004 (left) and PED4820 (right). Ratio are given on top and number of counted melanosomes at the bottom of

each category. **(b) Melanosome quantification in keratinocytes.** Histogram representing number of melanosomes present in keratinocytes. Fifty cells were counted at the basal layer in each sample **(c)** TEM pictures of skin biopsies taken in normal (a-c) and hypopigmented areas (b-d) from patient PED1004 (a, b) and PED4820 (c, d) showing melanosomes at the epidermic junction (Arrows).

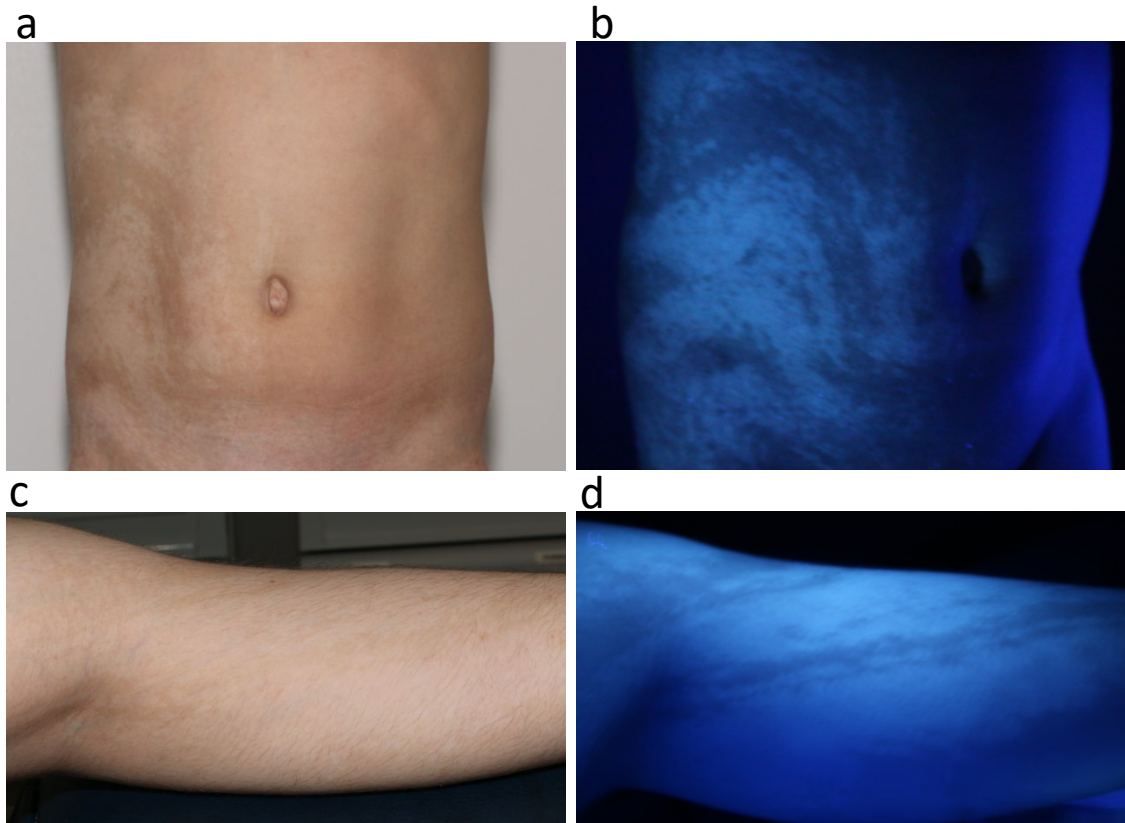


Figure 1

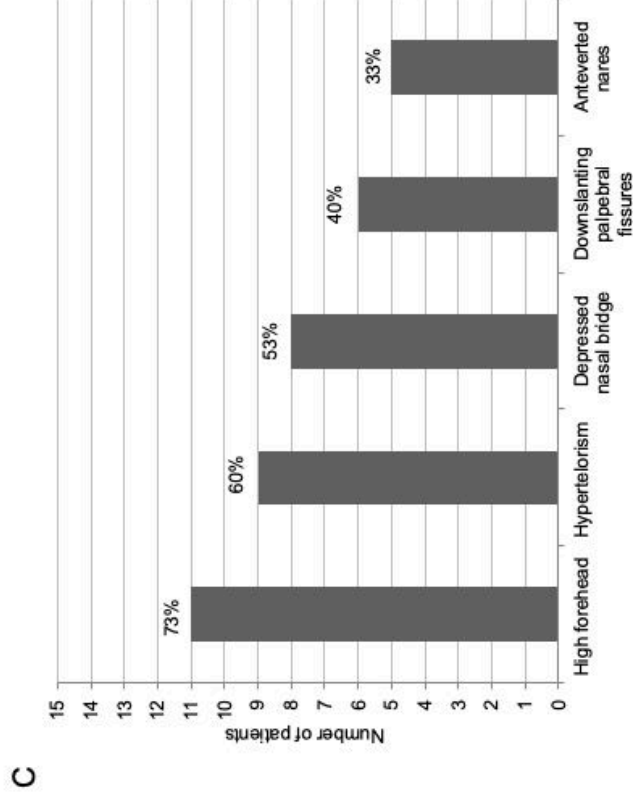
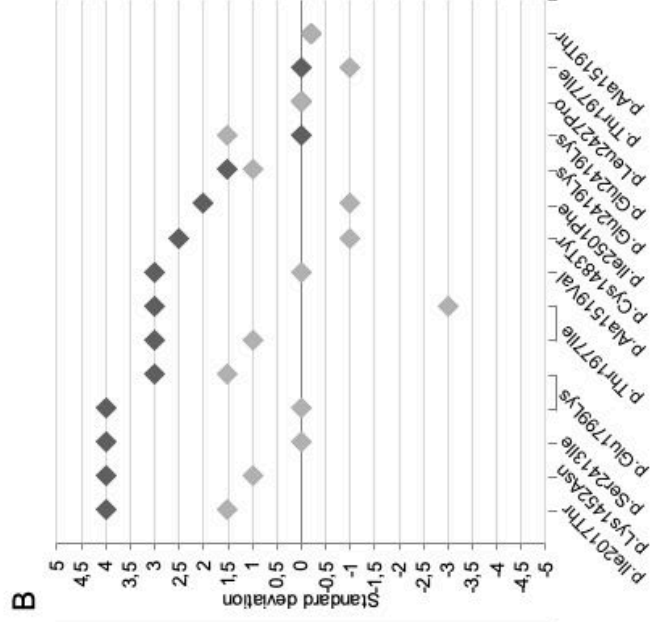
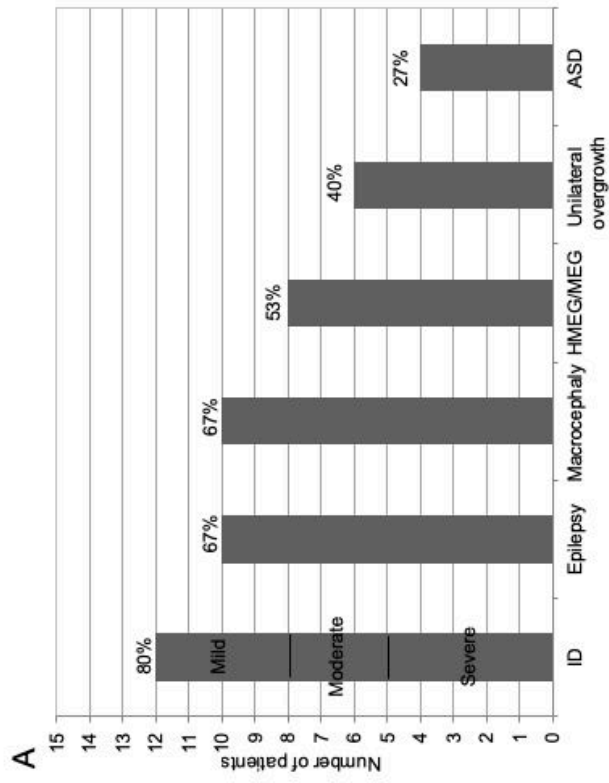


Figure 2

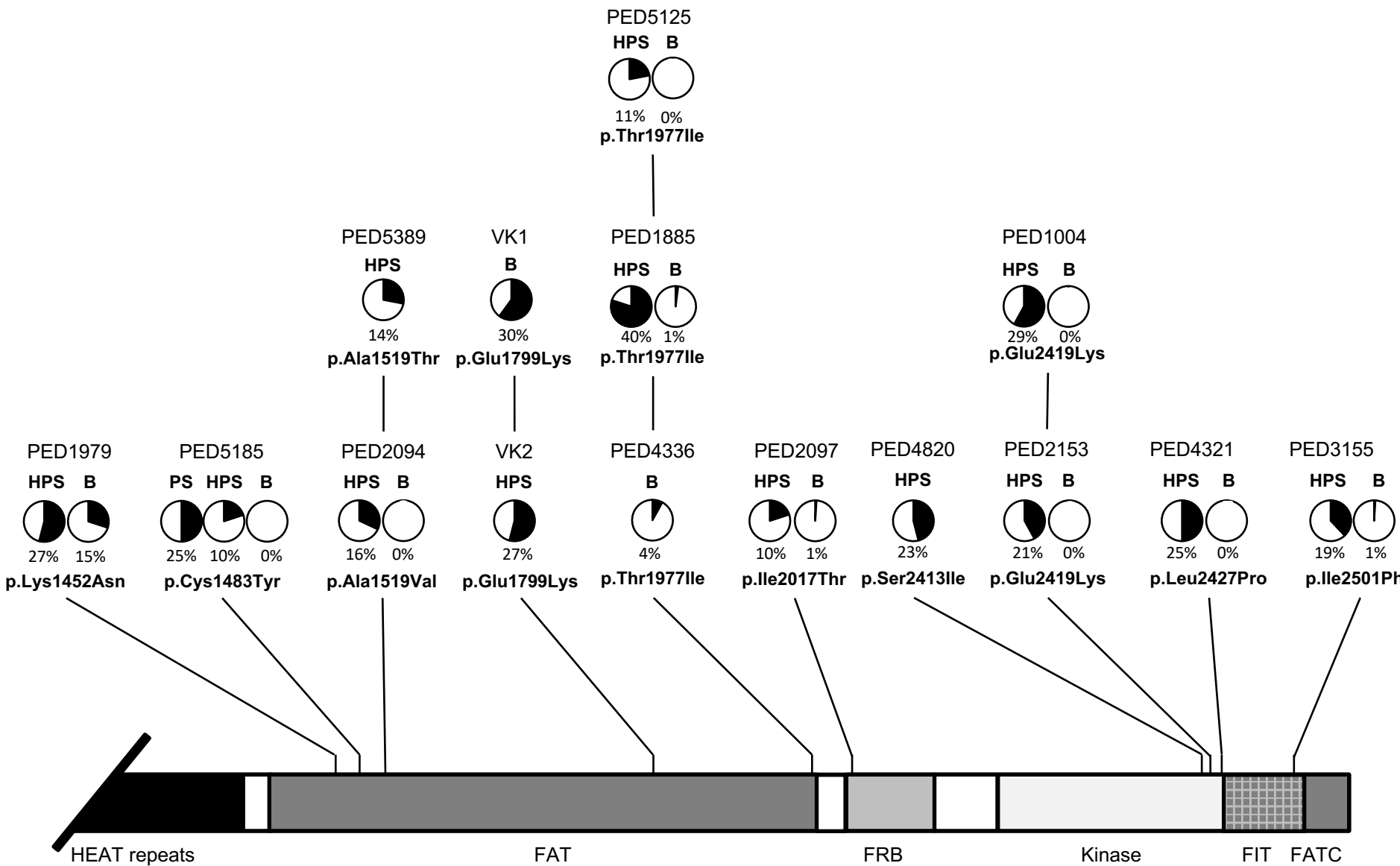
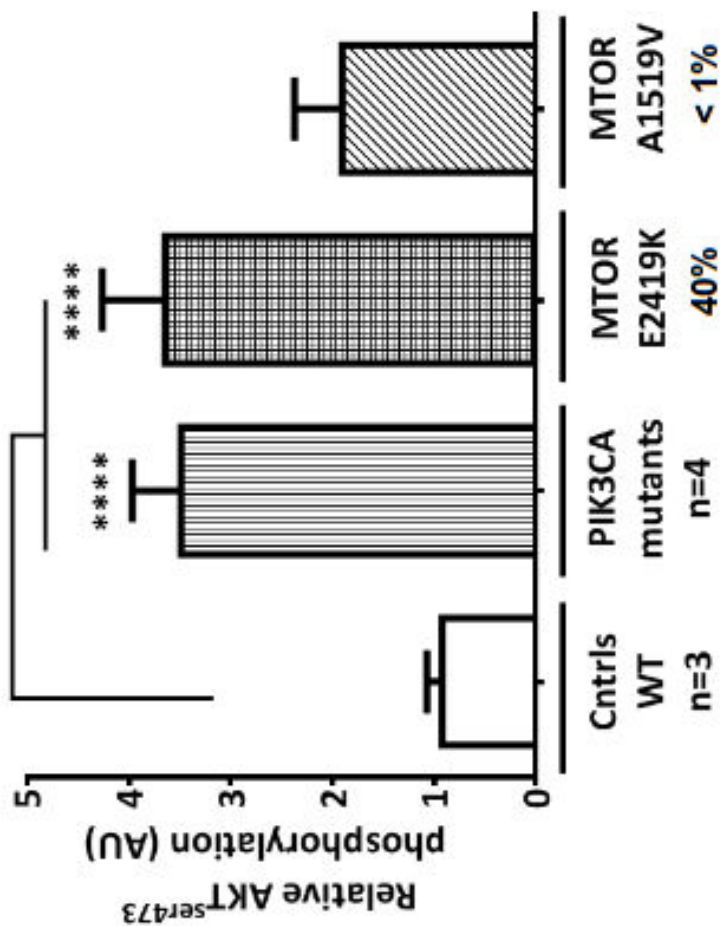


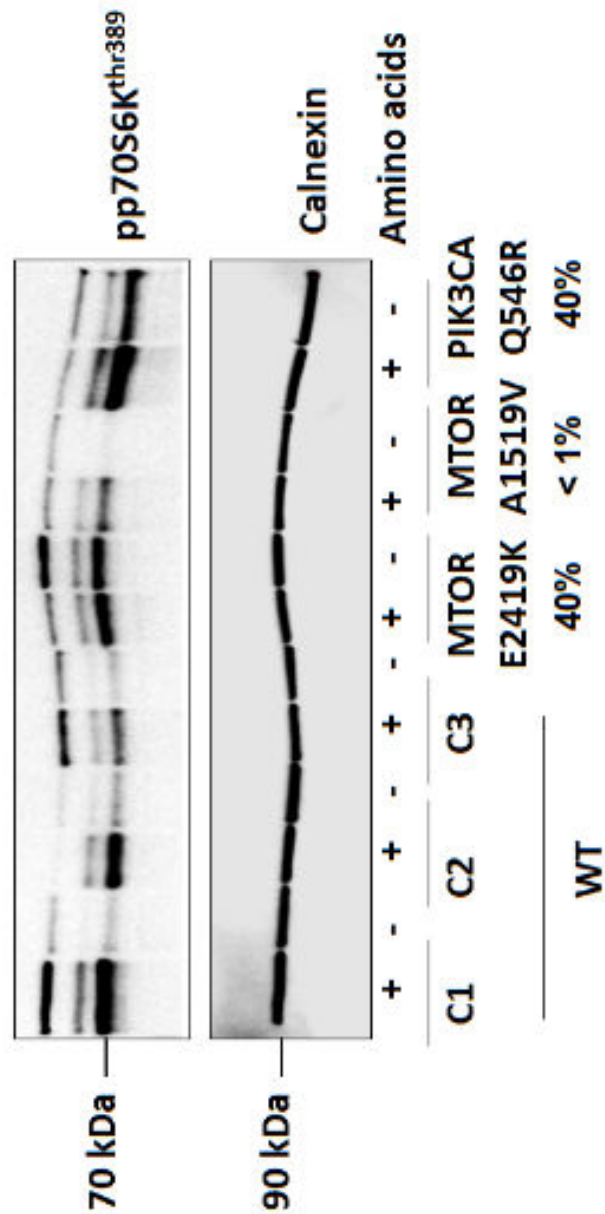
Figure 3

Figure 4

a



b



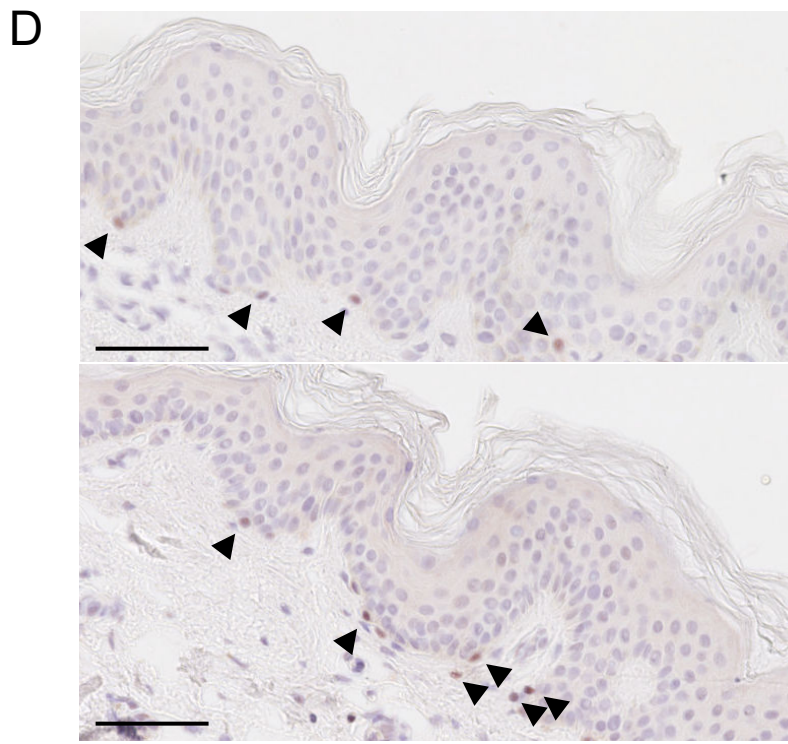
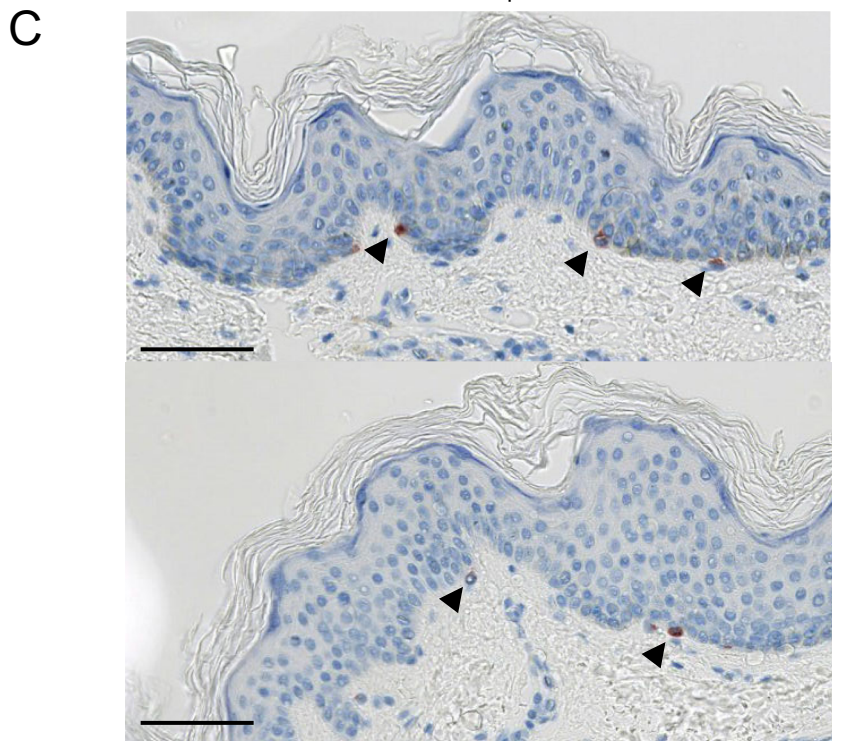
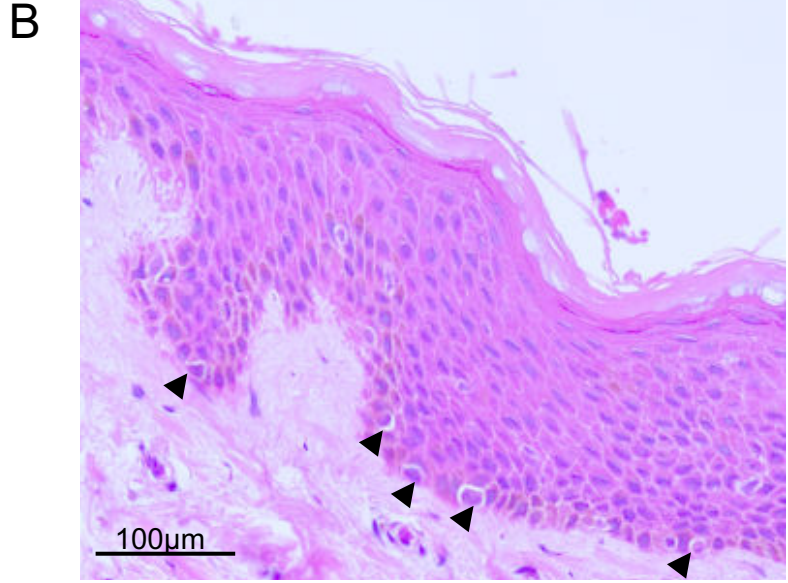
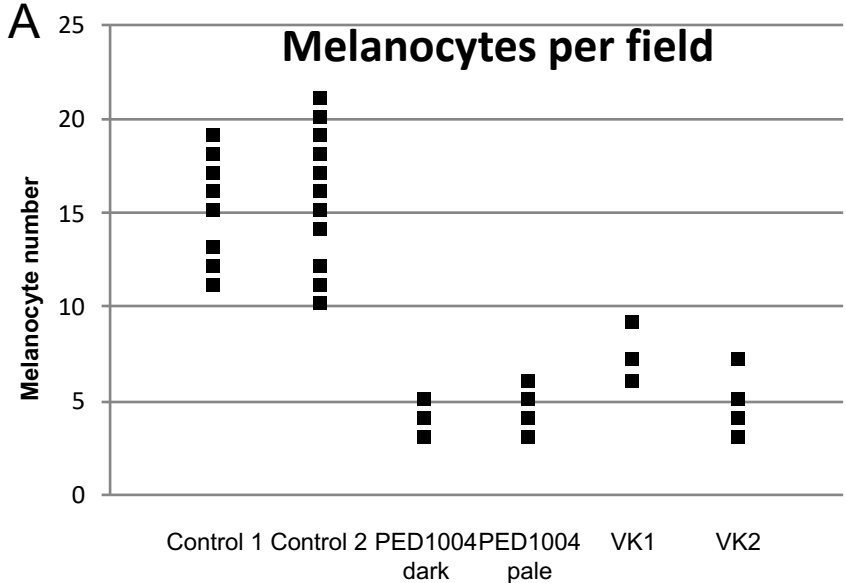
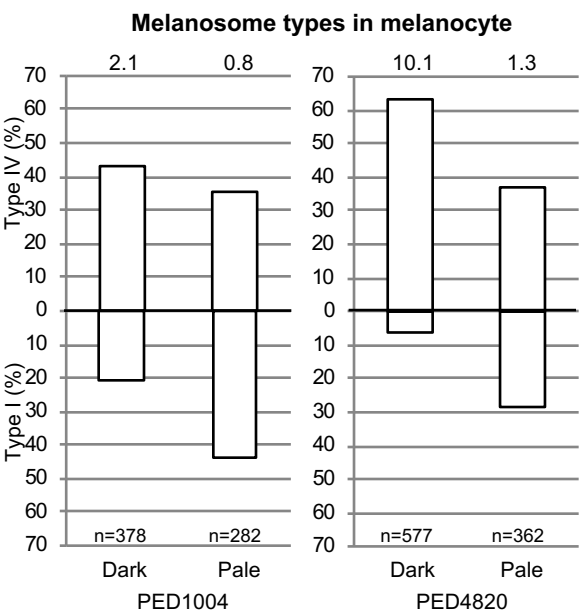
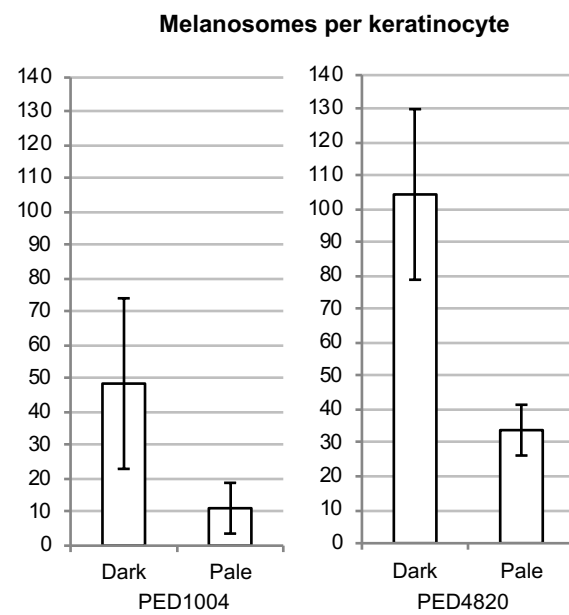


Figure 5

A



B



C

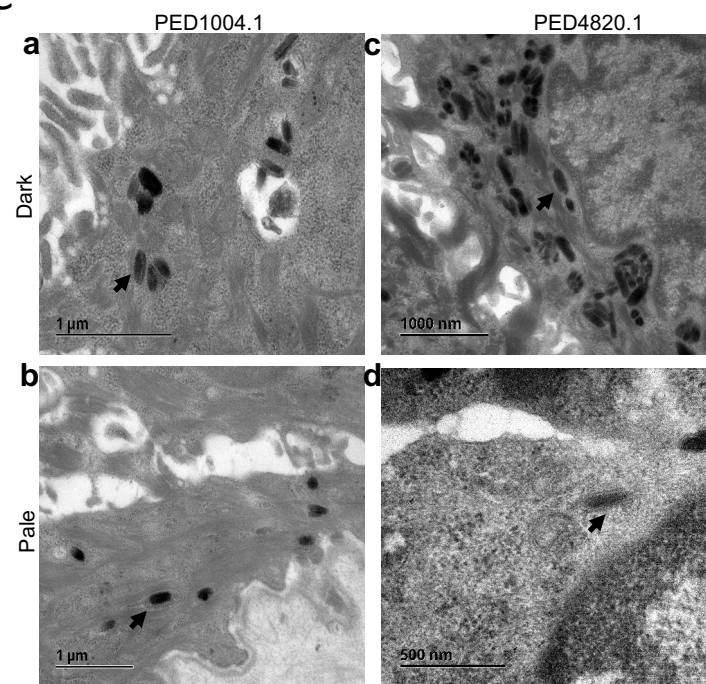


Figure 6

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Note: Investigators of the PHRC National Mosaïque

The following investigators diagnosed and ascertained patients within the scope of the PHRC National Mosaïque: Ludovic Martin, Frédéric Caux, Eve Puzenat, Didier Lacombe, Alain Taieb, Christine Leaute-Labreze, Pierre Vabres, Laurence Olivier-Faivre, Marc Bardou, Christel Thauvin-Robinet, Sylvie Manouvrier, Patrick Edery, Alice Phan, Sabine Sigaudy, Didier Bessis, David Geneviève, Julie Le Blay, Anne-Claire Bursztejn, Sébastien Barbarot, Christine Bodemer, Valérie Cormier-Daire, Christine Chiaverini, Catherine Eschard, Sylvie Odent, Emmanuelle Bourrat-Remy, Alain Verloes, Dan Lipsker, Juliette Mazereeuw-Hautier, Annabel Maruani, Anne-Marie Guerrot, and Sophie Duvert-Lehembre.

Supplementary Table 1. Previously reported *MTOR* mutations in affected individuals with pigmentary features.

<i>MTOR</i> variant Amino acid change	Type of variant	Amino acid change*	Available clinical features	References
chr1:g.11217231A>G	Somatic	p.Cys1483Arg	Hemimegalencephaly, hypomelanosis of Ito	(Lee and al, 2012)
	Somatic		Macrocephaly, ID, facial dysmorphism, linear hyperpigmentation	(Gordo et al, 2017)
chr1:g.11190804C>T	Germline	p.Glu1799Lys	Three siblings with macrocephaly, ID, seizures, craniofacial features (macrostomia, open mouth posture, hypertelorism, down slanting palpebral fissures, short nose with depressed nasal bridge, curly or wavy hair, long philtrum and tall foreheads), café-au- lait spots	(Baynam et al. 2015)
chr1:g.11188164G>T	Somatic	p.Thr1977Lys	Three unrelated patients with diffuse MEG and hypomelanosis of Ito	(Mirzaa et al, 2016)
	Somatic		One patient with MEG, asymmetric polymicrogyria, hypotonia, and hyperpigmentation	(Handoko M et al, 2019)
chr1:g.11184612T>G	Germline	p.Phe2202Cys	Two siblings with macrocephaly, severe ID, capillary malformations (face and shoulder) and area of hypo/hyperpigmentation	(Gordo et al, 2017)
chr1:g.11184573G>A	Somatic	p.Ser2215Phe	One patient with HMEG, severe ID, seizures, hypochromic patches	(Pelorosso et al, 2019)

*Variant locations are based on GRCh37/hg19 and reference *MTOR* accession LRG_734_t1.

MEG: megalencephaly; FCD: Focal Cortical Dysplasia; ID: Intellectual Disability; HMEG::hemimegalencephaly.

Supplementary Table 2. Previous reports of individuals with hypomelanosis of Ito and hemimegalencephaly

Report	Linear hypo-pigmentation	Brain MRI findings	Seizures	Psychomotor delay or ID	Body hemi-hypertrophy	Ocular anomalies	Other features
(Peserico et al. 1988)	+	HMEG, LV abnormal shape	+	+	-	Divergent strabismus	-
(Battistella et al. 1990)	+	HMEG, LV abnormal shape, abnormal periventricular WM signal	+	+	-	Divergent strabismus hypo-pigmented iris	-
(Battistella et al. 1990)	+	HMEG, abnormal periventricular WM signal	-	-	-	Divergent strabismus	Facial dysmorphism, dysondotiasis
(Williams and Elster 1990)	+	HMEG, abnormal periventricular WM signal	-	+	+	Optic nerve abnormality, retinal detachment, cataract	Imperforate anus, colon atresia, syndactyly clinodactyly, cleft palate, bilateral conductive hearing loss, facial asymmetry, dental anomalies
(Malherbe et al. 1993)	+	HMEG, enlarged LV, pachygyria, poor delineation grey-WM	+	+	-	-	-
(Tagawa et al. 1994)	+	HMEG, cortical thickening, pachygyria, LV abnormal shape, poor delineation grey-WM	+	-	-	Hypo-pigmented iris	-
(Steiner et al. 1996)	+	HMEG, LV abnormal shape, poor delineation grey-WM	+	+	-	-	Hemiparesis
(Auriemma et al. 2000)	+	HMEG, cortical thickening, pachygyria, LV abnormal shape	+	Unknown	+	-	Hypotonia
(Chapman and Cardenas 2008)	+	HMEG	+	+	-	-	-
(Sharma et al. 2009)	+	HMEG, cortical thickening	+	+	+	-	-
(Assogba et al. 2010)	+	HMEG, calcifications in caudate and lentiformis nuclei	+	+	+	-	Mild liver enlargement
(Lee and al, 2012)	+	HMEG, cortical dysplasia, ectopic and cytomegalic neurons	-	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
(Okanari et al. 2014)	+	HMEG, right FCD, enlargement right cerebral hemisphere	+	+	-	Unknown	Hypotonia
(Cuddapah et al, 2015)	+	HMEG, unilateral enlargement of left parietal and occipital lobe	+	+	-	-	-

(Mirzaa et al. 2016)	cutis tricolor	HMEG, polymicrogyria	+	Unknown	-	-	-
(Gordo et al, 2017)	linear hyperpigmentation	MEG, ventriculomegaly, gliosis	+	-	-	Strabismus	Hypotonia, hypospadias, hypertelorism
(Handoko M et al, 2019)	cutis tricolor	Diffuse MEG, ventriculomegaly, polymicrogyria, mild dysmorphic corpus callosum, focal grey matter heterotopia	-	+	-	Intermittent exotropia and poor visual tracking	Hypotonia, joint laxity
(Pelorosso et al. 2019)	+	HMEG, enlarged ventricles, brain midline rightward deviation, cortical thickening, abnormal WM signal	+	+	-	-	-

HMEG, hemimegalencephaly; MRI, Magnetic resonance imaging; ID, intellectual disability; WM, white matter; LV: Lateral ventricle.; FCD: focal cortical dysplasia.

Supplementary Table 3. Summary of whole-exome sequencing experiments in subject PED1004 and her unaffected parents

Individual	DNA source	Target size (Mb) ^a	Aligned bases (Gb) ^b	Mean sequencing depth ^c	Percent target $\geq 10\times^c$	Percent target $\geq 100\times^c$
PED1004	Skin biopsy	51	20.798	242	96.5	81.6
Father	Blood	51	9.498	130	96.0	56.5
Mother	Blood	51	7.035	91	95.2	37.5

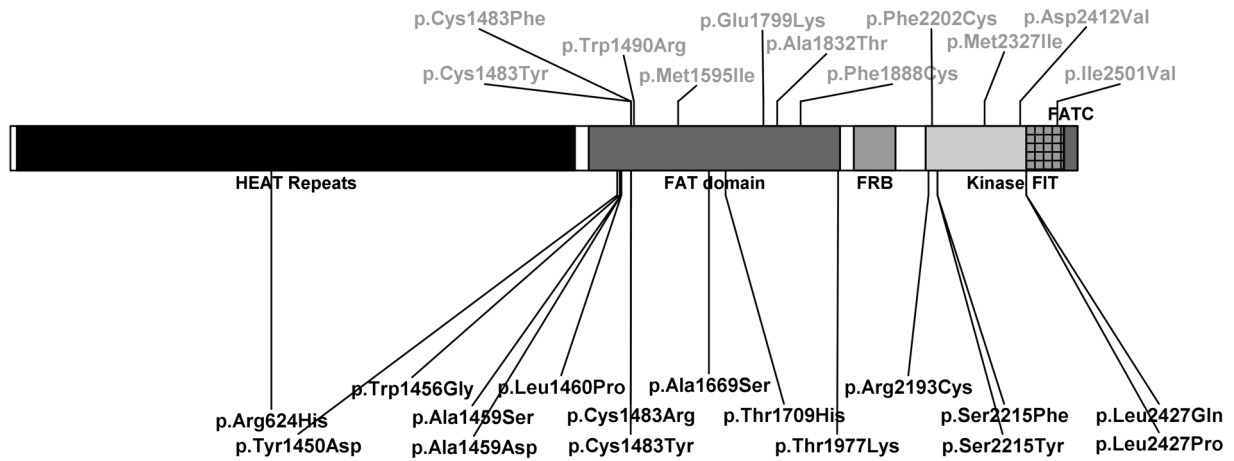
Mb, megabases; Gb, gigabases. ^aTarget size of the SureSelect Human All Exon V5 kit (Agilent). ^bBases from “Passing Filter” (PF) reads mapped to the human genome reference sequence (GRCh37/hg19 build of UCSC Genome Browser, see <http://genome.ucsc.edu/>). ^cSequencing depth metrics were calculated using RefSeq coding exons and splice junctions as targets. Only reads with mapping quality ≥ 20 and bases with base quality ≥ 20 were considered.

Supplementary Table 3. Summary of mosaic *MTOR* changes

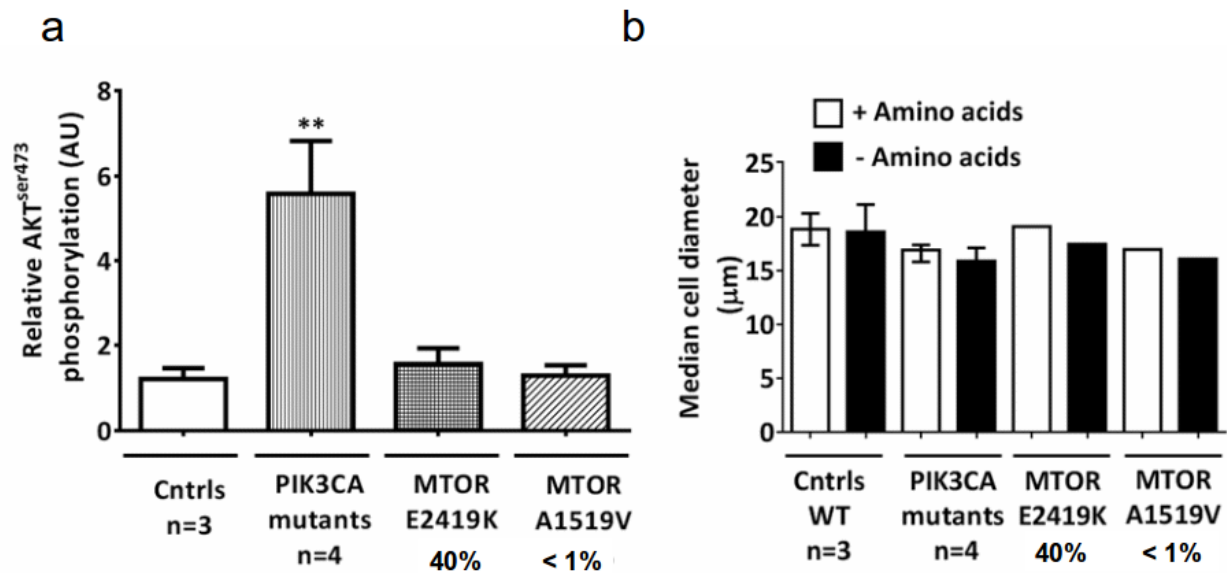
Subject	<i>MTOR</i> change	COSMIC ID	Gnomad allele frequency	GERP	Polyphen-2	CADD
PED1979	chr1:g.11217322T>A c.4356A>T p.Lys1452Asn	COSM462620	0/246,180	4.66	0.95	18.85
PED5185	chr1:g.11217230C>T c.4448G>A p.Cys1483Tyr	COSM462615	0/246,180	5.32	0.99	26.10
PED2094	chr1:g.11210197G>A c.4556C>T p.Ala1519Thr	COSM462614	0/246,138	5.16	0.98	34.00
PED5389	chr1:g.11210198C>T c.4555G>A p.Ala1519Val	COSM462614	0/246,138	5.16	0.997	22.5
VK1 VK2	chr1:g.11190804C>T c.5395G>A p.Glu1799Lys	COSM180789	0/246,180	5.54	0.878	26.3
PED5125 PED1885 PED4336	chr1:g.11188164G>A c.5930C>T p.Thr1977Ile	COSM6241477	0/246,096	3.73	0.96	9.68
PED2097	chr1:g.11187847A>G c.6050T>C p.Ile2017Thr	-	0/246,180	5.80	0.99	24.00
PED4820	chr1:g.11174437C>A c.7238G>T p.Ser2413Ile	COSM4703642	0/246,180	5.89	1.00	32.00
PED1004 PED2153	chr1:g.11174420C>T c.7255G>A p.Glu2419Lys	COSM4187184	0/246,028	5.89	1.00	36.00
PED4321	chr1:g.11174395A>G c.7280T>C p.Leu2427Pro	COSM5044474	0/246,180	5.89	1.00	26.00
PED3155	chr1:g.11169374T>A c.7501A>T p.Ile2501Phe	COSM4140746	0/246,180	5.82	0.99	21.60

CADD, Combined Annotation-Dependent Depletion; COSMIC, Catalogue of somatic mutations in cancer; Gnomad: Genome Aggregation Database; GERP, Genomic Evolutionary Rate Profiling. Presence of identified *MTOR* variants was assessed in several public variant databases, including dbSNP build 141, Gnomad Browser, and COSMIC. All variants were absent from dbSNP build 14, and Gnomad database. Variant locations are based the human genome reference sequence GRCh37/hg19 and reference *MTOR* accession is LRG_734_t1.

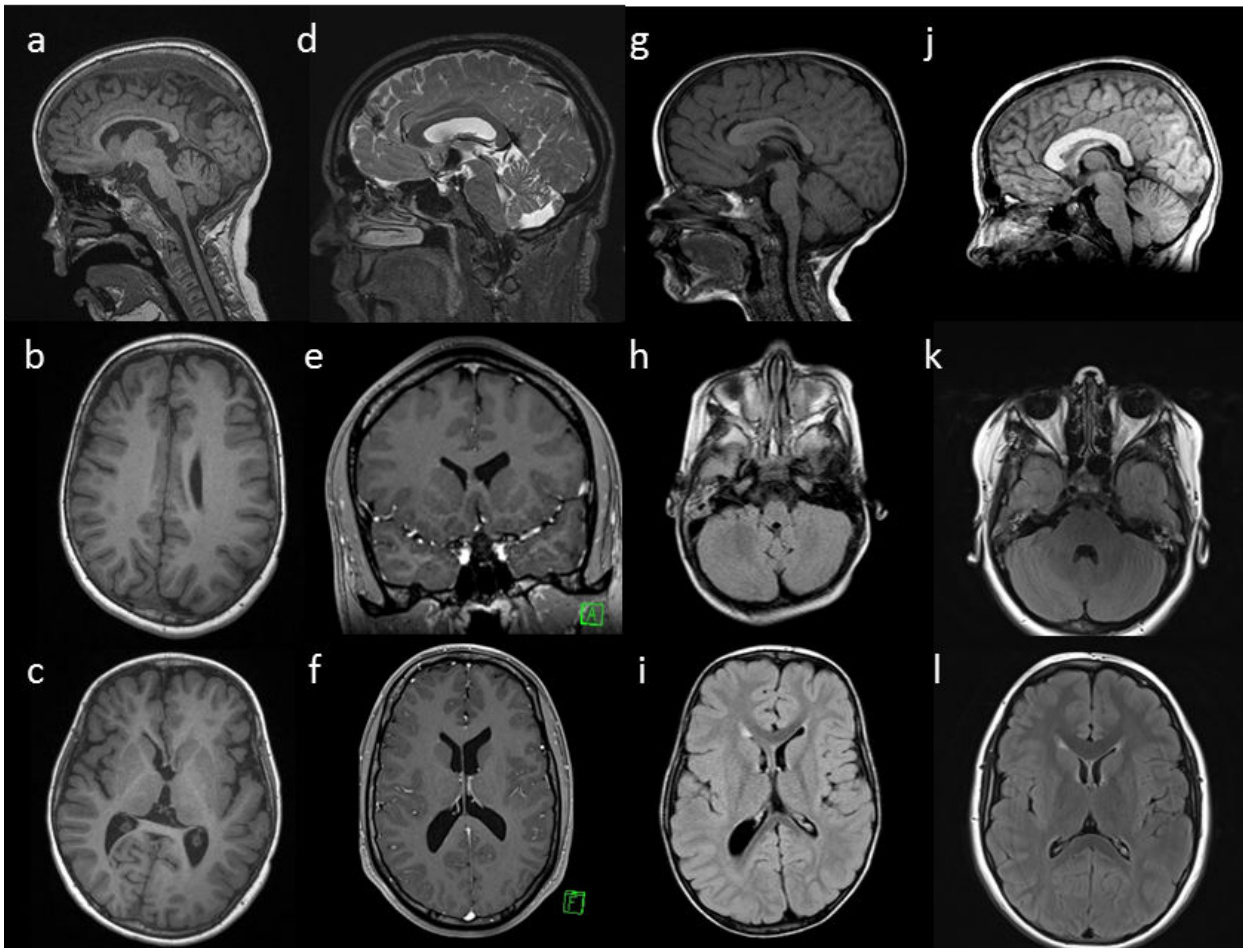
SUPPLEMENTARY FIGURES



Supplementary Figure 1. Schematic representation of MTOR protein structure with previously reported germinal (blue variations) and somatic mutations (green variations). FAT: FRAP-ATM-TRRAP domain ; FRB : FKBP12-Rapamycin Binding domain ; FATC: C-terminal FAT domain.



Supplementary Figure 2. Evaluation of basal pAKT phosphorylation and cell size in *MTOR* mutant cell lines. (a) ELISA based evaluation of AKT^{ser473} phosphorylation without amino acid deprivation in wild type control cells (Cntrls, n=3), *PIK3CA* mutant cell lines (n=4 with respective mutation burdens; M020 [p.G1049R 40%], M098 [p.E418K 32%], M018 [p.Q546K 40%] and M032 [p.H1047R 30%]) and *MTOR* mutant cell lines p.E2419K (40% mutation burden) and p.A1519K (<1% mutation burden). Data is pooled from three independent experiments and error bars represent SEM. **p < 0.01 One-way ANOVA, Tukey's post-hoc analyses. (b) Median cell diameter using a FACS-based multi-sizer with or without amino acid deprivation for 50 minutes. Mutation burdens are indicated below. Error bars represent SEM; 10,000 cells were counted in total. Skin fibroblasts from patients with known activating *PIK3CA* mutations were used as positive controls and cultured primary fibroblasts carrying p.Ala1519Val mutation were used for comparison.



Supplementary Figure 4. Brain MRI of subjects PED1004, PED2094, PED2097 and PED1979.

(a-c) Individual PED1004: Left hemimegalencephaly on brain MRI with altered ventricle shape with a small frontal horn, and enlarged left thalamus and caudate nucleus **(a)**, slightly thickened cortical mantle and enlarged white matter with normal signal **(b)** and enlarged anterior corpus callosum **(c)**. **(d-f)** Brain images of subject PED2094 showing normal corpus callosum **(d)**, small frontal horns **(e, f)**, and mild overgrowth of the right cerebral hemisphere with a slight enlargement of the right posterior ventricle **(e)**. **(g-i)** Images of subject PED2097 showing normal corpus callosum from a sagittal section **(g)**, overgrowth of the right cerebellar hemisphere **(h)**, right posterior ventricle enlargement, a small frontal horn, increased white matter volume and a thickened cortical mantle **(i)**. **(j-l)** Images of subject PED1979 show a thickened corpus callosum **(j)**, and symmetrical enlargement of cerebellar **(k)** and cerebral hemispheres **(l)**.

d. Article 4: Mutations constitutionnelles du gène *TFE3* et mosaïcisme fonctionnel

Article en cours de rédaction :

**De novo mutations in the X-linked *TFE3* gene
cause intellectual disability with pigmentary mosaicism
and storage disorder-like features.**

Lehalle D, Vabres P, **Sorlin A**, Bierhals T, Avila M, Carmignac V, Chevarin M, Torti E, Clayton-Smith J, Cogné B, Cusco I, Duplomb L, De Bont E, Duffourd Y, Duijkers F, Elpeleg O, Fattal A, Geneviève D, Guillen Sacoto M, Guimier A, Harris D, Hempel M, Isidor B, Jouan T, Kuentz P, Lichtenbelt K, Loik Ramey V, Pasquier L, Sondergaard-Schatz K, St-Onge J, Thevenon J, Valenzuela I, van Gassen K, van Haelst M, van Koningsbruggen S, Verdura E, Whelan Habela C, Rivière J-B, Thauvin-Robinet C, Betschinger J, Faivre L.

Contribution personnelle : analyse des données de séquençage, analyse phénotypique des patients porteurs de mutations de *TFE3*, rédaction de l'article.

Chez deux patientes présentant une hypomélanose d'Ito syndromique, des variations constitutionnelles au sein du gène *TFE3* ont été détectées en ES. Ces patientes présentent un tableau clinique comportant, outre une dépigmentation, une dysmorphie faciale reconnaissable, évoquant une dysplasie fronto-nasale. Deux autres patientes étudiées au sein du laboratoire GAD, mais présente dans une autre cohorte, présentaient un phénotype similaire. Les données d'ES pour l'une, et de TUDS pour l'autre, ont montré également la présence d'une mutation du même gène. Il s'agit de mutations entraînant un défaut de localisation nucléaire et d'activation du facteur de transcription Tfe3 (154).

À l'issu d'un partage de données grâce au réseau GeneMatcher (155), les données phénotypiques de 14 patients (10 filles, 4 garçons) ont pu être recueillies (travail coordonné par le Dr Lehalle, article soumis), permettant de préciser le phénotype associé aux variations de ce gène.

Les signes cardinaux de ce syndrome peuvent être définis comme suit : absence de langage (12/14), retard moteur (14/14), troubles du comportement (10/14), anomalies cérébrales (5/14 : hydrocéphalie, kyste arachnoïdien, corps calleux court, malformation de Dandy-Walker, anomalies de substance blanche), surdité (4/14), retard statural (8/14). Des anomalies de la pigmentation cutanée sont présentes chez 10 patients (9 hypopigmentations linéaires, 1 hyperpigmentation). Les anomalies de la morphologie faciale comprennent un faciès et une racine du nez plat, pour certains un blépharophimosis, un hypertélorisme, des narines antéversées, des traits épais, un hirsutisme (Figures 1 et 2 de l'article).

La localisation du gène *TFE3* sur le chromosome X permet d'émettre l'hypothèse d'un mosaïcisme fonctionnel. L'étude du profil d'inactivation du chromosome X chez 5 patientes a en effet montré un profil dévié dans le sang pour 3 d'entre elles, et dans les fibroblastes pour une quatrième. Deux des 4 garçons (dont un présentant des signes cutanés de mosaïcisme) présentaient un mosaïcisme génétique (environ 30 % des allèles dans le sang). De manière surprenante, un garçon présentant un mosaïcisme cutané ne présentait pas de mosaïcisme détectable dans le sang (50 % des allèles mutés), mais la comparaison du taux de mutation entre les territoires dépigmentés et normo-pigmentés n'a pas été réalisée.

Journal of Medical Genetics

De novo mutations in the X-linked TFE3 gene cause intellectual disability with pigmentary mosaicism and storage disorder-like features

Journal:	<i>Journal of Medical Genetics</i>
Manuscript ID	Draft
Article Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>Lehalle, Daphné; Genetics Department Vabres, Pierre ; CHU Dijon, Department of Dermatology Sorlin, Arthur Bierhals, Tatjana; University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Avila, Magali; CHU Besancon, Genetics Department Carmignac, Virginie; Equipe Génétique et Anomalies du Développement, Université de Bourgogne, Faculté de Médecine Chevarin, Martin; INSERM, GAD; Centre Hospitalier Universitaire de Dijon, Torti, Erin; GeneDx Clayton-Smith, Jill; Manchester Centre for Genomic Medicine, Genomic Medicine; University of Manchester, Division of Evolution and Genomic Sciences, Faculty of Biology, Medicine and Health Cogné, Benjamin; Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Service de Génétique Médicale CUSCO, Ivon; Hospital Vall d'Hebron, Clinical and Molecular Genetics Duplomb, Laurence; Université de Bourgogne, De Bont, Eveline; Ommelander Hospital Groningen, Department of Pediatric Oncology Duffourd, Yannis; CHU Dijon, FUH Translad Duijkers, Floor; Amsterdam University Medical Centres, Department of Genetics Elpeleg, Orly; Hadassah-Hebrew University Medical Center, Monique and Jacques Roboh Department of Genetic Research fattal, Aviva; Tel-Aviv Medical Center, Geneviève, David; Hôpital Arnaud de Villeneuve, CHRU Montpellier, Département de Génétique Médicale Guillen Sacoto, Maria; GeneDx Guimier, Anne; Necker-Enfants Malades Hospitals, Department of Genetics Harris, David; Boston Children s Hospital, Division of Genomics and Genetics Hempel, Maja; University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Isidor, Bertrand; CHU-Nantes, Génétique Médicale Jouan, Thibaud; GAD EA4271 « Génétique des Anomalies du Développement » (GAD), , Université de Bourgogne Kuentz, Paul; Centre Hospitalier Universitaire de Besancon, Génétique Biologique Histologie, PCBio; Université de Bourgogne, EA4271 GAD</p>

	<p>Lichtenbelt, Klaske; University Medical Centre Utrecht Brain Centre, Department of Genetics Loik Ramey, Valerie; Boston Children s Hospital, Department of Genetics Pasquier, Laurent; CHU Rennes, Service de Génétique Clinique, CLAD Ouest Sondergaard-Schatz, Krista St-Onge, Judith; McGill University, Department of Genetics Thevenon, Julien; CHU Grenoble Alpes, Université Grenoble Alpes, Département de Génétique et Procréation Valenzuela, Irene; Hospital Vall d'Hebrón, Clinical Genetic Unit van Gassen, Koen; University Medical Center Utrecht, Department of Medical Genetics van Haelst, Mieke; University Medical Center Utrecht, Department of Medical Genetics van Koningsbruggen, Silvana; University of Amsterdam, Academic Medical Centre , Department of Clinical Genetics Verdura, Edgard; Institut d'Investigacio Biomedica de Bellvitge, Neurometabolic Disease Lab Whelan Habela, Christa; Johns Hopkins Medicine, Department of Neurology, John M. Freeman Pediatric Epilepsy Center Rivière, Jean-Baptiste; McGill University Health Centre, Department of Human Genetics Thauvin-Robinet, Christel; Hôpital d'Enfants, CHU Dijon, , Centre de Génétique Betschinger, Joerg; Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research Faivre, Laurence; Hôpital d'Enfants, Centre de Génétique</p>
Keywords:	TFE3, Intellectual disability, Lysosomal metabolism, Pigmentary mosaicism, Storage disorder

SCHOLARONE™
Manuscripts

***De novo* mutations in the X-linked *TFE3* gene cause intellectual disability with pigmentary mosaicism and storage disorder-like features**

Daphné Lehalle^{1,2}, Pierre Vabres^{1,2}, Arthur Sorlin^{1,2}, Tatjana Bierhals³, Magali Avila², Virginie Carmignac^{1,2}, Martin Chevarin², Erin Torti⁴, Jill Clayton-Smith⁵, Benjamin Cogné^{6,7}, Ivon Cusco⁸, Laurence Duplomb-Jego², Eveline S.J.M. De Bont⁹, Yannis Duffourd², Floor Duijkers¹⁰, Orly Elpeleg¹¹, Aviva Fattal-Valevski¹², David Geneviève¹³, Maria J. Guillen Sacoto⁴, Anne Guimier¹⁴, David J. Harris¹⁵, Maja Hempel³, Bertrand Isidor^{6,7}, Thibaud Jouan², Paul Kuentz², Klaske D. Lichtenbelt¹⁶, Valerie Loik Ramey¹⁵, Laurent Pasquier¹⁷, Krista Sondergaard Schatz¹⁸, Judith St-Onge^{2,19}, Julien Thevenon^{1,2,20}, Irene Valenzuela⁸, Koen L.I. van Gassen¹⁶, Mieke van Haelst¹⁰, Silvana van Koningsbruggen¹⁰, Edgard Verdura^{21,22}, Christa Whelan Habela²³, Jean-Baptiste Rivière^{2,19}, Christel Thauvin-Robinet^{1,2}, Joerg Betschinger²⁴, Laurence Faivre^{1,2}

¹Fédération Hospitalo-Universitaire Médecine Translationnelle et Anomalies du Développement (TRANSLAD), Centre Hospitalier Universitaire Dijon et Université de Bourgogne, 21079 Dijon, France

²Equipe GAD, INSERM LNC UMR 1231, Faculté de Médecine, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France

³Institute of Human Genetics, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52, 20246, Hamburg, Germany

⁴GeneDx, Gaithersburg, MD, USA

⁵Manchester Centre for Genomic Medicine, Manchester University Hospitals NHS Foundation Trust, Manchester Academic Health Sciences Centre, Manchester, UK.

⁶CHU de Nantes, Service de Génétique Médicale, Nantes, France

⁷L'institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, CHU de Nantes, Nantes, France

⁸Department of Clinical and Molecular Genetics and Rare Disease Unit, University Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

⁹Department of Pediatric Oncology/Hematology, Beatrix Children's Hospital, University Medical Centre Groningen, Groningen, the Netherlands

¹⁰Department of Genetics, AUMC, Amsterdam, the Netherlands

¹¹Monique and Jacques Roboh Department of Genetic Research, Hadassah-Hebrew University Medical Center, Jerusalem, Israel

¹²Pediatric Neurology Institute, Tel Aviv Sourasky Medical Center, Sackler Faculty of Medicine, Tel Aviv University, Israel

¹³Département de Génétique Médicale, Maladies Rares et Médecine Personnalisée, Unité Inserm U1183, faculté de médecine Montpellier-Nîmes, CHU Montpellier, Montpellier, France.

1
2
3 ¹⁴Service de Génétique, Hôpital Necker-Enfants Malades, AP-HP, Paris, France.

4
5 ¹⁵Division of Genetics and Genomics, Boston Children's Hospital, Boston, MA, USA

6
7 ¹⁶Department of Genetics, University Medical Center Utrecht (UMCU), Utrecht, the Netherlands

8
9 ¹⁷Service de génétique médicale, CHU Rennes, 35000 Rennes, France.

10
11 ¹⁸Johns Hopkins University School of Medicine, Department of Genetic Medicine, Baltimore, MD,
12 USA, 21287

13
14
15 ¹⁹Child Health and Human Development Program, Research Institute of the McGill University Health
16 Centre, Montreal, QC H4A 3J1, Canada

17
18 ²⁰Centre de Génétique, Hôpital Couple-Enfant, CHU de Grenoble-Alpes, La Tronche, France

19
20 ²¹Neurometabolic Diseases Laboratory, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL),
21 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

22
23 ²²Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Spain

24
25
26 ²³Department of Neurology, John M. Freeman Pediatric Epilepsy Center, Johns Hopkins Medicine,
27 Baltimore, MD, USA, 21287

28
29
30 ²⁴Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research, 4058 Basel, Switzerland

31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Keywords: TFE3, intellectual disability, pigmentary mosaicism, storage disorder, lysosomal
metabolism.

Addresses for correspondence: Dr Daphné Lehalle. Centre de Référence Anomalies du
Développement et Syndromes Malformatifs, CHU Dijon, 14 rue Gaffarel, 21079 Dijon, France Tel: 33
(3) 80 29 53 13. Fax Email : daphnelehalle@yahoo.fr ; Pr Laurence Faivre, Centre de Référence
Anomalies du Développement et Syndromes Malformatifs, CHU Dijon, 14 rue Gaffarel, 21079 Dijon,
France. Tel: 33 (3) 80 29 53 13. Fax: 33 (3) 80 29 32 66. laurence.faivre@chu-dijon.fr

Abstract

Introduction: Pigmentary mosaicism (PM) manifests by pigmentation anomalies along Blaschko's lines, and represents a clue toward the molecular diagnosis of syndromic intellectual disability. Together with new insights on the role for lysosomal signaling in embryonic stem cell differentiation, mutations in the X-linked transcription factor *TFE3* have recently been reported in five patients. Functional analysis suggested these mutations to result in ectopic nuclear gain-of-function Tfe3 alleles.

Material and methods: Subsequent datasharing allowed the clustering of *de novo TFE3* variants identified by exome sequencing on DNA extracted from leucocytes in patients referred for syndromic intellectual disability with or without PM.

Results: We describe the detailed clinical and molecular data of fourteen individuals harboring a *de novo TFE3* variant, including the patients that initially allowed reporting *TFE3* as a new disease-causing gene. The ten females and four males presented with pigmentation anomalies on Blaschko's lines, severe intellectual disability, epilepsy, storage disorder-like features, growth retardation and recognizable facial dysmorphism. The variant was at a mosaic state in at least two male patients. All variants were missense except one splice variant. Nine of the eleven variants were localized in exon 4, two in exon 3; three were recurrent variants.

Conclusion: This series further delineates the specific storage disorder-like phenotype with pigmentary mosaicism ascribed to *de novo TFE3* mutation in exons 3 and 4. It confirms the identification of a novel X-linked human condition associated with mosaicism and dysregulation within the mTOR pathway, as well as a link between lysosomal signaling and human development.

Introduction

Intellectual disability (ID) affects about 3% of the individuals worldwide, and raises significant issues in terms of diagnostic, management and genetic counselling. The presence of pigmentation anomalies in a patient with ID represents helpful clinical clues in order to narrow the range of etiological hypothesis. Hypomelanosis of Ito (HI, MIM 300337) is an unspecific term encompassing a heterogeneous group of disorders characterized by cutaneous hypopigmented whorls and streaks along Blaschko's lines and variable extracutaneous features affecting the musculoskeletal and nervous system[1]. The cutaneous pattern therefore represents a nonspecific hallmark of mosaicism in these neurocutaneous conditions. Genetic mosaicism is due to postzygotic mutations, either chromosomal rearrangements or point mutations, whereas random X inactivation in female leads to functional mosaicism[2]. Unraveling the molecular basis of pigmentary mosaicism still is a challenge, due to clinical and genetic heterogeneity, technical difficulties in detecting mosaic mutations by classical sequencing approaches, and the complexities of obtaining affected tissue. As part of a collaborative group, we recently reported *de novo* mutations in exons 3 and 4 of the transcription factor *TFE3* as the cause for HI in four unrelated individuals, including one male, as well as syndromic intellectual disability without pigmentary disorders in a female[3].

Transcription factor E3 (*TFE3*) belongs to the MITF family of mammalian basic helix-loop-helix zipper (bHLH-Zip) transcription factors, together with *TFEB* and *TFEC*; all four can form homodimers or heterodimers with each other[4]. Embryonic expression of *TFE3* orthologues *Tfe3a* and *Tfe3b* were demonstrated in the zebrafish in a wide range of tissues[5]. *TFE3* subcellular localization plays a crucial role in the regulation of cellular homeostasis and embryonic stem cell differentiation. The phosphorylated *TFE3* is retained in the cytoplasm, whereas dephosphorylated protein translocates to the nucleus to promote the transcription of target genes involved in lysosomal biogenesis and autophagy[6]. *TFE3* relocalization to the nucleus is driven upon various stressors, such as starvation[7, 8], DNA damage[9], mitochondrial damage[10], Golgi stress[11], and pathogens[12] in mTORC1-dependant manner; and oxidative stress[13] or Cadmium exposition[14] in mTORC1 independent manner. Moreover, lysosomal signalling-induced nucleocytoplasmic redistribution of

TFE3 is essential to the regulation of embryonic stem cells renewal[3, 15]. By restricting nuclear localization and activity of Tfe3, lysosome activity, the tumour suppressor protein Folliculin and the Ragulator protein complex enable the exit from pluripotency and therefore drive differentiation. Conversely, enforced nuclear Tfe3 enables ESCs to withstand differentiation[15]. In human, TFE3 mutations have long been known in cancer. Gene fusions by translocations or other chromosomal rearrangements involving *TFE3* and five partner genes has indeed been reported to occur in a subset of renal cell carcinomas (RCC), referred to as “TFE-fusion RCC”, and, more rarely, to lung sarcoma and perivascular epithelioid cell tumors (PEComas)[16]. In vitro, Villegas et al. recently showed that the absence of either *TFE3* exons 3 or 4 resulted in a nuclear gain-of-function Tfe3 allele in embryonic stem cells, indicating that both exons 3 and 4 are required for Tfe3 inactivation[3]. Nuclear localization and resistance to differentiation were proved in Tfe3 KO ESCs expressing murine Tfe3 alleles (Gln118Pro and Pro185Leu, corresponding to mutations Gln119Pro and Pro186Leu identified in individuals referred to as Patient 1 and 3 in this series). Based on the analysis of TFE3 secondary structure[17], indicating that residues 110 to 215 are predicted to form a domain of two stable alpha helices that might be disrupted by mutations in exons 3 and 4, and the observation of a similar phenotype in patients harbouring mutations in exons 3 and 4, it was suggested that Tfe3 exons 3 and 4 form a Rag binding fold whose structural integrity is indispensable for lysosome-mediated cytoplasmic Tfe3 inactivation[3]. Beyond these data on *TFE3* function, by the report of a series of 14 individuals harbouring *de novo* mutations in exons 3 and 4 of *TFE3*, we emphasize their phenotype and bring additional clinical insight toward the recognition of this novel developmental disorder.

Methods

Patients

We clustered fourteen patients with *de novo* *TFE3* variants from 10 cohorts, using the GeneMatcher tool[18]. Three patients (1, 4, 11) were from a research cohort (MUSTARD) compiled in our Department to identify molecular bases of pigmentary mosaicism that included 26 individuals, and led

1
2
3 very recently to the identification of the *RHOA* gene (*Nature Genetics, In Press*). Nine were from six
4 different countries (France, Israel, Netherlands, Germany, USA, Spain) with diagnostic purpose for
5 patients with intellectual disability (patients 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 14). Two patients (10, 13) had a
6 clinical diagnosis following the identification of the gene; patient 13 has previously had exome
7 sequencing done, that had been considered as negative, and was interpreted again to focus on *TFE3*.
8 We obtained written informed consent for diagnostic or research purposes testing from all subjects or
9 their legal representatives. We extracted genomic DNA from fresh skin, cultured skin fibroblasts, and
10 blood samples using the Genra Puregene Blood and Tissue Extraction Kit (Qiagen). We assessed
11 genomic DNA integrity and quantity by agarose gel electrophoresis, NanoDrop spectrophotometry,
12 and Qubit fluorometry (Thermo Fisher).
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

25 ES

26
27
28 Routine trio exome sequencing (ES) was applied by all participants according to their own diagnostic
29 protocols and platforms[19, 20]. Candidate *de novo* mutational events were identified by focusing on
30 protein-altering and splice-site changes: (1) supported by at least three reads and 10% of total reads in
31 the proband; (2) absent in both parents, as defined by variant reads representing less than 5% of total
32 reads; (3) at base-pair positions covered by at least four reads in the entire trio; and (4) present at a
33 frequency less than 1% in dbSNP (build 147) and 0.1% in the Exome Aggregation Consortium
34 (ExAC, <http://exac.broadinstitute.org/>). For Patient 6, the general assertion criteria for variant
35 classification are publicly available on the GeneDx ClinVar submission page
36 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/submitters/26957/>).
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

48 *TFE3* sequencing

49
50
51 For Patient 10, we amplified regions of interest using custom intronic primers and long-range
52 polymerase chain reactions with the PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara Bio, Saint-Germain-
53 en-Laye, France). We pooled, purified, and quantified polymerase chain reaction amplicons from each
54 affected individual. We prepared libraries using the Nextera XT DNA Sample Preparation kit
55 (Illumina, Paris, France), which involves simultaneous fragmentation and tagging of DNA fragments
56
57
58
59
60

1
2
3 by in vitro transposition. We performed paired-end sequencing reactions of 150-bp reads on a MiSeq
4 platform using 300-cycle reagent kits (v2; Illumina, Paris, France).
5
6
7

8 Determination of the X-chromosome inactivation pattern
9

10
11 X chromosome inactivation studies were performed in four of the seven females, in blood and
12 fibroblasts for Patients 1 and 5; in fibroblasts only for Patient 4; and in blood only for Patient 11.
13
14

15
16 X-chromosome inactivation (XCI) pattern was estimated at the *HUMARA* locus as described
17 previously[21] on DNA extracted from uncultured fibroblasts. Fluorescent PCR products were
18 analyzed by capillary electrophoresis on an ABI3130XL genetic analyzer (Applied Biosystems) and
19 peak areas were generated with the GeneMapper software (Applied Biosystems). Skewing was
20 defined as greater than 85% of one X allele active.
21
22
23
24
25
26
27
28
29

30 **Results**

31
32
33 We describe a series of 14 patients carrying a *de novo* mutation in *TFE3*, 5 of them being previously
34 published with limited clinical information [3]. Ten were females and four were males; their age
35 ranged from 18 months to 22 years. Five were referred for hypomelanosis of Ito, two for syndromic
36 intellectual disability, and five for suspicion of storage disorder.
37
38
39
40
41
42
43
44
45

46 **Clinical data**

47
48 The clinical features are summarized in Table 1. Additional information can be found in the
49 Supplementary data.
50
51

52
53 Neonatal course was remarkable for 8 patients: history of jaundice or feeding difficulties was reported
54 for three patients each, hypoglycemia and hepatomegaly for two each, and cholestasis for one. All
55 these features were transient. Birth parameters were within normal ranges.
56
57
58
59
60

1
2
3 Developmental delay was a constant feature in all the individuals from this cohort. In most cases, it
4 was noticeable from the first months of life. Only six patients were able to walk at the time of the
5 study (walked was acquire at 30, 30, 36, 40 months, six and seven years), whereas eight were still
6 unable to walk, at ages 18 months, 29 months, 38 months, 4 years, 5 years, 7 years, 10 years and 20
7 years. All patients were non-verbal, except for two older patient who could speak a few words.
8 Neurological examination was abnormal in nine individuals and consisted in truncal hypotonia,
9 sometimes associated with lower limb spasticity (4 individuals) or ataxia (one adult). Behavioural
10 issues such as autistic features and sleeping difficulties were noted for ten patients. Nine patients
11 developed epilepsy, onset in the first decade and characterized as intractable in three of them. Brain
12 MRI was normal in 9 individuals, and abnormal in 5 patients (hydrocephaly in three individuals, short
13 corpus callosum, Dandy Walker malformation, arachnoid cyst, periventricular white matter lesions,
14 delayed myelination). Sensory anomalies were congenital hearing loss (4 patients), and
15 ophtalmological findings (9 patients) consisting in strabismus, hyperopia, depigmented macule on the
16 iris, oculomotor apraxia or impaired vision of cortical origin.

17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33 The facial features were coarse and very similar among all the individuals: flat face or flat nasal
34 bridge, short nose with anteverted nares, widely spaced eyes, almond-shaped eyes, coarse facial
35 features with thick lips, hirsutism, thick earlobe, full and pink cheeks (Figure 1).

36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Ten patients had pigmentation anomalies, located on Blaschko's lines for nine of them (Figure 2). One
had histiocytofibroma.

Moderate to severe postnatal growth retardation affected 8 patients, who had a length between -2 and -
4.5 standard deviations. Obesity affected 11 individuals, who had a BMI over the 80th centile.
Orthopedic anomalies were frequent (9 individuals), and consisted in flat or club feet, hyperlordosis,
scoliosis, hip dislocation, limitation of elbow extension, genu valgum.

Recurrent infections of the upper airways were noted in four patients; one had a documented
neutropenia. Chronic interstitial lung disease was reported in two patients; nail clubbing was noted in
one individual who did not have pulmonary investigations.

1
2
3 Visceral malformations consisted in congenital heart defect (left ventricle dilatation, aortic
4 insufficiency, patent ductus arteriosus) in three patients, umbilical hernia in two individuals, lateral
5 semicircular canal dysplasia, posterior plagiocephaly, sleep apnea syndrome and hypospadias in one
6 individual each.
7
8
9

10 11 12 13 14 15 Molecular results

16
17
18 The characteristics of the eleven different *de novo* *TFE3* variants identified in the fourteen unrelated
19 individuals are summarized in Table 2 All but one were missense variants, affecting seven different
20 aminoacids. One was a splice donor mutation. Two were localized in exon 3, nine in exon 4 (Figure
21 3). All were absent from public databases and predicted to be pathogenic by prediction softwares.
22
23
24
25

26
27 The putative mosaicism was assessed through X inactivation studies in females and analysis of the
28 exome sequencing data in males, by checking the total number of reads covering the variant, as well as
29 the number of reads supporting the presence of the variant (Table 1). Allele frequencies in female
30 were always consistent with a constitutional heterozygous mutation. X inactivation was skewed in
31 blood of the female patients 1, 5 and 11 and in fibroblasts of Patient 4. X inactivation was random in
32 fibroblasts of Patient 1 and 5. Regarding the male patients, the mutation was identified in 65% of the
33 reads for Patient 7 and 88% of the reads for Patient 3 (106/120). No mosaicism was detected in the
34 blood of Patient 2 and 6 despite the presence of pigmentary manifestations in Patient 6.
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

51 Discussion

52
53
54 Tfe3 functions in signaling of the mechanistic target of rapamycin (mTOR) complex 1 (mTORC1).
55 The PIK3-AKT-mTOR pathway plays a role in the regulation of cellular growth, proliferation,
56 survival and metabolism. Overactivation of the mTOR signaling is responsible for neurocutaneous
57 disorders and cancers[22]. Somatic mutations in *TSC1*, *TSC2*, *AKT3*, *PIK3CA* and *MTOR* are
58
59
60

1
2
3 responsible for focal cortical dysplasia type II (MIM607341)[23–25], hemimegalencephaly[26] and
4 megalencephaly[27]. The phenotype ascribed to germline *TSC1/TSC2*, *PTEN*, *MTOR* and
5 *PK3R2/AKT3/CCND2* mutations – respectively in tuberous sclerosis (TS, MIM 191100), Cowden
6 syndrome (CS, MIM 158350), Smith-Kingsmore syndrome (MIM 616638) and Megalencephaly,
7 Polymicrogyria, Polydactyly and Hydrocephalus syndrome 1, 2 and 3 (MPPH1/2/3, MIM
8 603387/615939/615938) - is characterized by the association of intellectual disability, epilepsy, brain
9 malformations and skin tumours. Similarly, all the individuals harboring a *de novo TFE3* mutation
10 reported in the series presented with a severe neurodevelopmental disorder. Delayed psychomotor
11 development was constant; the youngest patient to acquire independent walking was 30 months old,
12 and more than half of the patients (57%), all aged over 18 months, did not acquire walk at the last
13 examination. Conversely to patients with *MTOR*, *AKT3* or *PTEN* mutation, none of the patients
14 described in this series had macrocephaly. Brain imaging was abnormal in 36% of the patients.
15 Hydrocephaly and corpus callosum dysgenesis, identified in respectively three and one individual,
16 were previously reported in patients with mosaic gain of function *MTOR* mutations[28, 29]. One
17 patient had surgery to remove a histiocytofibroma. Other mesenchymal tumors, such as renal
18 angiomyolipomas and lymphangioliomyomatosis, are hallmarks of tuberous sclerosis. Both belong to
19 the family of perivascular epithelioid cell tumors (PEComas), in which somatic *TSC1* or *TSC2*
20 mutations seem to be as frequent as 60%, and *TFE3* translocations found in more than 20% of the
21 cases[30–32].

22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44 Pigmentation anomalies, along Blaschko's lines or, for one patient, as a large hyperpigmented area,
45 were present in a majority of the individuals (71%) in the series, including 50% of the males and 80%
46 of the females. Pigmentary mosaicism along Blaschko's lines is highly suggestive of genetic
47 mosaicism[33]. Genomic mosaicism is defined by the presence of at least two cell populations with
48 different genotypes in an individual originating from one zygote and mainly occurs through post-
49 zygotic event, whereas females can present with functional (epigenetics) mosaicism due to X
50 inactivation[2]. Pigmentary mosaicism is a classical feature of X-linked male-lethal genodermatosis,
51 such as incontinentia pigmenti (IP, MIM 308300), focal dermal hypoplasia (FDH, MIM305600),
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 chondrodysplasia punctuata type 2 (Conradi-Hunermann-Happle syndrome, CDPX2, MIM 302960)
4 and linear skin defects with multiple congenital anomalies (LSDMCA1, MIM 309801). In these
5 conditions, the overwhelming predominance of affected females is a consequence of the male
6 lethality, and the pigmentary mosaicism a manifestation of the functional mosaicism occurring in
7 females. Similarly, the majority of individuals with *de novo* *TFE3* variants in our cohort were females
8 (sex ratio female/male was 5/2 (2.5)). The study of X-inactivation on non-cultured fibroblasts was
9 consistent with functional mosaicism in two affected females with PM who harbored random X-
10 inactivation, whereas a third female without PM had skewed X-inactivation. In IP, FDH and CDPX2,
11 most hemizygous males die in utero; however, there have been reports of surviving males[34–36] with
12 an estimated prevalence around 10% in FDH and IP[35, 37]. The majority of them are explained by
13 post-zygotic mutations or chromosomal anomalies (Klinefelter syndrome). Non-mosaic males have
14 also been reported in FDH and IP – respectively about 17% and 45% of the affected males harbor a
15 non-mosaic variant[35, 38]. In our series, males represented 29% of the patients with a *de novo* *TFE3*
16 variant. A mosaic variant was identified in blood for half of them; none had Klinefelter syndrome.
17 Interestingly, mosaicism was detected in only one out of the two males with PM, and one male with a
18 mosaic variant had no pigmentation anomalies noted on examination. Of note, the clinical examination
19 of six patients who were referred for syndromic intellectual disability did not include Wood lamp
20 examination; it is therefore possible than subtle pigmentation anomalies were missed. Moreover,
21 somatic mosaicism can be difficult to detect; recent studies have shown that a large proportion of *de*
22 *nov* mutations presumed to be germline had in fact occurred as post-zygotic event[39]. In the males
23 of this cohort, exome sequencing was performed on leucocytes-derived DNA and no other tissue was
24 studied; therefore, it is possible that a low mosaicism was not detected. One individual had body
25 asymmetry, which is another clinical feature pointing towards mosaicism. Pigmentary mosaicism has
26 been reported in patients harboring somatic or germline *MTOR* [28, 29] or *TSC1/TSC2* mutations.
27 Indeed, overactivation of the mTOR pathway has been demonstrated to have a hypopigmentation
28 effect via dysregulation of autophagy in melanocytes[40–42]. As found in 64% of the patients, visual
29 impairment, such as strabismus or refraction anomalies are frequent in neurocutaneous disorders with
30 pigmentation anomalies[43].
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Mice knockout studies showed that *tfe3*-null mice displayed alterations in systemic glucose and lipid
4 metabolism, resulting in enhanced obesity and diabetes, as well as mitochondrial anomalies[44]. By its
5 ability to bind the coordinated lysosomal enhancement and regulation (CLEAR) sites in the promotor
6 region of target genes, TFE3 is involved in the control lysosomal biogenesis, autophagy and
7 endocytosis[8]. Several patients of the series indeed had clinical and biochemical features that pointed
8 toward an inborn error of metabolism. Lysosomal storage disorder was suspected due to the variable
9 association of coarse facial features (all individuals), orthopedic anomalies (64%) –flat or club feet,
10 hyperlordosis, hip dislocation, limitation of elbow extension, genu valgum, scoliosis–, postnatal
11 growth retardation (57%), history of speech or developmental regression (36%) congenital hearing
12 loss (29%), recurrent upper airways infections (29%) neonatal liver anomalies such as hepatomegaly
13 and cholestasis (29%), chronic interstitial lung disease (14%), umbilical hernia (14%), subtle bone
14 changes - shortness of the long bones and metaphyseal enlargement (14%), sleep apnea syndrome
15 (7%) and aortic insufficiency (7%). Other metabolic anomalies observed in the series were obesity,
16 defined in children by body mass index (BMI) (weight/height^2) above the WHO curve, present in the
17 oldest patients (79%), neonatal transient hypoglycemia (14%), and hyperlactatemia (7%).
18 Dysregulation of lipid metabolism, via suppression of thermogenesis and decreased lipolysis, thus
19 leading to increased adipose tissue, was previously observed in adipose-specific TFE3 transgenic
20 mice[45]. More specifically, it has been shown that the release of mTOR-dependant cytoplasmic
21 retention of *TFE3* induced by adipose-specific deletion of *FLCN* lead to induction of the PGC-1
22 transcriptional coactivators, drivers of the browning program in white adipose tissue and
23 mitochondrial biogenesis[46, 47]. Similarly to lysosomes, mitochondrias have a key role in cellular
24 metabolism, including autophagy; recent data demonstrate that mitochondrial and lysosomal
25 metabolisms are interrelated[48]. More precisely, upstream of TFE3, folliculin (*FLCN*) inhibits the
26 AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling, which impairs lysosomal biogenesis[48]. When
27 performed, in two individuals from this cohort, muscle biopsy did not demonstrate evidence of
28 mitochondrial dysfunction, but aspecific anomalies – fat and glycogen accumulation, muscular fiber
29 size irregularity. Interestingly in the more recent data, evidences showing that *TFE3* plays a role in the
30 regulation of the circadian oscillations of the expression of genes involved in autophagy and lipid
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 metabolism, and that Tfe3 knock-out mice had abnormal circadian behaviour[49]. In our series indeed,
4
5 five patients (36%) were noted to have sleeping difficulties, which could be related to an alteration of
6
7 the circadian rhythms. Finally, *TFE3* has been shown to be involved in the regulation of innate
8
9 immune response in macrophages via the FLCN-AMPK signaling axis[50], and of B-lymphocytes
10
11 activation[51]. Along these lines, four patients of the series (29%) had a history or recurrent
12
13 infections, one associated with documented neutropenia. The phenotype ascribed to *TFE3* mutations
14
15 as observed in the patients we report is recognizable, characterized by the association of severe
16
17 intellectual disability, epilepsy, pigmentation anomalies, and specific facial features. Facial
18
19 dysmorphism was strikingly similar and recognizable in a vast majority of the patients of the series: all
20
21 had flat or depressed nasal bridge and round and pink cheeks; more than 70% had anteverted nares,
22
23 almond-shaped eyes, widely spaced eyes, and coarse facial features (thick lips and earlobes); more
24
25 than half had facial hypertrichosis. All individuals presented with at least four of these features. One
26
27 patient had an extreme facial phenotype of hypertelorism, bifid nose and bilateral cleft lip and palate.
28
29 Whether these frontonasal dysplasia features may be associated with the *TFE3* mutation remains
30
31 unclear at that stage; no other mutation in known genes was found in Patient 1's exome sequencing
32
33 data. Finally, it is probable than *TFE3* mutations account for a significant proportion of patients with
34
35 HI. Indeed, in this population, the high frequency of intellectual disability (57%), epilepsy (49%),
36
37 coarse facial features (16%) has long been emphasized in the literature[52].
38
39

40
41
42 *TFE3* is a highly conserved protein, intolerant to loss-of-function as supported by data from the
43
44 GnomAD browser[53] (pLI evaluated at 0.98, observed/expected ratio = 0.06), and to missense
45
46 variants ($Z=2.15$). Moreover, *TFE3* does not, or only in a few tissues, escape X inactivation,
47
48 suggesting that *TFE3* gene dosage is crucial to cell function[54, 55]. In this series, three recurrent
49
50 mutations (Arg117Gln, Thr187Met and Leu191Pro) were present in two patients each. The aminoacid
51
52 in position 187 was mutated in five patients, including two males. The canonical splice site variant in
53
54 intron 4 identified in Patient 13 might lead to in-frame exon skipping of exon 4.
55
56
57
58
59
60

1
2
3 In conclusion, *de novo* mutations in exons 3 and 4 of the X-linked gene *TFE3* are responsible for a
4 neurocutaneous disorder with specific and recognizable facial dysmorphism, lysosomal storage
5 disorder-like features and pigmentary mosaicism. This series unravels *TFE3* as a major gene
6 responsible for hypomelanosis of Ito and for a rare cause of syndromic ID. Furthermore, we provide
7 clinical and molecular data on a previously unidentified lysosomal storage-disorder, in which new
8 insights, especially biochemical features, will probably be investigated further together with the
9 description of more patients. Further delineation of this phenotype will indeed allow a better
10 understanding of the link between lysosomal signaling and development. Finally, the evidence for
11 mosaicism in this recently described disorder highlights the importance of considering mosaic variants
12 on next generation sequencing reports in diagnostic, including for patients without suggestive
13 phenotype.
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29

30 **Acknowledgements**

31 The authors wish to thank the subjects and families involved in the study, and the University of
32 Burgundy Centre de Calcul (CCuB, see Web Resources) for technical support and management of the
33 informatics platform. Several authors of this publication are members of the European Reference
34 Network for Developmental Anomalies and Intellectual Disability (ERN-ITHACA).
35
36
37
38
39
40
41
42
43

44 **Funding**

45 This work was funded by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-PDOC-0029 to J.-B.R.),
46 the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) National 2010 (NCT01950975 to P.V.),
47 the Conseil Régional de Bourgogne through the plan d'actions régional pour l'innovation and the
48 European Union through the PO FEDER-FSE Bourgogne 2014/2020 programs to the GAD team. This
49 study was supported by the URDCat program (PERIS SLT002/16/00174). EV was funded by a grant
50 from the Ministerio de Economía, Industria y Competividad (Juan de la Cierva programme FJCI-
51 2016-28811)
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Competing interest: M. Guillen Sacoto and E. Torti are employees of GeneDx, Inc.

Contributorship statement: DL wrote the paper. AS, MA, VC, MC, ET, BC, IC, LDJ, YD, OE, MJGS, TJ, PK, JSO, JT, KVG, EV performed and interpreted the molecular data. TB, JCS, EDB, FD, AFV, DG, AG, DH, MH, BI, KDL, VLR, LP, KSS, IV, MVH, SVK, CWH referred the patients. PV, JB, CT, JBR, LF planned and supervised the work.

Figures legends

Figure 1. Facial phenotype of the patients. A-D: Patient 10 aged 8 months (A), 20 months (B), 3 years (C, D). Please note the almond-shaped eyes, strabismus, flat nasal bridge, pink cheeks, thick earlobe, coarse facial features and hirsutism. E-F: Patient 11 aged 4 years. Please note the short nose with anteverted nares, flat nasal bridge, and almond-shaped eyes. G-J: Patient 13 aged 3 years (G, H) and 7 years (I, J). Please note the progressive coarseness, the short nose with anteverted nares, depressed nasal bridge, hypertelorism, thick earlobe and full cheeks. K-L: Patient 4 aged 5 years (K) and 20 years (L). Please note the progressive coarsening of the facial features and hirsutism, thick lips, flat nasal bridge, strabismus, and pink cheeks. M-O: Patient 9 aged 6 months (M, N) and 3 years (O). Please note the almond-shape eyes, strabismus, flat nasal bridge, pink cheeks, thick earlobe, progressive coarsening of the facial features and hirsutism. P: Patient 12, aged 5 years. Please note the facial coarseness, hirsutism, flat nasal bridge, short nose with anteverted nares. Q-R: Patient 14, aged 22 years. Please note the flat and coarse face and the thick lower lip. S-U: Patient 5 aged one year (S) and 3 years (T, U). Please note the almond-shaped eyes, strabismus, flat nasal bridge, full cheeks, facial coarsening and hirsutism. V-W: Patient 1 aged 20 years. Please note the hypertelorism, bifid nose, almond-shaped eyes, and hirsutism.

Figure 2. Cutaneous features. A: Patient 5. Umbilical hernia, widely spaced nipples and hypopigmentation on the left side of the abdomen. B: Patient 7. Hypotonia, umbilical hernia, widely

1
2
3 spaced nipples. C: Patient 12. Blaschko's lines on the back. D: Patient 10. Hypopigmentation on the
4
5 left side of the abdomen. E-F: Patient 11. Blaschko's lines on the abdomen and right side of the trunk.
6
7 G: Patient 7. Blaschko's lines on the left side of the abdomen. H: Patient 7. Hand. Note tapering
8
9 fingers and wrinkled skin. I: Patient 1: Linear hypopigmentation on the back. J: Patient 10.
10
11 Blaschko's lines on the back. K: Patient 5: Blaschko's lines on the right lower limb. L: Patient 10.
12
13 Blaschko's lines on the right lower limb. M-N: Patient 11. Linear hyperpigmentation on the lower
14
15 limbs. O: Patient 12. Blaschko's lines on the back.

16
17
18 Figure 3. *TFE3* protein and localization of the missense variants identified. In bold, variant identified
19
20 in two patients.
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

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

Confidential: For Review Only

1
2

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6	Patient 7
3							
4 Sex	F	M	M	F	F	M	M
5 Age	20 years	4 years 5 months	6 years 6 months	20 years	3 years 2 months	7 year	5 years
6 Pregnancy	High serum markers, normal foetal karyotype	Uncomplicated	NA	Uncomplicated	Oligohydramnios, 3 rd trimester IUGR	NA	Uncomplicated
7 Term (WG), birth weight/length/OFC (SD)	36,-1/+0.5/NA	NA, -1/NA/NA	NA	-1.8/-1/-1.8	41, -2/NA/NA	33, NA/NA/NA	Term, -1/NA/+1
8 Neonatal features	-	-	-	-	Hypoglycaemia	Jaundice	Cholestasis, hepatomegaly, hypoglycemia
9 DD/ID	Severe	Severe	Severe	Severe	Severe	Severe (sat 4 years)	Severe
10 Age of walking	Not acquired	30m	3y	40m	Not acquired	Not acquired	Not acquired
11 Speech	No speech	No speech	NA	Few words	No speech	No speech	No speech
12 Epilepsy (age of onset)	+ (7 months)	-	-	+ (10 years)	+ (17 months)	+ (NA)	+ (day 1)
13 Regression (age)	Psychomotor regression (7m)	-	-	Psychomotor regression (9m)	Regression (infancy)	-	-
14 Neurological phenotype	Hypotonia	Hypotonia	-	Hypotonia	-	Hypotonia, spasticity	Hypotonia
15 Behavioural issues	-	Autistic features, hyperactivity	Autism	-	-	Autistic features, abnormal sleep behaviour	Sleeping difficulties
16 Brain MRI	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Arachnoid cyst, Dandy Walker malformation	Hydrocephaly, periventricular white matter lesions
17 Facial phenotype:							Prominent forehead
18 Widely spaced eyes	+	+	-	+	+	+	+
19 Anteverted nares/short nose-	Bifid nose	+/NA	-/NA	+/+	+/+	+/+	+/+
20 Flat nasal bridge	+	+	+	+	+	+	+
21 Hoarseness	+	+	+	+, protruding tongue	+	+	+
22 Hypertrichosis	+	+	-	+	+	+	-
23 Thick lips	+	-	+	+	+	+	-
24 Pink and full cheeks	+	+	+	+	+	+	+
25 Almond-shaped eyes	+	+	-	+	+	+	+
26 Thick earlobes	+	+	-	+	+	+	+
27 Length (SD)	-4.5	+2	-1	-4	-1.4	-2.63	-4.5
28 BMI (centile)	25 (80 th)	16	21.3 (>95 th)	30 (92 th)	17.5 (90 th)	20 (>95 th)	16.6 (80 th)
29 OFC (SD)	NA	0	+1	0	-1	+1.9	-0.4
30 Footpedic anomalies:							
31 Flat feet	+	-	-	+	-	-	+
32 Hyperlordosis	+	+	-	+	-	-	NA
33 Hip dislocation	+	-	-	-	Unilateral dysplasia	-	+
34 Genu valgum	-	-	-	+	-	-	NA
35 Club feet	-	-	-	+	-	+	-
36 Skeletal X-rays	ND	ND	ND	Normal	ND	ND	Normal (thorax)
37 Pigmentation anomalies	+ (Blaschko's lines)	-	-	-	+ (Blaschko's lines)	+ (Blaschko's lines)	+ (Blaschko's lines)
38 Umbilical hernia	-	-	-	-	+	NA	+
39 Eye findings	-	Oculomotor apraxia	Strabismus	Strabismus	Strabismus, impaired vision	Cortical visual impairment, strabismus, amblyopia	-
40 Congenital hearing loss	-	-	-	-	-	+	+
41 Other	Aortic insufficiency	Interstitial lung disease, chronic diarrhoea	Posterior plagiocephaly	-	-	Chronic lung disease, sleep apnea syndrome	+
42 Recurrent infections	-	-	-	-	Chronic upper airways infections	+ (neutropenia)	Bronchomalacia, cardiac left ventricle dilatation, hypospadias, drumstick fingers
43 Metabolic workup	ND	Normal	ND	Normal	Normal alpha-L-iduronidase activity	ND	Normal metabolic screening, fat and glycogen accumulation in muscle, decreased ATP production and substrate

41
42
43
44
45
46

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

							oxidation in muscle
Chromosome X inactivation	Blood: skewed (89%) Fibroblasts: random	-	-	Fibroblasts: skewed	Blood: skewed (>97%) Fibroblasts: random	-	-
TFE3 variant	NM_006521.3:c.356A>C p.Gln119Pro	NM_006521:c.350G>A p.Arg117Gln	NM_006521:c.350G>A: p.Arg117Gln Mosaic (88%)	NM_006521.3:c.557C>T p.Pro186Leu	NM_006521.3:c.560C>T p.Thr187Met	NM_006521.5:c.560C>T p.Thr187Met	NM_006521.3:c.560C>G p.Thr187Arg Mosaic (65%)

1

2

	Patient 8	Patient 9	Patient 10	Patient 11	Patient 12	Patient 13	Patient 14
3 Sex	F	F	F	F	F	F	F
4 Age	18 months	10 years	29 months	4 years 3 months	14 years	10 years	22 years
5 Pregnancy	Uncomplicated	Uncomplicated	Uncomplicated	Ureteral dilatation, gestational diabetes	Uncomplicated	Uncomplicated	Tegretol
6 Term (WG), birth weight/length/OFC (SD)	41, +2/>+3/+2	38, +1/-1/-1	Term, 0/+0.5/+0.5	38, +2/0/0	39, 0/0/NA	39, +1/NA/NA	36+6, 0/NA/NA
8 Neonatal features	Plagiocephaly	Jaundice, transient neonatal hepatomegaly	Feeding difficulties	Neonatal hypotonia, feeding difficulties	-	Neonatal jaundice	Feeding difficulties
9 DD/ID:	Severe (no interaction, low head control)	Severe Not acquired	Severe (head control) Not acquired	Severe (sat at 12 months) Not acquired	Severe 6y	Severe 30m	Severe 7y (walks with assistance)
10 Age of walking		No speech	No speech	No speech	No speech	3y (single words)	No speech
11 Speech							
12 Epilepsy (age of onset)	-	+ (6y)	-	-	+ (4y)	+ (10y)	+ (10y)
13 Regression (age)	-	-	-	-	Loss of words (infancy)	-	Loss of babbling (9m)
14 Neurological phenotype	Severe truncal muscular hypotonia, distal hypertonía	Hypotonia, lower limbs spasticity	-	-	Hypotonia		Increased reflexes, tremor of upper extremities, wide based gait.
15 Behavioural issues	Stereotypic movements	NA	Sleeping difficulties	Hand stereotypies, sleeping difficulties, autism	Happy behaviour. Sleep disorder (melatonin)	Stereotypies (hand flapping) first years	Stereotypic movements
16 Brain MRI	Normal	Short corpus callosum	Hydrocephaly (acqueductal stenosis)	Normal	Normal	Normal	Delayed myelination, prominent CSF spaces in anterior regions
17 Facial phenotype:	High forehead						Broad forehead
18 Widely spaced eyes	+	+	-	-	+	+	-
19 Flat nasal bridge	+	+	+	+	+	+	+
20 Anteverted nares/short nose	+/NA	+/+	+/+	+/+	+/+	+/NA	+/+
21 Coarseness	+	+	+	+	+	+	+, protruding tongue
22 Hypertrichosis	-	+	+	-	+	-	-
23 Thick lips	-	+	-	-	+	+	+
24 Pink and full cheeks	+	+	+	+	+	+	+
25 Almond-shaped eyes	+	+	+	+	+	-	+
26 Thick earlobes	NA	+	+	+	+	+	+
27 Length (SD)	+1.4	-4	-1	+2.5	-3	-2.8	-3.5
28 BMI	19.9 (95 th)	19	18 (90 th)	15.4 (50 th)	22.4 (85 th)	25 (90 th)	21
29 OFC (SD)	+0.7	0	0	+1	-0.5	+0.5	NA
30 Orthopedic anomalies:							
31 Flat feet	-	-	-	+	+	-	+
32 Hyperlordosis/scoliosis	-	-	-	-	+	-	-/+
33 Hip dislocation	-	-	-	-	-	-	-
34 Genu valgum	-	-	-	-	-	-	+
35 Club feet	-	-	-	-	-	-	+
36 Skeletal X-rays	ND	Metaphyseal enlargement	Short metacarpals and long bones	Normal	Normal	ND	ND
37 Pigmentation anomalies	-	Blaschko's lines	Blaschko's lines	Blaschko's lines	Blaschko's lines	Blaschko's lines	Large hyperpigmented region on abdomen
38 Umbilical hernia	-	-	-	-	-	-	NA
39 Eye findings	Hyperopia	Abnomal VEP	Strabismus, depigmented iridian macule	-	Hyperopia	-	-
40 Congenital hearing loss	Unconclusive hearing test	+	+	-	-	-	-
41 Recurrent infections	-	-	+	-	-	-	-
42 Other	-	Nail clubbing	Lateral semicircular canal dysplasia, laryngomalacia	Histiocytofibroma	Patent ductus arteriosus, gastroesophageal reflux	-	Chronic constipation
43 Metabolic workup	Alanine-lysine ratio in plasma <3, elevated lactate in blood	Muscle biopsy: fat accumulation, irregular fibers size	Normal	ND	Hypercholesterolemia. Normal lysosomal activities in leucocytes	MPS, OGS, UAA, OA screening: normal	Normal. Skin biopsy negative for GM1, Niemann-Pick, and Gaucher diseases

41

42

43

44

45

46

1
2

3X inactivation	ND	ND	ND	Blood : skewed (91%)	ND	ND	ND
4 <i>TFE3</i> variant (NM_006521.4)	NM_006521.4:c.559A>C p.Thr187Ala	NM_006521.3:c.572T>C p.Leu191Pro	NM_006521.3:c.572T>C p.Leu191Pro	NM_006521.3:c.602A>C p.Gln201Pro	NM_006521.6:c.560C>A ; p.Thr187Lys	NM_006521.5; c.780+1G>A	NM_006521.5:c.551A>G p.Glu184Gly

5

6 Table 1. Clinical and molecular features of the fourteen patients with a *TFE3* mutation.

7

8

9

BMI: body mass index; DD: developmental delay; ID: intellectual disability; IUGR: intrauterine growth retardation; m: month; MRI: Magnetic Resonance

10

11

Imaging; ND : not done; OFC: occipitofrontal circumference; SD: standard deviation ; VEP: visual evoked potential; WG: weeks of gestation; y: year.

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

Patient	cDNA	Protein	Exon	Function	Status	ExAC	Polyphen	Grantham score	CADD score
1	NM_006521.3:c.356A>C	p.Gln119Pro	3	Missense	Germline	0	0.94	76	16.33
2	NM_006521:c.350G>A	p.Arg117Gln	3	Missense	Germline	0	0.991	43	25.5
3	NM_006521:c.350G>A	p.Arg117Gln	3	Missense	Mosaic	0	0.991	43	25.5
4	NM_006521.3:c.557C>T	p.Pro186Leu	4	Missense	Germline	0	1	98	25.8
5, 6	NM_006521.3:c.560C>T	p.Thr187Met	4	Missense	Germline	0	1	81	21.6
7	NM_006521.3:c.560C>G	p.Thr187Arg	4	Missense	Mosaic	0	1	71	20.7
8	NM_006521.4:c.559A>C	p.Thr187Pro	4	Missense	Germline	0	1	58	16.5
9, 10	NM_006521.3:c.572T>C	p.Leu191Pro	4	Missense	Germline	0	0.994	98	24.1
11	NM_006521.3:c.602A>C	p.Gln201Pro	4	Missense	Germline	0	0.995	76	15.13
12	NM_006521.6:c.560C>A	p.Thr187Lys	4	Missense	Germline	0	1	78	21.6
13	NM_006521.5:c.780+1G>A	-	-	Splice site	Germline	0	-	-	-
14	NM_006521.5:c.551A>G	p.Glu184Gly	4	Missense	Germline	0	1	98	17.81

Table 2. Molecular data of the eleven *de novo* *TFE3* mutations: characteristics, inheritance, frequency in the public database ExAC, prediction scores regarding pathogenicity (Polyphen, Grantham and CADD scores).

References

- 1 Sybert VP. Hypomelanosis of Ito: a description, not a diagnosis. *J Invest Dermatol* 1994;**103**:141S-143S.
- 2 Happle R. The categories of cutaneous mosaicism: A proposed classification. *Am J Med Genet A* 2016;**170A**:452–9.
- 3 Villegas F, Lehalle D, Mayer D, Rittirsch M, Stadler MB, Zinner M, Olivieri D, Vabres P, Duplomb-Jego L, De Bont ESJM, Duffourd Y, Duijkers F, Avila M, Genevieve D, Houcinat N, Jouan T, Kuentz P, Lichtenbelt KD, Thauvin-Robinet C, St-Onge J, Thevenon J, van Gassen KLI, van Haelst M, van Koningsbruggen S, Hess D, Smallwood SA, Riviere J-B, Faivre L, Betschinger J. Lysosomal Signaling Licenses Embryonic Stem Cell Differentiation via Inactivation of Tfe3. *Cell Stem Cell* 2019;**24**:257-270.e8.
- 4 Hemesath TJ, Steingrímsson E, McGill G, Hansen MJ, Vaught J, Hodgkinson CA, Arnheiter H, Copeland NG, Jenkins NA, Fisher DE. microphthalmia, a critical factor in melanocyte development, defines a discrete transcription factor family. *Genes Dev* 1994;**8**:2770–80.
- 5 Lister JA, Lane BM, Nguyen A, Lunney K. Embryonic expression of zebrafish MiT family genes tfe3b, tfeb, and tfec. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat* 2011;**240**:2529–38.
- 6 Yang M, Liu E, Tang L, Lei Y, Sun X, Hu J, Dong H, Yang S-M, Gao M, Tang B. Emerging roles and regulation of MiT/TFE transcriptional factors. *Cell Commun Signal CCS* 2018;**16**:31.
- 7 Martina JA, Diab HI, Lishu L, Jeong-A L, Patange S, Raben N, Puertollano R. The Nutrient-Responsive Transcription Factor TFE3, Promotes Autophagy, Lysosomal Biogenesis, and Clearance of Cellular Debris. *Sci Signal* 2014;**7**:ra9–ra9.
- 8 Martina JA, Diab HI, Li H, Puertollano R. Novel roles for the MiTF/TFE family of transcription factors in organelle biogenesis, nutrient sensing, and energy homeostasis. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2014;**71**:2483–97.
- 9 Jeong E, Brady OA, Martina JA, Pirooznia M, Tunc I, Puertollano R. The transcription factors TFE3 and TFEB amplify p53 dependent transcriptional programs in response to DNA damage. *eLife* 2018;**7**. doi:10.7554/eLife.40856
- 10 Nezich CL, Wang C, Fogel AI, Youle RJ. MiT/TFE transcription factors are activated during mitophagy downstream of Parkin and Atg5. *J Cell Biol* 2015;**210**:435–50.
- 11 Taniguchi M, Yoshida H. TFE3, HSP47, and CREB3 Pathways of the Mammalian Golgi Stress Response. *Cell Struct Funct* 2017;**42**:27–36.
- 12 Pastore N, Brady OA, Diab HI, Martina JA, Sun L, Huynh T, Lim J-A, Zare H, Raben N, Ballabio A, Puertollano R. TFEB and TFE3 cooperate in the regulation of the innate immune response in activated macrophages. *Autophagy* 2016;**12**:1240–58.
- 13 Martina JA, Puertollano R. Protein phosphatase 2A stimulates activation of TFEB and TFE3 transcription factors in response to oxidative stress. *J Biol Chem* 2018;**293**:12525–34.
- 14 Pi H, Li M, Zou L, Yang M, Deng P, Fan T, Liu M, Tian L, Tu M, Xie J, Chen M, Li H, Xi Y,

- 1
2
3 Zhang L, He M, Lu Y, Chen C, Zhang T, Wang Z, Yu Z, Gao F, Zhou Z. AKT inhibition-mediated
4 dephosphorylation of TFE3 promotes overactive autophagy independent of MTORC1 in cadmium-
5 exposed bone mesenchymal stem cells. *Autophagy* 2018;:1–18.
6
7 15 Betschinger J, Nichols J, Dietmann S, Corrin PD, Paddison PJ, Smith A. Exit from
8 Pluripotency Is Gated by Intracellular Redistribution of the bHLH Transcription Factor Tfe3. *Cell*
9 2013;**153**:335–47.
10
11 16 Kauffman EC, Ricketts CJ, Rais-Bahrami S, Yang Y, Merino MJ, Bottaro DP, Srinivasan R,
12 Linehan WM. Molecular genetics and cellular features of TFE3 and TFE3 fusion kidney cancers. *Nat*
13 *Rev Urol* 2014;**11**:465–75.
14
15 17 Yang J, Zhang Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function
16 predictions. *Nucleic Acids Res* 2015;**43**:W174–181.
17
18 18 Sobreira N, Schiettecatte F, Valle D, Hamosh A. GeneMatcher: A Matching Tool for
19 Connecting Investigators with an Interest in the Same Gene. *Hum Mutat* 2015;**36**:928–30.
20
21 19 Thevenon J, Milh M, Feillet F, St-Onge J, Duffourd Y, Juge C, Roubertie A, Heron D, Mignot
22 C, Raffo E, Isidor B, Wahlen S, Sanlaville D, Villeneuve N, Darmency-Stamboul V, Toutain A,
23 Lefebvre M, Chouchane M, Huet F, Lafon A, de Saint Martin A, Lesca G, El Chehadeh S, Thauvin-
24 Robinet C, Masurel-Paulet A, Odent S, Villard L, Philippe C, Faivre L, Riviere J-B. Mutations in
25 SLC13A5 cause autosomal-recessive epileptic encephalopathy with seizure onset in the first days of
26 life. *Am J Hum Genet* 2014;**95**:113–20.
27
28 20 Retterer K, Jussola J, Cho MT, Vitazka P, Millan F, Gibellini F, Vertino-Bell A, Smaoui N,
29 Neidich J, Monaghan KG, McKnight D, Bai R, Suchy S, Friedman B, Tahiliani J, Pineda-Alvarez D,
30 Richard G, Brandt T, Haverfield E, Chung WK, Bale S. Clinical application of whole-exome
31 sequencing across clinical indications. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet* 2016;**18**:696–704.
32
33 21 Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. Methylation of HpaII and
34 HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X
35 chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* 1992;**51**:1229–39.
36
37 22 Mirzaa GM, Poduri A. Megalencephaly and hemimegalencephaly: breakthroughs in molecular
38 etiology. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2014;**166C**:156–72.
39
40 23 Leventer RJ, Scerri T, Marsh APL, Pope K, Gillies G, Maixner W, MacGregor D, Harvey AS,
41 Delatycki MB, Amor DJ, Crino P, Bahlo M, Lockhart PJ. Hemispheric cortical dysplasia secondary to
42 a mosaic somatic mutation in MTOR. *Neurology* 2015;**84**:2029–32.
43
44 24 Lim JS, Kim W, Kang H-C, Kim SH, Park AH, Park EK, Cho Y-W, Kim S, Kim HM, Kim
45 JA, Kim J, Rhee H, Kang S-G, Kim HD, Kim D, Kim D-S, Lee JH. Brain somatic mutations in
46 MTOR cause focal cortical dysplasia type II leading to intractable epilepsy. *Nat Med* 2015;**21**:395–
47 400.
48
49 25 Nakashima M, Saitsu H, Takei N, Tohyama J, Kato M, Kitaura H, Shiina M, Shirozu H,
50 Masuda H, Watanabe K, Ohba C, Tsurusaki Y, Miyake N, Zheng Y, Sato T, Takebayashi H, Ogata K,
51 Kameyama S, Kakita A, Matsumoto N. Somatic Mutations in the MTOR gene cause focal cortical
52 dysplasia type IIb. *Ann Neurol* 2015;**78**:375–86.
53
54 26 Lee JH, Huynh M, Silhavy JL, Kim S, Dixon-Salazar T, Heiberg A, Scott E, Bafna V, Hill KJ,

1
2
3 Collazo A, Funari V, Russ C, Gabriel SB, Mathern GW, Gleeson JG. De novo somatic mutations in
4 components of the PI3K-AKT3-mTOR pathway cause hemimegalencephaly. *Nat Genet* 2012;**44**:941–
5 5.

7
8 27 Mirzaa GM, Campbell CD, Solovieff N, Goold C, Jansen LA, Menon S, Timms AE, Conti V,
9 Biag JD, Adams C, Boyle EA, Collins S, Ishak G, Poliachik S, Girisha KM, Yeung KS, Chung BHY,
10 Rahikkala E, Gunter SA, McDaniel SS, Macmurdo CF, Bernstein JA, Martin B, Leary R, Mahan S,
11 Liu S, Weaver M, Doerschner M, Jhangiani S, Muzny DM, Boerwinkle E, Gibbs RA, Lupski JR,
12 Shendure J, Saneto RP, Novotny EJ, Wilson CJ, Sellers WR, Morrissey M, Hevner RF, Ojemann JG,
13 Guerrini R, Murphy LO, Winckler W, Dobyns WB. Wide spectrum of developmental brain disorders
14 from megalencephaly to focal cortical dysplasia and pigmentary mosaicism caused by mutations of
15 MTOR. *JAMA Neurol* 2016;**73**:836–45.

17
18 28 Handoko M, Emrick LT, Rosenfeld JA, Wang X, Tran AA, Turner A, Belmont JW, Lee BH,
19 Bacino CA, Chao H-T. Recurrent mosaic MTOR c.5930C > T (p.Thr1977Ile) variant causing
20 megalencephaly, asymmetric polymicrogyria, and cutaneous pigmentary mosaicism: Case report and
21 review of the literature. *Am J Med Genet A* 2019;**179**:475–9.

23
24 29 Mirzaa GM, Campbell CD, Solovieff N, Goold CP, Jansen LA, Menon S, Timms AE, Conti
25 V, Biag JD, Olds C, Boyle EA, Collins S, Ishak G, Poliachik SL, Girisha KM, Yeung K-S, Chung
26 BHY, Rahikkala E, Gunter SA, McDaniel SS, Macmurdo CF, Bernstein JA, Martin B, Leary RJ,
27 Mahan S, Liu S, Weaver M, Dorschner MO, Jhangiani S, Muzny DM, Boerwinkle E, Gibbs RA,
28 Lupski JR, Shendure J, Saneto RP, Novotny EJ, Wilson CJ, Sellers WR, Morrissey MP, Hevner RF,
29 Ojemann JG, Guerrini R, Murphy LO, Winckler W, Dobyns WB. Association of MTOR Mutations
30 With Developmental Brain Disorders, Including Megalencephaly, Focal Cortical Dysplasia, and
31 Pigmentary Mosaicism. *JAMA Neurol* 2016;**73**:836–45.

33
34 30 Thway K, Fisher C. PEComa: morphology and genetics of a complex tumor family. *Ann*
35 *Diagn Pathol* 2015;**19**:359–68.

37
38 31 Kim H, Kim J, Lee SK, Cho EY, Cho SY. TFE3-Expressing Perivascular Epithelioid Cell
39 Tumor of the Breast. *J Pathol Transl Med* 2019;**53**:62–5.

41
42 32 Agaram NP, Sung Y-S, Zhang L, Chen C-L, Chen H-W, Singer S, Dickson MA, Berger MF,
43 Antonescu CR. Dichotomy of Genetic Abnormalities in PEComas With Therapeutic Implications. *Am*
44 *J Surg Pathol* 2015;**39**:813–25.

46
47 33 Happle R. [How frequently does genetic mosaicism occur in the skin?]. *Hautarzt Z Dermatol*
48 *Venerol Verwandte Geb* 2014;**65**:536–41.

50
51 34 Kenwick S, Woffendin H, Jakins T, Shuttleworth SG, Mayer E, Greenhalgh L, Whittaker J,
52 Rugolotto S, Bardaro T, Esposito T, D'Urso M, Soli F, Turco A, Smahi A, Hamel-Teillac D, Lyonnet
53 S, Bonnefont JP, Munnich A, Aradhya S, Kashork CD, Shaffer LG, Nelson DL, Levy M, Lewis RA.
54 Survival of male patients with incontinentia pigmenti carrying a lethal mutation can be explained by
55 somatic mosaicism or Klinefelter syndrome. *Am J Hum Genet* 2001;**69**:1210–7.

57
58 35 Frisk S, Grandpeix-Guyodo C, Popovic Silwerfeldt K, Hjartarson HT, Chatzianastassiou D,
59 Magnusson I, Laurell T, Nordgren A. Goltz syndrome in males: A clinical report of a male patient
60 carrying a novel PORCN variant and a review of the literature. *Clin Case Rep* 2018;**6**:2103–10.

36 Honigman A, De Cruz R, Sinclair R, Winship I. Chondrodysplasia punctata (CDPX2) in a

- 1
2
3 male caused by single-gene mosaicism: A. *Australas J Dermatol* Published Online First: 7 October
4 2018. doi:10.1111/ajd.12938
5
- 6 37 Fusco F, Paciolla M, Conte MI, Pescatore A, Esposito E, Mirabelli P, Lioi MB, Ursini MV.
7 Incontinentia pigmenti: report on data from 2000 to 2013. *Orphanet J Rare Dis* 2014;**9**:93.
8
- 9 38 Alabdullatif Z, Coulombe J, Steffann J, Bodemer C, Hadj-Rabia S. Postzygotic mosaicism and
10 incontinentia pigmenti in male patients: molecular diagnosis yield. *Br J Dermatol* 2018;**178**:e261–2.
11
- 12 39 Acuna-Hidalgo R, Bo T, Kwint MP, van de Vorst M, Pinelli M, Veltman JA, Hoischen A,
13 Vissers LELM, Gilissen C. Post-zygotic Point Mutations Are an Underrecognized Source of De Novo
14 Genomic Variation. *Am J Hum Genet* 2015;**97**:67–74.
15
- 16 40 Tsao Y-T, Huang Y-F, Kuo C-Y, Lin Y-C, Chiang W-C, Wang W-K, Hsu C-W, Lee C-H.
17 Hinokitiol Inhibits Melanogenesis via AKT/mTOR Signaling in B16F10 Mouse Melanoma Cells. *Int J*
18 *Mol Sci* 2016;**17**:248.
19
- 20 41 Jeong H-S, Lee SH, Yun H-Y, Baek KJ, Kwon NS, Park K-C, Kim D-S. Involvement of
21 mTOR signaling in sphingosylphosphorylcholine-induced hypopigmentation effects. *J Biomed Sci*
22 2011;**18**:55.
23
- 24 42 Yang F, Yang L, Wataya-Kaneda M, Hasegawa J, Yoshimori T, Tanemura A, Tsuruta D,
25 Katayama I. Dysregulation of autophagy in melanocytes contributes to hypopigmented macules in
26 tuberous sclerosis complex. *J Dermatol Sci* 2018;**89**:155–64.
27
- 28 43 Chernoff KA, Schaffer JV. Cutaneous and ocular manifestations of neurocutaneous
29 syndromes. *Clin Dermatol* 2016;**34**:183–204.
30
- 31 44 Pastore N, Vainshtein A, Klisch TJ, Armani A, Huynh T, Herz NJ, Polishchuk EV, Sandri M,
32 Ballabio A. TFE3 regulates whole-body energy metabolism in cooperation with TFEB. *EMBO Mol*
33 *Med* 2017;**9**:605–21.
34
- 35 45 Fujimoto Y, Nakagawa Y, Satoh A, Okuda K, Shingyouchi A, Naka A, Matsuzaka T, Iwasaki
36 H, Kobayashi K, Yahagi N, Shimada M, Yatoh S, Suzuki H, Yogosawa S, Izumi T, Sone H, Urayama
37 O, Yamada N, Shimano H. TFE3 Controls Lipid Metabolism in Adipose Tissue of Male Mice by
38 Suppressing Lipolysis and Thermogenesis. *Endocrinology* 2013;**154**:3577–88.
39
- 40 46 Wada S, Arany Z. Adipose tissue browning: mTOR branches out. *Cell Cycle Georget Tex*
41 2017;**16**:493–4.
42
- 43 47 Wada S, Neinast M, Jang C, Ibrahim YH, Lee G, Babu A, Li J, Hoshino A, Rowe GC, Rhee J,
44 Martina JA, Puertollano R, Blenis J, Morley M, Baur JA, Seale P, Arany Z. The tumor suppressor
45 FLCN mediates an alternate mTOR pathway to regulate browning of adipose tissue. *Genes Dev*
46 2016;**30**:2551–64.
47
- 48 48 Fernandez-Mosquera L, Yambire KF, Couto R, Pereyra L, Pabis K, Ponsford AH, Diogo CV,
49 Stagi M, Milosevic I, Raimundo N. Mitochondrial respiratory chain deficiency inhibits lysosomal
50 hydrolysis. *Autophagy* 2019;:1–20.
51
- 52 49 Pastore N, Vainshtein A, Herz NJ, Huynh T, Brunetti L, Klisch TJ, Mutarelli M, Annunziata
53 P, Kinouchi K, Brunetti-Pierri N, Sassone-Corsi P, Ballabio A. Nutrient-sensitive transcription factors
54 TFEB and TFE3 couple autophagy and metabolism to the peripheral clock. *EMBO J* 2019;**38**.
55
56
57
58
59
60

1
2
3 doi:10.15252/embj.2018101347
4

5 50 El-Houjeiri L, Possik E, Vijayaraghavan T, Paquette M, Martina JA, Kazan JM, Ma EH, Jones
6 R, Blanchette P, Puertollano R, Pause A. The Transcription Factors TFEB and TFE3 Link the FLCN-
7 AMPK Signaling Axis to Innate Immune Response and Pathogen Resistance. *Cell Rep* 2019;**26**:3613-
8 3628.e6.
9

10 51 Merrell K, Wells S, Henderson A, Gorman J, Alt F, Stall A, Calame K. The absence of the
11 transcription activator TFE3 impairs activation of B cells in vivo. *Mol Cell Biol* 1997;**17**:3335–44.
12
13

14 52 Pascual-Castroviejo I, Roche C, Martinez-Bermejo A, Arcas J, Lopez-Martin V, Tendero A,
15 Esquiroz JL, Pascual-Pascual SI. Hypomelanosis of ITO. A study of 76 infantile cases. *Brain Dev*
16 1998;**20**:36–43.
17

18 53 Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, Collins RL,
19 Laricchia KM, Ganna A, Birnbaum DP, Gauthier LD, Brand H, Solomonson M, Watts NA, Rhodes D,
20 Singer-Berk M, Seaby EG, Kosmicki JA, Walters RK, Tashman K, Farjoun Y, Banks E, Poterba T,
21 Wang A, Seed C, Whiffin N, Chong JX, Samocha KE, Pierce-Hoffman E, Zappala Z, O'Donnell-
22 Luria AH, Vallabh Minikel E, Weisburd B, Lek M, Ware JS, Vittal C, Armean IM, Bergelson L,
23 Cibulskis K, Connolly KM, Covarrubias M, Donnelly S, Ferriera S, Gabriel S, Gentry J, Gupta N,
24 Jeandet T, Kaplan D, Llanwarne C, Munshi R, Novod S, Petrillo N, Roazen D, Ruano-Rubio V,
25 Saltzman A, Schleicher M, Soto J, Tibbetts K, Tolonen C, Wade G, Talkowski ME, Neale BM, Daly
26 MJ, MacArthur DG. Variation across 141,456 human exomes and genomes reveals the spectrum of
27 loss-of-function intolerance across human protein-coding genes. *bioRxiv* 2019;:531210.
28
29

30 54 Carrel L, Willard HF. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene
31 expression in females. *Nature* 2005;**434**:400–4.
32
33

34 55 Cotton AM, Price EM, Jones MJ, Balaton BP, Kobor MS, Brown CJ. Landscape of DNA
35 methylation on the X chromosome reflects CpG density, functional chromatin state and X-
36 chromosome inactivation. *Hum Mol Genet* 2015;**24**:1528–39.
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Facial phenotype of the patients. A-D: Patient 10 aged 8 months (A), 20 months (B), 3 years (C, D). Please note the almond-shaped eyes, strabismus, flat nasal bridge, pink cheeks, thick earlobe, coarse facial features and hirsutism. E-F: Patient 11 aged 4 years. Please note the short nose with anteverted nares, flat nasal bridge, and almond-shaped eyes. G-J: Patient 13 aged 3 years (G, H) and 7 years (I, J). Please note the progressive coarseness, the short nose with anteverted nares, depressed nasal bridge, hypertelorism, thick earlobe and full cheeks. K-L: Patient 4 aged 5 years (K) and 20 years (L). Please note the progressive coarsening of the facial features and hirsutism, thick lips, flat nasal bridge, strabismus, and pink cheeks. M-O: Patient 9 aged 6 months (M, N) and 3 years (O). Please note the almond-shape eyes, strabismus, flat nasal bridge, pink cheeks, thick earlobe, progressive coarsening of the facial features and hirsutism. P: Patient 12, aged 5 years. Please note the facial coarseness, hirsutism, flat nasal bridge, short nose with anteverted nares. Q-R: Patient 14, aged 22 years. Please note the flat and coarse face and the thick lower lip. S-U: Patient 5 aged one year (S) and 3 years (T, U). Please note the almond-shaped eyes, strabismus, flat nasal bridge, full cheeks, facial coarsening and hirsutism. V-W: Patient 1 aged 20 years. Please note the hypertelorism, bifid nose, almond-shaped eyes, and hirsutism.

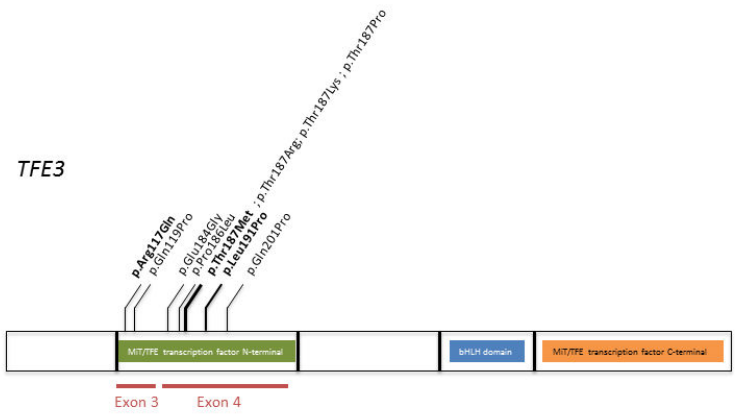
254x190mm (96 x 96 DPI)



Cutaneous features. A: Patient 5. Umbilical hernia, widely spaced nipples and hypopigmentation on the left side of the abdomen. B: Patient 7. Hypotonia, umbilical hernia, widely spaced nipples. C: Patient 12. Blaschko's lines on the back. D: Patient 10. Hypopigmentation on the left side of the abdomen. E-F: Patient 11. Blaschko's lines on the abdomen and right side of the trunk. G: Patient 7. Blaschko's lines on the left side of the abdomen. H: Patient 7. Hand. Note tapering fingers and wrinkled skin. I: Patient 1: Linear hypopigmentation on the back. J: Patient 10. Blaschko's lines on the back. K: Patient 5: Blaschko's lines on the right lower limb. L: Patient 10. Blaschko's lines on the right lower limb. M-N: Patient 11. Linear hyperpigmentation on the lower limbs. O: Patient 12. Blaschko's lines on the back.

254x190mm (96 x 96 DPI)

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



TFE3 protein and localization of the missense variants identified. In bold, variant identified in two patients.

254x190mm (96 x 96 DPI)

Patient 1

The female patient was the first child of non-related parents. The family history was unremarkable except for a labial pit in her mother and a unilateral cleft lip and palate in her maternal grandfather. Antenatal karyotype was performed due to high serum markers, which showed a normal result. She was born at 34 weeks of gestation, with normal birth weight (30th centile) and length (60th centile). Examination revealed bilateral cleft lip and palate, hypo-pigmented areas on the back along Blaschko's lines, and a bilateral hip dislocation. Because of the cleft lip and palate in the context of the family history, Van Der Woude syndrome was suspected; *IRF6* testing by Sanger sequencing was negative. Early milestones were reported as normal until 7 months, when she developed generalized epilepsy and psychomotor regression. When she was referred to a clinical geneticist, at 14 years, she had severe intellectual disability. She could not walk independently, had no speech. She had growth retardation, with length at -4.5 S.D. and obesity (body mass index (BMI) +3 S.D.). OFC was average. Orthopedic examination showed slightly asymmetric and short lower limbs, flat feet and hyperlordosis. Facial dysmorphism was striking with bifid nose, hypertelorism, hypertrichosis and coarse features. Echocardiography demonstrated asymptomatic aortic insufficiency.

Patient 2

This patient is a 4.5-year-old boy, born with birth weight 2890 g. after an uneventful pregnancy. His parents are healthy, non-consanguineous, of Ashkenazi-Jewish ancestry. A younger brother is healthy. Since infancy he was noted to have developmental delay as he did not follow objects or smiled by 7 months. However, his motor development has been relatively spared: he started to roll over at 5.5 months and was able to walk by himself at 2.5 years. Currently, he is able to climb upstairs with assistance and his gait is characterized by hypotonia and hyperlordosis. Speech development is severely affected and he does not pronounce any words at the age of 4.5 years. He has severe intellectual disability, his comprehension being consistent with a one year-old child. His behavior is characterized by autistic features and significant hyperactivity and distractibility. He is currently attending a special education program for autistic spectrum disorder. The child needs assistance in all

1
2
3 daily activities. In early childhood, following recurrent respiratory infections in the presence of
4 persistent very low oxygen saturation (65-90%), he was diagnosed with interstitial lung disease.
5
6
7 Lately, his respiratory function has improved, with oxygen saturation >90% and no need for oxygen
8
9 supplementation. He also has chronic diarrhea of unknown etiology following workup. On physical
10
11 examination, facial dysmorphism is noted: coarse face, hypertrichosis, flat nasal bridge, anteverted
12
13 nares, pink and full cheeks, low set ears and hyperlaxity of joints. Weight is in 75th percentile and
14
15 length in 90th percentile. Body mass index (BMI) is 16. Head circumference is in 50th percentile. On
16
17 neurological examination, he has hypotonia with increased deep tendon reflexes and oculomotor
18
19 apraxia. His visual function is normal, but he is unable to focus his gaze and he has limited eye
20
21 contact. In the past he was suspected of having cortical visual impairment, which was ruled out.
22
23 Metabolic workup, brain imaging, echocardiography, hearing testing and ophthalmologic examination,
24
25 including VER and ERG, were normal. Genetic analysis using WES detected a *de novo* missense
26
27 mutation in the X-linked *TFE3* gene.
28
29

30 31 Patient 3

32
33
34 He was a male of European origin with unremarkable family history and neonatal course. He had
35
36 severe developmental delay, walked at 3 years, and speech delay. He was referred in genetics clinic at
37
38 6 years and 6 months. His weight was on +1SD, length -1 SD, OFC +1SD. He had intellectual
39
40 disability and autistic features. Facial features were remarkable by their coarseness, flat nasal bridge,
41
42 epicanthus, thick lips and posterior plagiocephaly. He had strabismus. Brain MRI was normal.
43
44

45 Patient 4

46
47
48 She was the first child of unrelated parents, born at 39 weeks of gestation following an uneventful
49
50 pregnancy. Birth weight was on 5th centile, length on 10th centile, OFC on 10th centile. Neonatal
51
52 examination showed bilateral clubfeet. Her first year of life was marked by recurrent infections and by
53
54 rapid weight gain. Psychomotor development was normal until 9 months; she then made very slow
55
56 progress, walked at 40 months, and then went in a school for children with special needs. She
57
58 developed generalized epilepsy from 10 years with tonic-clonic seizures. Behavioural issues were
59
60

1
2
3 noted from teenage, treated by antipsychotic drug. On the last examination at 20 years old, she could
4 speak a few words. Her weight was on +4 S.D., length -4 S.D, BMI 30. She had coarse facial features,
5 hypertelorism, flat nasal bridge, anteverted nares, full mouth, thick gums, protruding tongue, facial
6 hypertrichosis and convergent strabismus. Orthopedic examination showed hyperlordosis, limitation in
7 elbow extension, genu valgum, flat feet, small hands and feet. Bone age on the X-ray, as well as the
8 spine, were normal. Blood glucose level was normal, and there was no hepatomegaly on the
9 abdominal ultrasound.
10
11
12
13
14
15
16
17

18 Patient 5

21 She was the first child of nonrelated healthy parents. Pregnancy was complicated by oligohydramnios
22 and third trimester intra-uterine growth retardation. She was born at 41 weeks of gestation with a low
23 birthweight on the 2nd percentile, and was admitted for hypoglycemia in the first two weeks of life. At
24 6 months she was noted to have delayed milestones and a poor eye contact. She developed tonic
25 seizures from 18 months. Brain MRI brain was normal, EEG showed an abnormal pattern with
26 epileptic encephalopathy and multifocal spikes. She had chronic upper airway infections in the winter,
27 periods during which the parents reported she did not make any developmental progress or even
28 regressed. At examination at 3 years old, she could roll over but could not walk or grasp objects; she
29 made sounds but no words. She had linear and whorled hyperpigmentation all over the body except on
30 the face, palms and soles. Growth parameters were in the normal ranges. She was noted to have
31 umbilical hernia, strabismus and a single palmar crease. The facial features were remarkable by
32 synophris, hypertrichosis, full cheeks and lips, flat nasal bridge, hypertelorism and thick eyebrows. In
33 the context of the pigmentary changes, chromosomal mosaicism was considered, and a skin biopsy
34 was performed, showing a mosaic translocation t(X;11) with a microdeletion of Xp22.3 in 1 out of 2
35 cell-cultures; the deletion contained no genes of which haploinsufficiency was known to cause
36 developmental delay and seizures and was therefore not considered to be causative for the phenotype.
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54

55 Patient 6

56
57
58
59
60

1
2
3 He was a male referred to the Genetics Department at 5 years old for developmental delay, chronic
4 lung disease, epilepsy, sensorineural hearing loss, obstructive sleep apnea, gastro-oesophageal reflux,
5 dysphagia and neutropenia. A younger brother had autism. He had a history of premature birth at 33
6 weeks gestation, and neonatal period was remarkable by jaundice for which he received phototherapy.
7
8 He sat at 4 years. At 7, he could not walk independently, had no speech. On examination, his BMI was
9 over the 90th centile, he had growth retardation (length on -2.63 SD). His neurologic examination
10 showed autistic features and tight heel cords. He had facial dysmorphism, cutaneous rash and livedo
11 reticularis with pigmentary changes, and a right foot deformity. Brain MRI demonstrated arachnoid
12 cyst and Dandy Walker malformation.
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

23 Patient 7

24
25 He was born from unrelated parents with no family history. The pregnancy was unremarkable. He was
26 born at term by caesarean section for fetal distress, with all growth parameters around -2 SD and
27 Apgar score at 8 and 9. He was admitted in the neonatal period for seizures on the first day of life,
28 neonatal hypoglycemia due to hyperinsulinism, transient renal insufficiency (acute tubular necrosis),
29 bronchomalacia, and cholestasis. Examination revealed hepatomegaly, hypotonia, umbilical and
30 inguinal hernias. He had severely delayed milestones. Aortapexia was performed for bronchomalacia.
31 A dilated cardiomyopathy was noted that improved over time to a slight left ventricle dilatation at this
32 moment in time. When he was referred at 5 years old, he could not walk or speak, and had severe
33 perceptible hearing loss. He had pigmentation anomalies along Blaschko's lines on trunk and back, ,
34 his extremities were disproportionally small, flat feet and growth retardation on -4.5 SD. Facial
35 features were coarse, he had a prominent forehead, flat nasal bridge and full cheeks. The EEG showed
36 epileptic activity and brain imaging widened ventricles and peripheral liquor spaces as well as some
37 periventricular white matter hyperintensities. Metabolic screening in blood, urine and liquor did not
38 show abnormalities but a muscle biopsy did show signs of fat- and glycogen accumulation. Also
39 decreased ATP production and substrate oxidation was noted in muscle cells of the patient, although
40 enzyme activity of the mitochondrial complexes was normal. The patient was thought to have an
41 unknown lysosomal storage disorder.
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Patient 8

She was the first child of her healthy and not related parents from European decent. She was born after uncomplicated pregnancy by spontaneous vaginal delivery at 41+2 weeks. The birth weight was 4370 g (+1.8 SD), the birth length 58 cm (+2.6 SD) and the OFC at birth 36 cm (+0.6 SD). APGAR 10 and 10 at minute five and ten, respectively. The neonatal period was described as uncomplicated despite long-lasting feeding. At 6 weeks of life physiotherapy was initiated due to scull asymmetry and pigeon toes. At the age of two months poor fixation with eyes and interaction were obvious. At 9 months global development delay, muscular hypotonia and hearing deficits were diagnosed. An extended work up at age of 12 months revealed abnormal profile in aminoacids in plasma (elevated alanine-lysine ration), elevated lactate in blood, inconclusive hearing testing and hyperopia. Karyotyping gave normal result; CGH-array discovered a 0.1 Mb duplication in 19p13.3 of uncertain significance. The further development was slow. At last examination at age of 18 months we saw a restless girl with severe global developmental delay, stereotypic movements, poor social interaction, severe truncal muscular hypotonia and hypertonia in legs. The head control was insufficient and she was not able to sit or to crawl but she could roll over from belly to back. She did not grasp but transferred objects from one hand to the other. She expressed emotions by sounds but she did not spoke a word. Facial dysmorphism consisted in coarseness, flat profile, high forehead, hypertelorism and small eyes, depressed nasal bridge and short nose, small mouth with small teeth, full and pink cheeks. The measurements were above the age related average with a weight of 14.7 kg (+2.4 SD, length 86 cm (+1.4 SD) and OFC 48 cm (+0.7 SD). MRI of brain was normal.

Patient 9

She was born from unrelated healthy parents. She was born full term (36 WG) after uncomplicated pregnancy. Birth weight was +1.5 SD, length was +0.5 SD., OFC +0.5 SD. She had transient neonatal hepatomegaly and jaundice. She developed severe ID, with central hypotonia and peripheral spastic paraplegia. She had bilateral congenital hearing loss. On examination she had hypopigmentation following Blaschko's lines, and facial dysmorphism with progressive coarsening and hirsutism. She

1
2
3 developed epilepsy at 6 years old. At 10 years old she had growth retardation on -4 SD. Bone X-rays
4 demonstrated moderate metaphyseal enlargement. Metabolic workup, including lactate,
5 glycosaminoglycans, very long chain fatty acid, transferrin, plasmatic aminoacids, urinary organic
6 acids, phytanic and pristanic acids, lysosomal enzymes and neurotransmitters in the cerebrospinal
7 fluid, was normal. Muscle biopsy showed an irregular size of the fibers with increased lipid
8 accumulation, no COX-negative fibers, no Ragged Red fibers, no structural anomalies. Mitochondrial
9 DNA sequencing on DNA extracted from muscle tissue was normal. Brain MRI showed a short corpus
10 callosum.
11
12
13
14
15
16
17
18
19

20 Patient 10

21
22
23 She was the first child of unrelated parents from Portugal. Family history was unremarkable. She was
24 born at term after a normal pregnancy. Birth weight was 2690g (0 SD), length 46.5 cm (-1 SD), and
25 OFC 33 cm (-1 SD). Apgar was 10/10. She had feeding difficulties and laryngomalacia in the first
26 days of life. At seven months she had surgery for triventricular hydrocephalus due to aqueductal
27 stenosis. Profound congenital hearing loss was diagnosed. She was referred to the genetics clinic at 8
28 months for developmental delay and pigmentation anomalies. She could smile but had no head
29 control. She had hypopigmentation on Blaschko's lines, hypotonia and facial dysmorphism with and
30 synophrys, thick eyebrows, and hypertelorism. Array CGH was normal on blood and fibroblasts. She
31 had chronic bronchic infections. At last examination at 29 months, head control was unstable, she
32 made sounds, could roll over. Growth parameters were normal (weight on 0SD, length on -1SD, OFC
33 on 0SD). She had normal heart and abdominal ultrasound. Ophthalmological exam showed an iridian
34 depigmented macule. Metabolic workup (including very long chain fatty acids and lysosomal
35 enzymes) was normal.
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

51 Patient 11

52
53
54 She was the first child born from unrelated parents. The mother has deafness as well as her two
55 brothers. Pregnancy was marked by the discovery of ureteral dilatation at 5 months of gestation in a
56 context of maternal gestational diabetes. She was born at 36 weeks of gestation, with fetal macrosomia
57
58
59
60

1
2
3 (weight +3 SD, length +2 SD occipitofrontal circumference +2.5 SD). She presented with neonatal
4 hypotonia and feeding difficulties. She sat at 12 months of age. At last examination at 4 years and 3
5 months of age she was unable to stand and walk alone, had no speech. She presented sleep disturbance
6 and hand stereotypies. Her weight was +1.5 SD, length was +2.5 SD with a parental target size at +1.2
7 SD and her OFC was +1 SD. BMI was 15.4. She had surgery for an histiocytofibroma. Brain MRI,
8 skeletal X-rays, eye and auditive exams were normal.
9

16 Patient 12

17
18 She was born following the first uncomplicated pregnancy of healthy non consanguineous parents.
19 Younger's sister was healthy. She was born at term 39 weeks of gestation and 3 days, with eutocic
20 delivery. Relevant hypotonia was detected and she received support since 10 months of age. Motor
21 milestones were delayed. A metabolic disorder was suspected but without any anomaly on the
22 metabolic workup. Mucopolysaccharidosis were ruled out, lysosomal enzymatic activities in
23 leucocytes were normal. Genetic tests were performed: karyotype, CGH array in dark and light skin
24 and *MECP2* sequencing gave normal results.
25
26
27
28
29
30
31
32
33

35 Patient 13

36
37 Patient 13 is a 10-year-old female born at 39 weeks of gestation after an uneventful pregnancy with
38 normal growth parameters (weight of 3.7kg, 87th P). Neonatal period was uneventful, except neonatal
39 jaundice. She began to walk at 30 months and first words were delayed. Because of this global
40 developmental delay, she was referred for clinical genetic evaluation at 3 years of age. Physical
41 examination revealed pigmentary changes on her back on Blaschko's lines and dysmorphic features
42 with coarseness, anteverted nares, short nose, depressed nasal bridge, hypertelorism, thick lower lip
43 and full cheeks. Her weight and head size were on the 50th and 25th centile respectively, while her
44 height was between 0.4th and 2nd centile. Because of her coarse features, metabolic screening
45 (including MPS, OGS, UAA, OA) was performed and showed normal results. At 8 years-old, she was
46 still slow with her learning, communicated via single words and learnt phrases, understood single
47 instructions. Brain MRI was normal.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 This patient was included in the DDD study. Exome sequencing identified a *de novo* hemizygous
4 splice donor mutation c.780+1G>A (GRCh37) in exon 4 of the *TFE3* gene (NM_006521.5). This has
5 not been previously reported in patient (ClinVar) or control databases (1000Genomes, ExAC,
6 gnomAD).
7
8
9

10 Patient 14

11
12 She is a 22 years old female. Mother's pregnancy prior to Patient 14's was diagnosed with severe
13 Dandy Walker syndrome and agenesis of the corpus callosum among other malformations and was
14 terminated. Mother took Tegretol during the pregnancy that was otherwise uncomplicated. Labor
15 started at 3 weeks and 1 day early and she had a C section for failure to progress. She was 2900g with
16 no concerns for distress. Mom did not breastfeed due to her own seizure medications. She had a poor
17 suck from birth, but did put on weight. At 6 months, her mother noted that she was delayed, but the
18 pediatrician was not yet concerned. She rolled at 4-5 months. She laughed at 4 months and started to
19 babble around nine months but stopped both of these at nine months. She sat at 11 months. She walked
20 at 7 years, and has had more difficulty walking as she's gotten bigger and older and currently walks
21 with 2 person assistance with a wide based gait. She has near continuous hand movements and rocking
22 back and forth with continuous humming /moaning broken up by yells, does not follow commands.
23 Eye movements are grossly intact, strength is antigravity with resistance. She has increased reflexes
24 throughout, poor coordination with tremor of upper extremities. She has never had spoken words
25 besides mama and yaya. Now mother uses cards to spell out words and ipads for communication. Her
26 seizures started at age 2 shortly after she got her first period at age 10. These were predominately
27 generalized tonic clonic seizures, and were difficult to manage. She has also had abnormal movements
28 and tremors that were not seizures. MRI at age 12 months was noted in previous notes to have delayed
29 myelination prominent CSF spaces in bilateral anterior regions. She was seen by genetics in 2011. At
30 that time a SNP array was sent and was normal. She has had a normal kidney US and ophthalmologic
31 exam. She had a liver US noting "coarse texture". Screening for lysosomal storage disorders was
32 negative and ruled out Salla disease, Wilson's disease, urine organic acids, plasma amino acids, sialic
33 acid, oligosaccharides, lactate, pyruvate, VLCFA, cholesterol, triglycerides, copper,
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 and ceruloplasmin. She reportedly underwent skin biopsy that was negative for GM1, Niemann-Pick,
4
5 and Gaucher disease. Fragile X syndrome analysis was negative.
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Confidential: For Review Only

4. Variations ponctuelles post-zygotiques : résultats non publiés

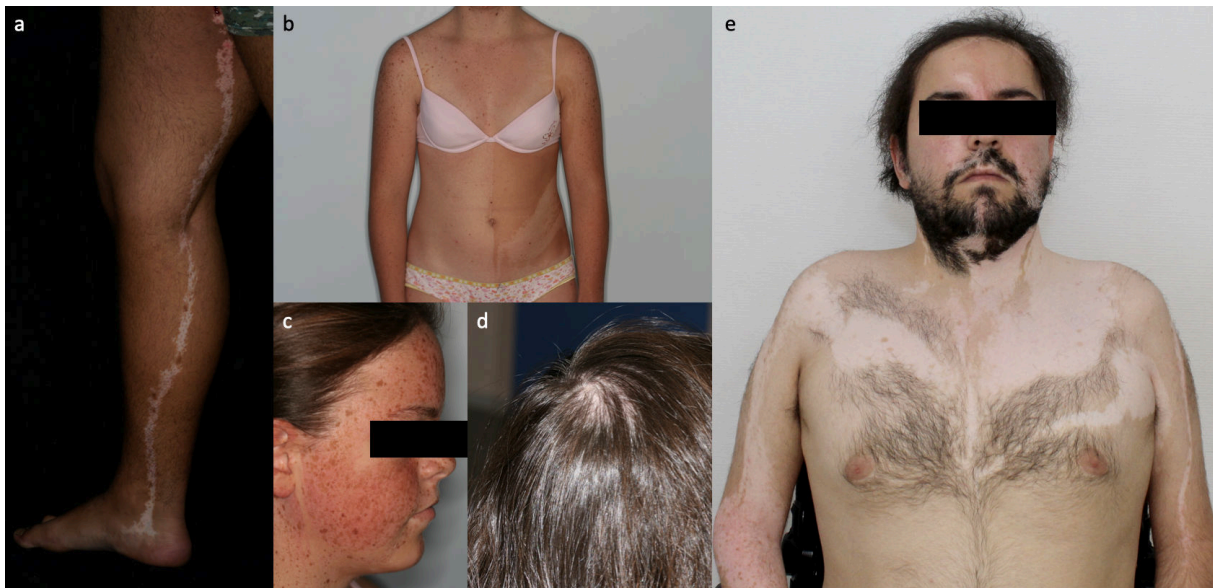
En complément des 4 gènes décrits plus haut, les analyses réalisées pour les patients de notre cohorte ont permis l'identification de deux gènes candidats, jusqu'à présent non associés avec une anomalie du développement, et pour lesquels des travaux supplémentaires sont en cours avant d'envisager une publication, ainsi qu'une variation dans un gène déjà associé à une pathologie mendélienne, mais responsable d'un phénotype distinct. Ce dernier résultat pourrait également faire l'objet d'une publication en cas de réplication sur un second patient. Les résultats impliquant ces trois gènes sont détaillés dans les paragraphes suivants.

a. Mutations post-zygotiques du gène *DOCK1* associées aux dyschromies en mosaïque

Au sein du gène *DOCK1*, jusqu'à présent non associé à une anomalie du développement chez l'Homme, trois mutations distinctes en mosaïque ont été identifiées chez trois patients de la cohorte M.U.S.T.A.R.D. avec dyschromie en mosaïque.

Ces patients présentent un phénotype relativement comparable, associant une achromie linéaire (en bande large ou étroite) ou en plage large avec ne démarcation médiane, une kératose folliculaire rouge touchant le territoire achromique, avec alopecie, et une atteinte neurologique variable (Figure 11 et Tableau 5).

Figure 11 : Phénotype cutané associé aux mutations du gène *DOCK1*



a : patient 1. b à d : patient 2. e : patient 3.

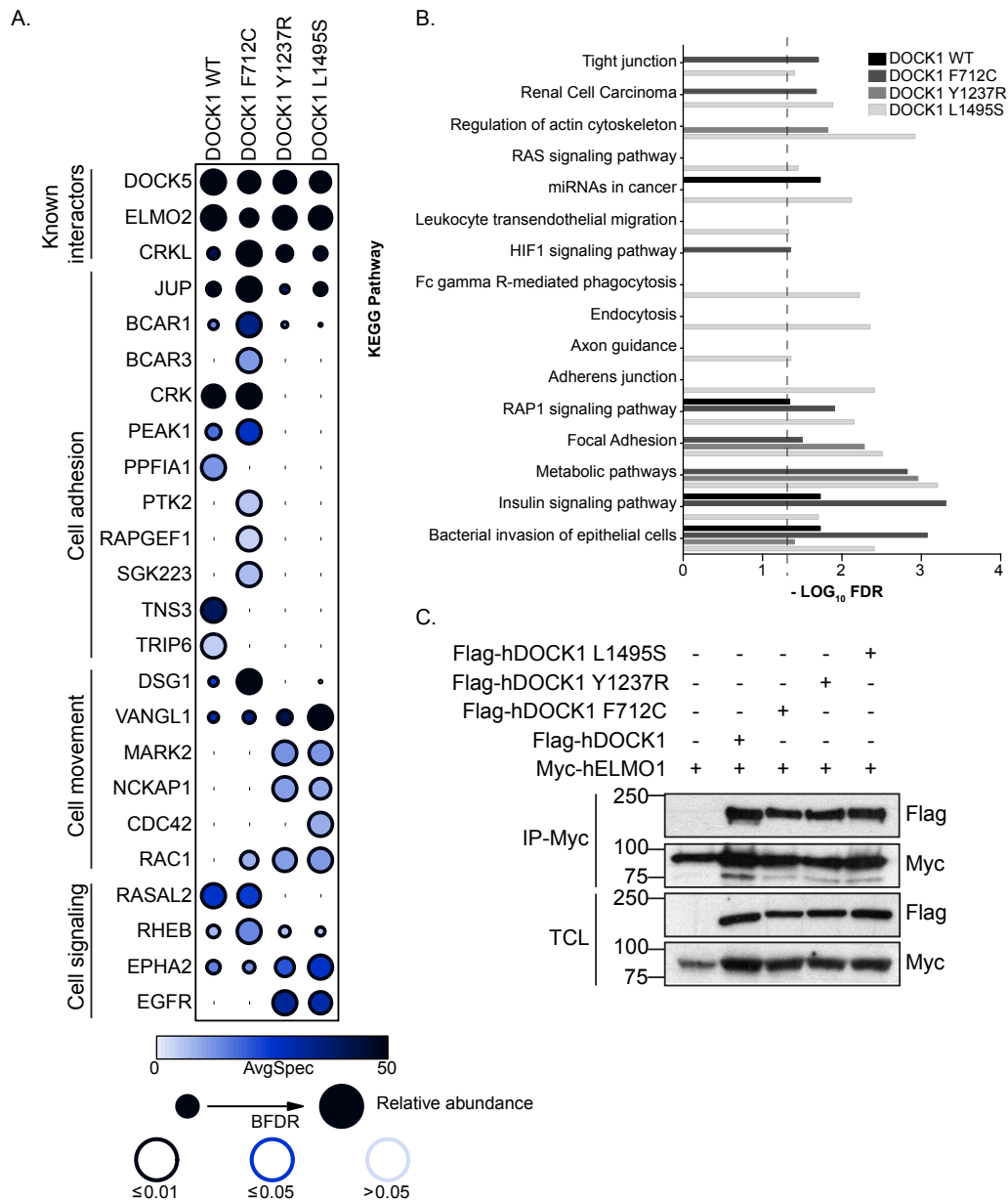
Tableau 5: Phénotype et génotype des patients porteurs de mutation de *DOCK1*

Patient	PED1275	PED1591	PED1981
Genre	Masculin	Féminin	Masculin
Génotype (NM_001290223.1)	c.4494T>C p.(Leu1495Ser)	c.2134T>G p.(Phe712Cys)	c.3709T>A p.(Tyr1237Asn)
% de mosaïcisme	29.62% (peau); 0% (sang)	38.43% (peau); 7.84% (sang)	33.62% (peau); 1.38% (sang)
Croissance	Normale	Normale	Normale
Asymétrie hémicorporelle	Non	Non	Non
Achromie linéaire	Une bande étroite, membre inférieur droit	Bandes larges, (Membres, visage), plage large avec démarcation médiane (tronc).	Bandes larges (Membres, tronc, visage, cuir chevelu)
Kératose folliculaire	Oui (sur le même territoire)	Oui (sur le même territoire)	Oui (sur le même territoire).
Plaque(s) d'alopecie(s)	Non	Oui (début à 17 ans)	Oui, congénital et progressif. Processus inflammatoire.
Développement	Développement moteur normal, Troubles du spectre autistique.	Normal	Neuropathie motrice aux quatre membres
Épilepsie	Épilepsie absences, clonies de chef et des membres supérieurs, (prédominant à droite)	Non	Non
Anomalies à l'IRM cérébrale	Anomalies de substance blanche aspécifiques, périventriculaires, en regard du quatrième ventricule.	Non réalisée	Ventriculomégalie gauche. Hypersignaux de substance blanche. Dilatation des espaces de Virchow-Robin.
Autre	Non	Non	Anomalies asymptomatiques des nerfs optiques au Fond d'oeil.

Le gène *DOCK1* (ou *Dock180*) code une protéine de grande taille (180 kDa), qui est un facteur d'échange de guanine (GEF) pour les petites GTPases de la famille Rho, en particulier celles de la sous-famille Rac (156). La voie de signalisation en aval de *DOCK1* est responsable du contrôle de fonctions diverses, telles que la migration cellulaire, l'apoptose, ou la croissance des neurites (157,158). Plusieurs autres protéines de la famille Dock sont associées à des anomalies de la pigmentation (mutations de *Dock7* chez la souris, entraînant une réduction global de la pigmentation du pelage (159)) ou à des anomalies du développement chez l'Homme (mutations de *DOCK6* et syndrome d'Adams-Oliver (160)).

Une collaboration avec l'équipe du Pr Jean-François Côté (Institut de Recherches Cliniques de Montréal), équipe de référence au niveau mondial pour l'étude de la famille Dock, a été établie afin d'évaluer les conséquences fonctionnelles de ces mutations. À partir de cellules HeLa transfectées, une étude de l'interactome de *DOCK1* a été effectuée par technique de spectrométrie de masse *Bioid* (Figure 12). Une perturbation de l'interactome est notée pour les 3 variants, avec un profil d'interaction similaire pour les variants p.Tyr1237Asn et p.Leu1495Ser et un profil unique pour le variant p.Phe712Cys (A). En utilisant des annotations de la base de données KEGG, nous observons que les interactomes des mutants *DOCK1* sont enrichis en protéines impliquées dans l'endocytose, l'adhésion focale et certaines voies métaboliques (B). La co-immunoprécipitation de *DOCK1* et *ELMO1*, un interactant nécessaire à la bonne conformation et à l'adressage de *DOCK1*, permet de valider les données de *Bioid* (C).

Figure 12 : caractérisation fonctionnelle des variations du gène *DOCK1*

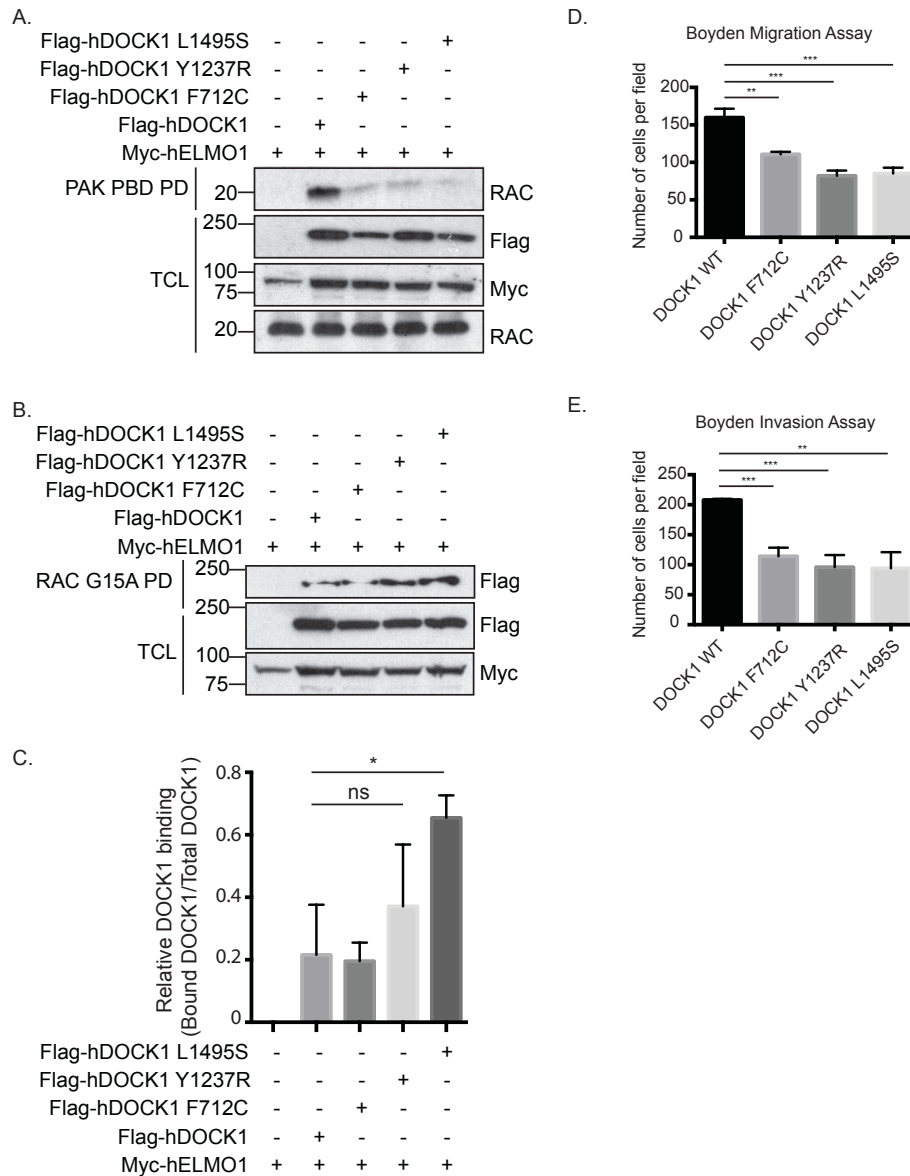


A : étude des interactomes des 3 mutants et de la forme sauvage en BioID. B : analyse KEGG de l'interactome. C : co-immunoprécipitation des protéines ELMO1 et DOCK1.

De plus, l'étude de l'activité Rac dans ces mêmes cellules a montré l'absence d'hyperactivation de Rac dans les cellules sur-exprimant les mutants, contrairement à celles sur-exprimant la forme sauvage (Figure 13, A). Cet effet n'est pas lié à une incapacité à lier Rac, qui est lié de manière similaire par les mutants et la forme sauvage de DOCK1 (Figure 13, B-C). Il est possible que l'absence d'activation de Rac soit liée à sa séquestration sous forme inactive, par exemple en raison d'une mauvaise localisation cellulaire. Enfin, l'analyse de la migration des cellules

transfectées (*Boyden migration et Matrigel-invasion assays*, Figure 13, respectivement D et E) montre une diminution significative de la migration des cellules exprimant les formes mutées.

Figure 13 : caractérisation fonctionnelle des variations du gène DOCK1 (suite)



*p<0.05 ** p<0.005 *** p<0.001

A : défaut d'activité de Rac dans les 3 lignées mutantes. B : les cellules transfectées avec les formes mutantes et sauvages sont toutes capables de lier Rac. D et E : défaut de migration et d'invasion des cellules transfectées avec les formes mutantes.

Ces données mettent en avant des effets significatifs des variations du gène *DOCK1*, qu'il est nécessaire d'étudier de manière plus approfondie pour les lier précisément aux phénotypes observés. Ce travail sera effectué dans le cadre de la collaboration établie autour du projet RIDES (*Rho GTPases in rare cutaneous DiseaseS*) financé par l'ANR (voir page 280).

Les territoires dépigmentés des patients porteurs de mutations du gène *DOCK1* présentent la particularité de présenter des zones réduites de re-pigmentations, comparables à celles visibles dans des tableaux de vitiligo ou de piébalisme. Dans ces maladies, il est supposé que la repigmentation est liée à la colonisation localisée, par les mélanocytes, d'un territoire dont les mélanocytes sont absents. Cette atteinte n'est pas observée dans d'autres maladies identifiées dans notre cohorte, par exemple en lien avec les mutations des gènes *RHOA*, *MTOR* ou *GNA13*.

Chez un patient porteur de mutation du gène *DOCK1*, une étude en immunohistochimie ancienne avait en effet montré une disparition des mélanocytes sur une partie importante d'une biopsie réalisée en peau hypopigmentée, et nombre normal de mélanocytes en peau pigmentée. Une réévaluation de ces données dans le cadre d'une étude plus complète sur de nouveaux prélèvements des 3 patients est en cours.

b. Mutations du gène *GNA13* : une troisième dysplasie ectodermique de la voie Rho ?

Chez un patient présentant une hypomélanose d'Ito et une asymétrie hémicorporelle sans retard psychomoteur, le séquençage d'exome a permis la mise en évidence d'une variation faux-sens post-zygotique au sein du gène *GNA13* (chr17:g.63010910C>T, c.599G>A, p.(Arg200Lys), présente dans 21 % des lectures en peau hypopigmentée (AB: 35/128), et absente du sang.

Devant la ressemblance phénotypique avec les patients présentant une variation du gène *RHOA*, le gène *GNA13* a été étudié en TUDS chez les sujets pour lesquels une étude de *RHOA* était négative. La même variation a été trouvée en mosaïque chez un second patient.

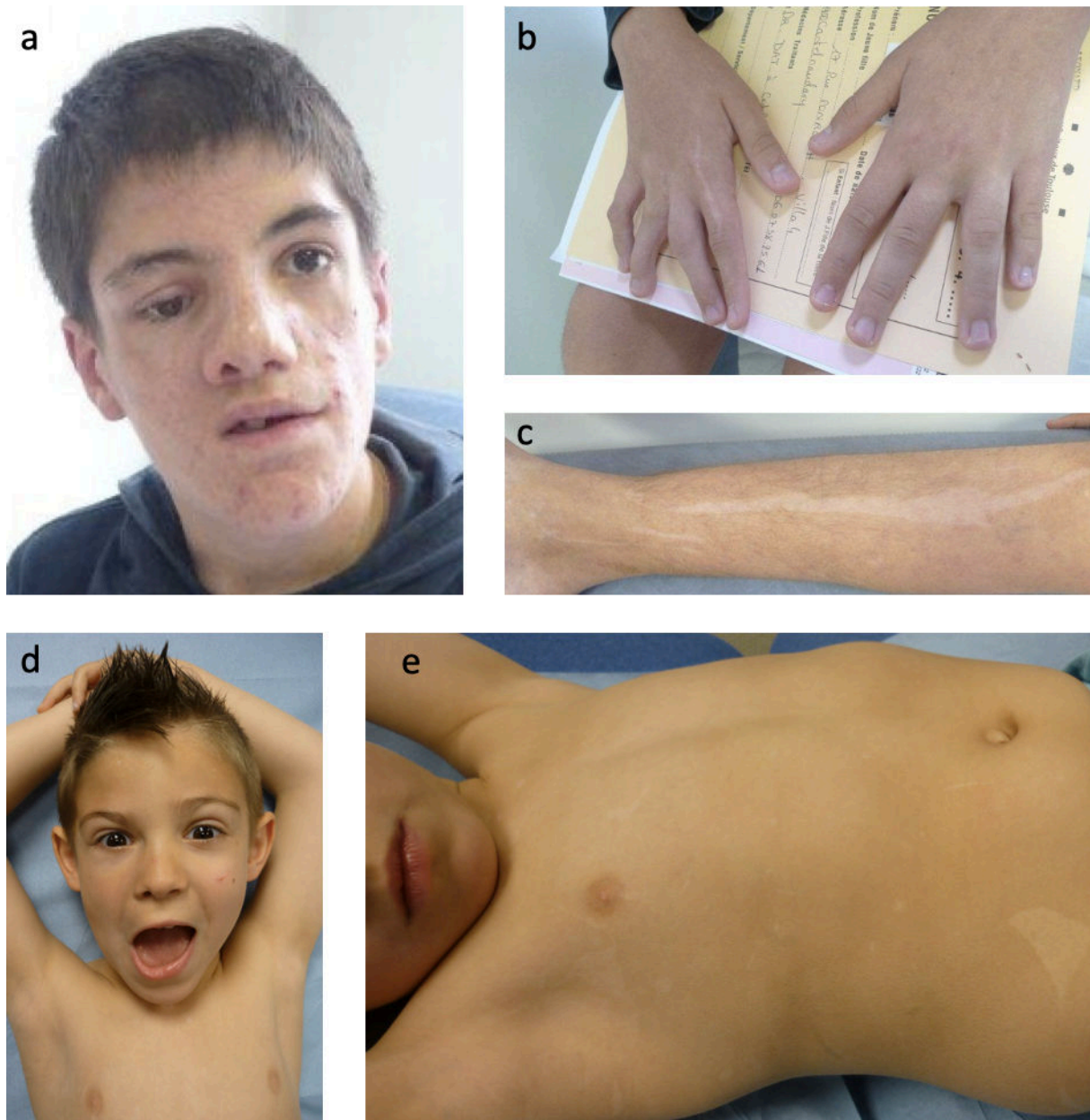
Le phénotype cutané associé à ces variations (Figure 14) comprend des plages hypopigmentées, fusiformes, une dépilation (chez un patient uniquement, sous réserve du jeune âge du second patient), une acné légère, et des difficultés de cicatrisation (persistance 6 mois après la biopsie en territoire hypopigmenté d'un granulome pyogénique freinant la ré-épidermisation). Le développement intellectuel des deux patients, âgés de 4 et 19 ans, est sans particularité.

Le patient 1 présente également :

- Une asymétrie corporelle : asymétrie faciale et asymétrie de longueur des membres inférieurs
- Des malformations des extrémités : polysyndactylie à la main droite, hallux valgus bilatéral, fusion talo-calcaneenne partielle, syndactylie I-II du pied droit
- Des anomalies ophtalmologiques : colobome de la paupière supérieure, anomalies du fond d'œil bilatérales
- Des anomalies dentaires : kystes odontogènes mandibulaires
- Des anomalies neurologiques : hydrocéphalie malformative dérivée
- Des anomalies gastro-entérologiques et néphrologiques : atrésie jéjunale, urétéro-hydronephrose bilatérale, méga-uretère droit
- Une surdité mixte

Le patient 2 présente des anomalies de la substance blanche à l'IRM cérébrale (hypersignaux de la substance blanche cavitaire des centres semi ovales en pariétal droit, carrefour droit et frontal gauche, non rehaussés au gadolinium), sans macrocéphalie ni déficience intellectuelle, ainsi qu'une hypotrophie de l'hémicorps droit prédominant au membre inférieur.

Figure 14 : phénotype associé aux variations du gène *GNA13*



a-c : Patient 1. d,e : Patient 2.

La sous-unité alpha-13 de la *Guanine nucleotide-binding protein* ($G\alpha_{13}$) constitue, avec la protéine $G\alpha_{12}$, une des quatre classes de protéines qui forment la sous-unité alpha des

complexes hétérotrimériques G. Ces complexes sont nécessaires à l'activation des facteurs d'échange de guanine (GEF) des GTPases de la famille Rho (161).

Le gène *GNA13* n'est à ce jour associé à aucune affection humaine à l'état constitutionnelle. La variation p.Arg200Lys est en revanche rapportée dans la base de données COSMIC en association avec le carcinome de la vessie. Elle est absente de la base de données gnomAD. D'autres mutations inactivatrices de *GNA13* sont citées, au côté de mutations du gène *RHOA*, comme contribuant à la malignité de certains cancers (162).

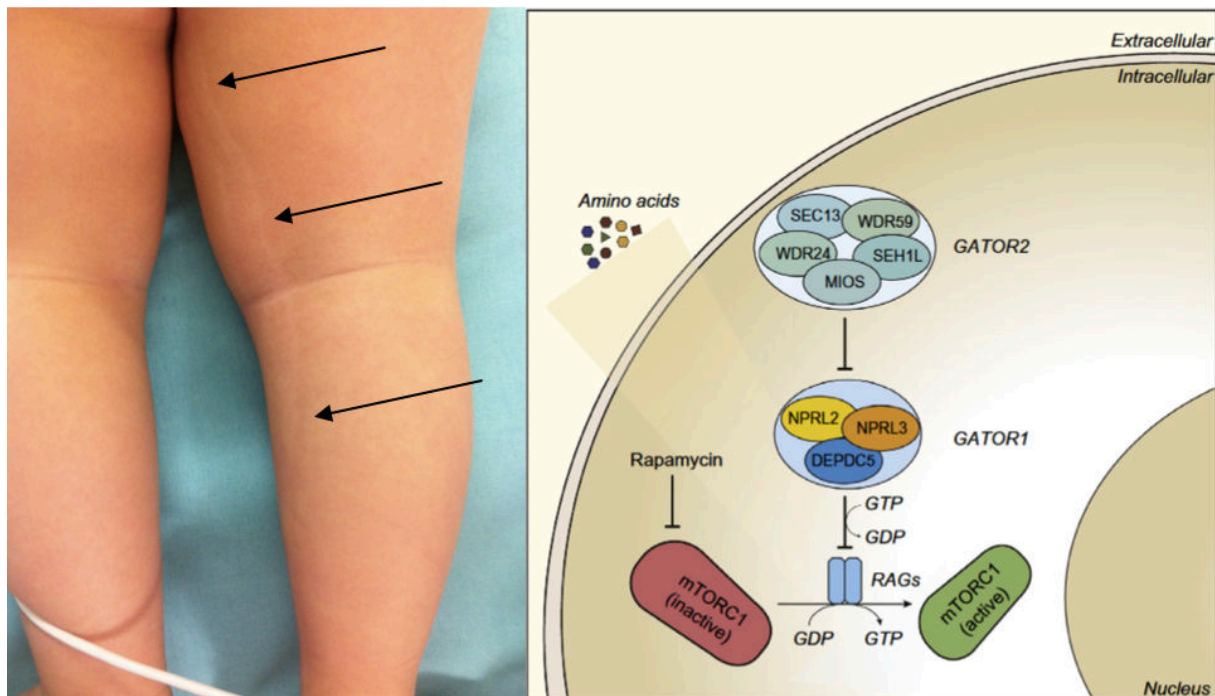
La découverte de mutations au sein d'un troisième gène impliqué dans la voie de signalisation des GTPases Rho, après *RHOA* et *DOCK1*, apporte la confirmation du rôle déterminant de cette nouvelle voie dans les anomalies de la pigmentation cutanée syndromiques.

Ces résultats récents feront l'objet de travaux complémentaires, en particulier au sein du réseau de collaborateurs constitué dans le cadre du projet (RIDES : « Rho GTPases et maladies cutanées rares ») financé par l'ARN (page 280) avant publication.

c. Mutation du gène *DEPDC5* associée à l'hypomélanose d'Ito

Chez un patient présentant une hypopigmentation linéaire en bandes étroites, sur le membre inférieur droit (Figure 15), associée à une épilepsie, l'analyse d'exome a permis la détection d'une variation post-zygotique tronquante (NM 001242896.1:c.1264C>T p.(Arg422*), dans l'exon 17 sur 41) au sein du gène *DEPDC5*. Cette variation est présente dans 31 % des lectures (62 % des cellules) dans la peau et absente du sang.

Figure 15 : Phénotype pigmentaire d'une patiente présentant une mutation du gène *DEPDC5* et intégration dans la voie de signalisation *mTOR*



(Schéma d'après Baulac et collaborateurs (163))

Le gène *DEPDC5* est responsable, lorsqu'il est muté de manière constitutionnelle, d'un tableau d'épilepsie familiale focale avec dysplasie corticale focale (164), de transmission autosomique dominante, mais aucune atteinte pigmentaire n'est rapportée. La variation détectée chez notre patient est déjà rapportée dans la littérature (163), et est considérée comme pathogène (Classe V de la classification ACMG, (165)). Il s'agit d'une mutation tronquante, comme la majorité des mutations connues de ce gène. Le gène *DEPDC5* est un répresseur du complexe mTORC1, et il a été démontré que des variations perte-de-fonction dans ce gène sont

responsables d'une hyperactivation constitutionnelle de la voie de signalisation contrôlée par mTOR (166). Par ailleurs, le rôle de variations post-zygotiques, réalisant un second hit en *trans* d'une variation constitutionnelle, est maintenant bien établi (167,168), en particulier dans le développement de la dysplasie corticale focale qui est associée de manière variable à l'épilepsie.

Nous pouvons faire l'hypothèse qu'une partie des patients présentant un tableau épileptique évocateur d'une atteinte liée à *DEPDC5*, mais non résolus par des explorations en séquençage sur sang, pourraient être porteurs d'une variation en mosaïque confinée au tissu atteint. Dans ce cas, un examen dermatologique attentif, à la recherche d'une anomalie de la pigmentation cutanée, pourrait éventuellement permettre la recherche de cette mutation dans le tissu cutané atteint, d'accès plus aisé que le tissu cérébral. Un appel à collaboration, auprès des réseaux de cliniciens épileptologues et des laboratoires de référence pour les maladies épileptiques, est envisagé pour tester cette hypothèse.

5. Variations chromosomiques

En complément de la recherche de variations postzygotique en séquençage d'exome et en séquençage ciblé, la nécessité de rechercher des variations chromosomiques, dont la fréquence dans les pathologies pigmentaire est connue de longue date, a été soulevée dès les premiers mois de ce travail. À la suite des évaluations des différents protocoles d'extraction disponibles, il apparaît clair que la réalisation en parallèle d'un ES et d'une étude chromosomique par ACPA sera impossible dans une majorité de cas (voir III.2). Dans ce contexte, différents outils bioinformatiques, regroupés au sein d'un même pipeline, ont été développés, afin de permettre la détection de variations chromosomiques sur les données d'ES. L'aspect méthodologique de ces différents outils a été présenté en point III.6.c.

Le pipeline de détection de variations chromosomiques a été appliqué à l'ensemble des patients de la cohorte M.U.S.T.A.R.D. pour lesquels des données d'ES étaient disponibles, dont 56 porteurs d'anomalies pigmentaires (avec ou sans variation nucléotidique identifiée), et 72 appartenant à d'autres sous-groupes de la cohorte. Ces patients étaient utilisés initialement en tant que groupe contrôle, afin de s'affranchir d'un possible biais lié à la nature photo-exposée du tissu cutané, susceptible d'accumuler des variations génétiques par exemple sous l'effet des rayonnements ultra-violets.

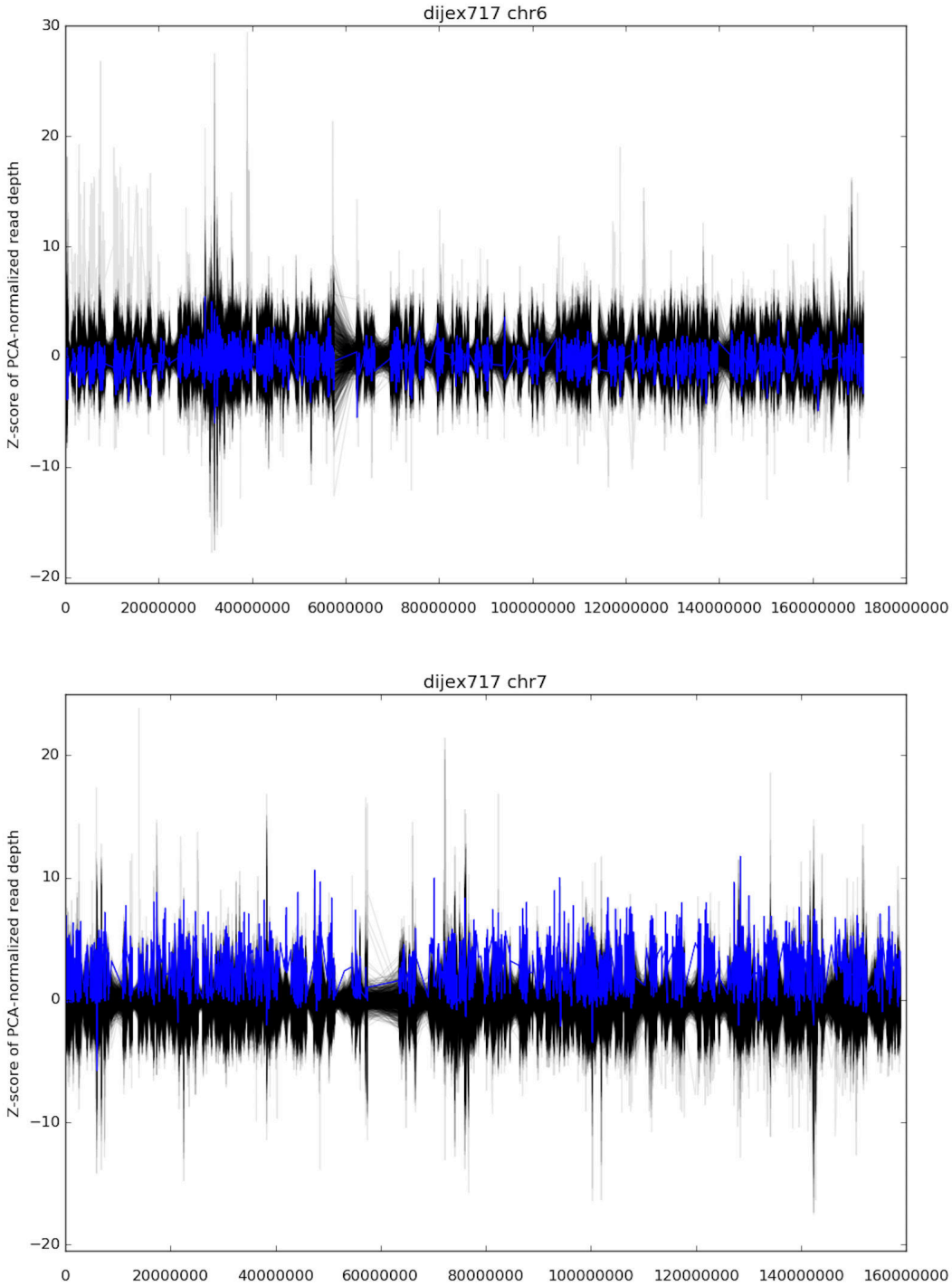
a. Analyse bioinformatique

Les données générées par chacun des trois outils ont été analysées par deux lecteurs indépendants. Chaque détection d'anomalie pour au moins l'un des trois outils a donné lieu à une confrontation des données entre les deux lecteurs, puis à une vérification de la variation suspectée par une technique complémentaire. Les apports des différents outils sont détaillés dans les paragraphes suivants.

i. Outil 1 : Étude de la profondeur de séquençage

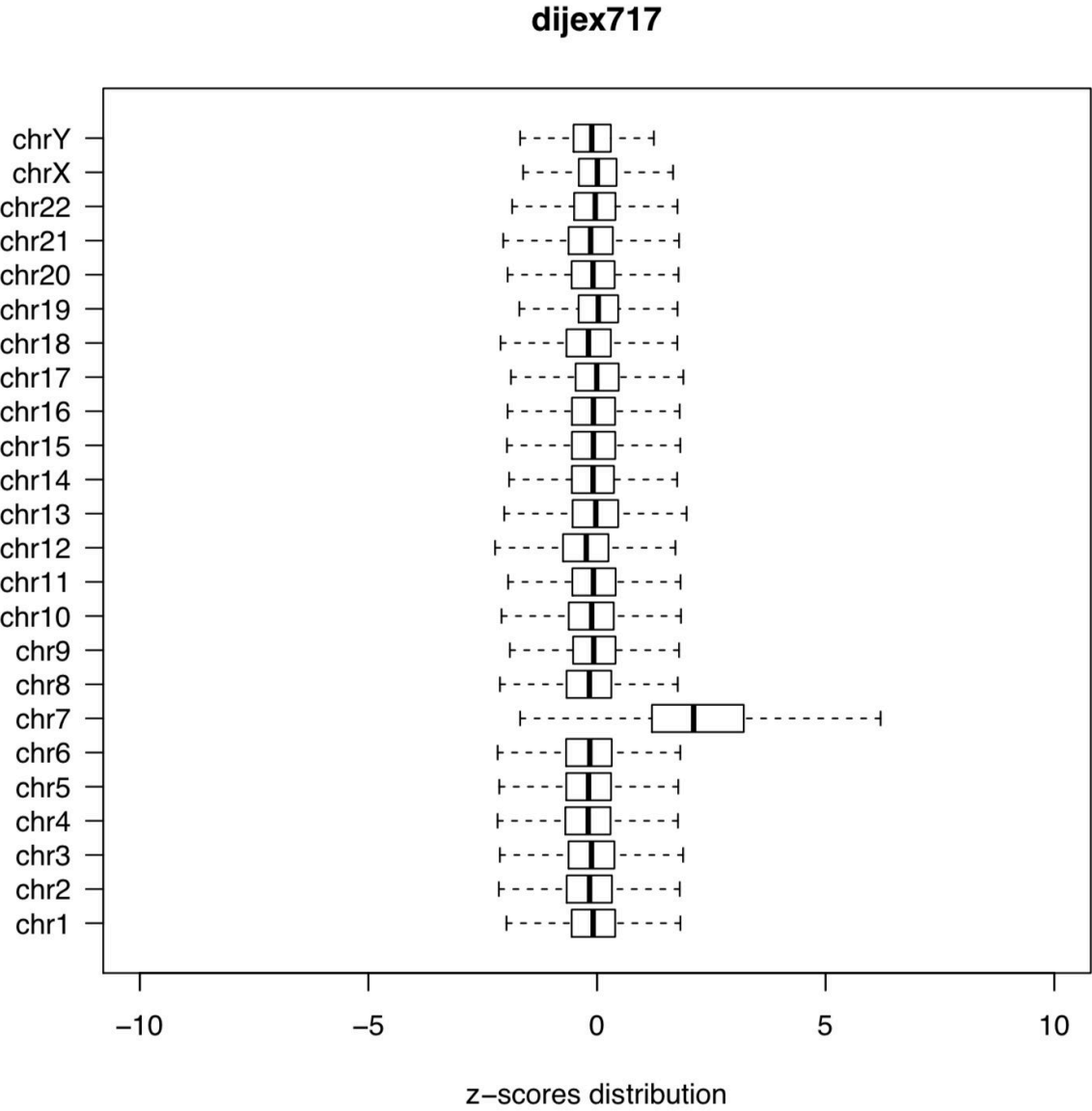
Lors d'une première analyse bioinformatique, l'algorithme a généré des Z-scores pour 50 cas index, et était en échec chez 6 sujets, probablement en raison d'une trop grande variabilité des captures utilisées. Une nouvelle analyse, en utilisant un groupe de témoins plus homogènes a permis le calcul des Z-scores de la totalité des cas index. Pour chaque groupe de sexe, environ 500 contrôles de la cohorte diagnostique étudiés au laboratoire GAD ont été utilisés. Un exemple des profils de Z-score ainsi générés est donné en Figure 16 (Outil 1a) et Figure 17 (Outil 1b).

Figure 16 : Outil 1a - profil chromosomique des chromosomes 6 et 7 d'un patient présentant une trisomie en mosaïque du chromosome 7



Les Z-scores du patient produits par XHMM sont représentés en bleu, ceux des contrôles utilisés pour la normalisation en noir. On note pour le chromosome 7 une déviation vers les valeurs positives de l'ensemble des points du patient.

Figure 17 : Outil 1b - Distribution des Z-scores des 23 paires de chromosomes du patient précédent

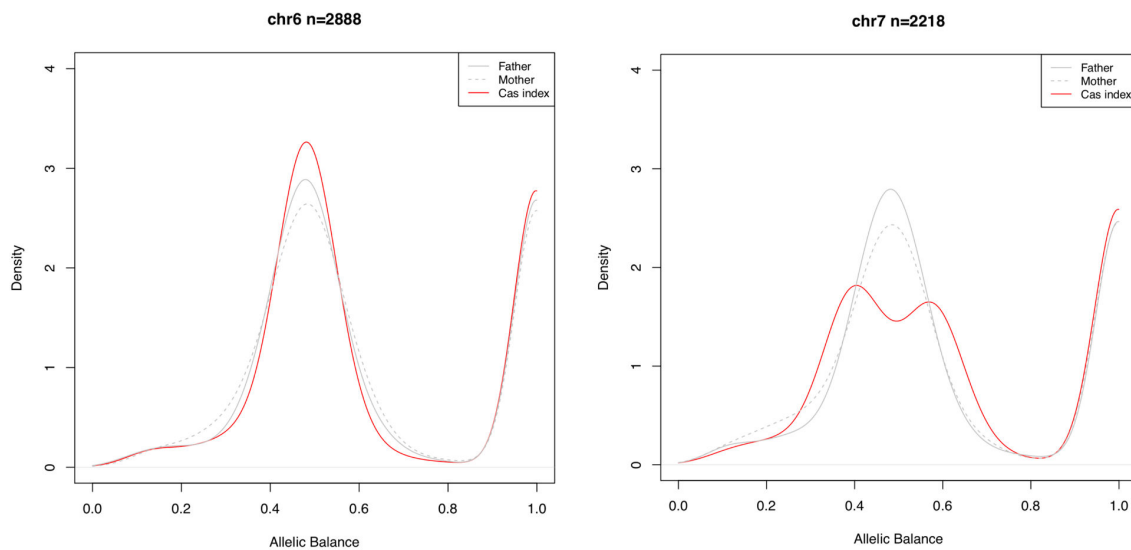


Les boîtes à moustaches représentent les 5°, 25°, 50°, 75° et 95° percentiles. Pour l'ensemble des chromosomes à l'exception de la 7^{ème} paire, la médiane est très proche de 0. On note en revanche un décalage vers les valeurs positives des Z-scores de la paire de chromosomes 7.

ii. Outil 2 : Étude des fractions alléliques

La représentation de la distribution des fractions alléliques a pu être effectuée pour l'intégralité des patients (Outil 2, Figure 18). Dans un premier temps, elle est effectuée pour chaque chromosome dans sa globalité, mais peut également être générée pour un intervalle sélectionné en fonction des résultats de l'outil 1a, pour affiner la représentation sur une région d'intérêt.

Figure 18 : représentation des fractions alléliques

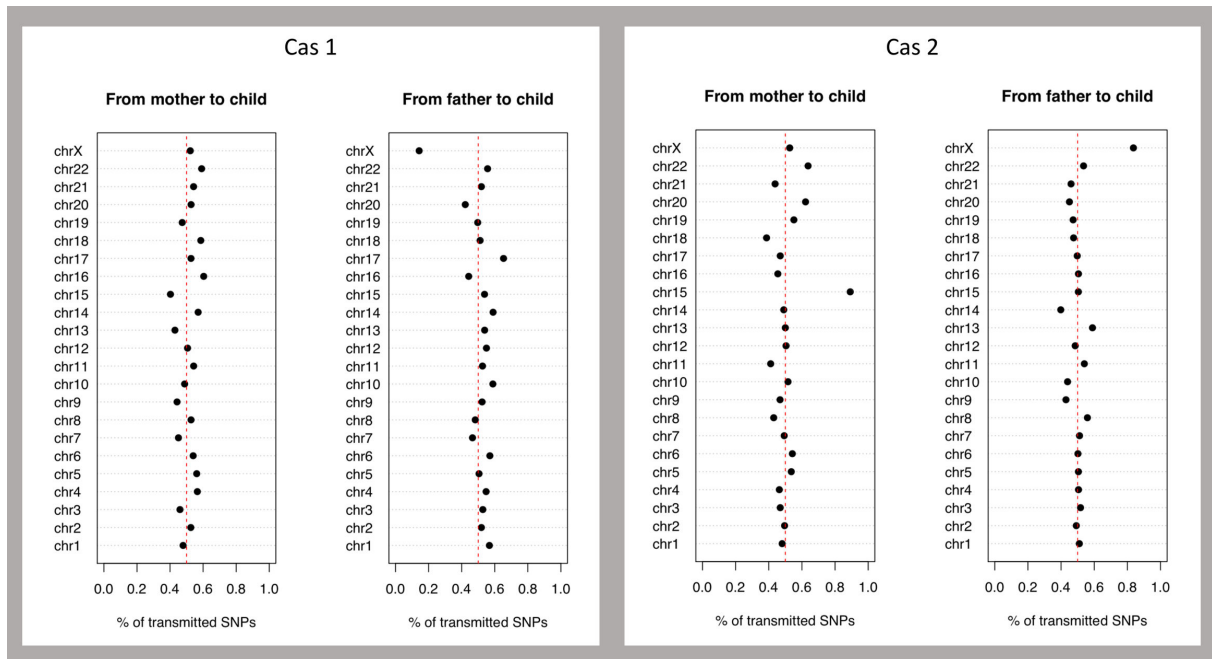


Deux chromosomes du cas index (rouge) et de ses parents (gris), en situation physiologique (gauche : chromosome 6) et pathologique (droite : trisomie du chromosome 7). n : nombre de SNV informatifs.

iii. Outil 3 : Étude des transmissions parent-enfant des SNP

Enfin, pour 40 patients porteurs de dyschromie en mosaïque et 15 autres de la cohorte M.U.S.T.A.R.D. sans dyschromie, les données d'ES étaient disponibles en trio. Pour ces patients, il a été possible dans 100 % des cas de générer le profil de transmission des SNP du parent à l'enfant (Outil 3, Figure 19).

Figure 19 : Représentation de taux de transmission des SNV du parent à l'enfant pour deux trios.



Cas 1 : Les taux de transmission maternelle (à gauche) et paternelle (à droite) pour chaque autosome sont proches de la valeur physiologique de 50 %. Le père a transmis peu de variants de l’X : le cas index est un garçon. Le chromosome Y, non informatif, n’est pas utilisé pour cet outil.

Cas 2 : On note un taux de transmission maternelle élevé pour le chromosome 15, traduisant une erreur de méiose maternelle avec double contribution. Le taux de transmission est également élevé pour le chromosome X paternel : le cas index est une fille.

b. Anomalies chromosomiques détectées

Une variation chromosomique a été identifiée chez 17 sujets présentant une dyschromie en mosaïque (20 %). Différents mécanismes ont été observés, qui seront détaillés dans les paragraphes suivants. De manière plus surprenante, nous avons également détecté des variations chez 3 sujets sans dyschromie en mosaïque. L’analyse de ces variations, détaillée ci-dessous, permet d’identifier un lien physiopathologique entre cette variation et le motif d’inclusion du patient, rejetant l’hypothèse d’un biais lié à la nature du prélèvement. L’ensemble de ces résultats sont présentés dans le Tableau 6.

i. Anomalies chromosomiques associées à une dyschromie en mosaïque

Cinq trisomies en mosaïques ont été détectées : pour les chromosomes 7, 12, 15 (2 fois) et 16. Quatre patients présentent une tétrasomie (3q26.1-q29, et 6p22.3-p25.3, 12p (2 fois)), un patient présente un gain de l'ensemble du bras court du chromosome 11, un autre un gain de l'ensemble du bras court du chromosome 5, deux présentent une délétion distale en mosaïque de 70Mb à 80MB sur le chromosome 13, et quatre présentent une mosaïque de triploïdie (mixoploïdie). Quatre exemples de cas cliniques sont détaillés ci-dessous.

ii. Anomalies chromosomiques associées à des affections non pigmentaires.

Parmi les patients ne présentant pas de dyschromie en mosaïque, utilisés comme témoins dans cette étude afin de corriger un possible biais lié par exemple au vieillissement cutané, plusieurs anomalies chromosomiques ont également été détectées. Il s'agit pour les trois patients de mosaïques de disomies uniparentales, dont le mécanisme de pathogénicité est soit une anomalie de l'empreinte parentale (sujet 4204), soit une perte d'hétérozygotie avec augmentation de la fraction allélique d'une variation constitutionnelle héritée (2421 et 1882).

Il n'a été détectée aucune variation chromosomique chez des patients sans atteinte pigmentaire, pour lesquels un lien avec le phénotype ne pouvait être établi, permettant de réduire la probabilité d'un biais lié à la nature particulière du tissu étudié.

c. Techniques de confirmation

La plupart des variations détectées ont pu être confirmées par ACPA, sur de l'ADN restant après ES, ou obtenues à partir d'un nouveau prélèvement. Pour 2 sujets, la réalisation d'une nouvelle biopsie nous a permis de réaliser une FISH sur apposition de tissu frais (1884 - tétrasomie 3q ; 1474 - monosomie 13). Pour un patient, une apposition sur lame blanche conservée à -80°C avait été réalisée après l'obtention des premiers résultats pour d'autres patients. La FISH pour ce patient (4799 - Gain 11p) est en cours.

Le log ratio obtenu en ACPA permet une estimation du pourcentage de cellules portant l'anomalie chromosomique. En fonction des résultats des différents outils et des données de

la littérature, il peut être possible de suspecter l'existence d'une duplication ou d'une tétrasomie partielle. Dans ces différentes hypothèses, la correspondance entre le log ratio d'ACPA et le taux de mosaïque est estimée à partir de la table de correspondance disponible en Annexe.

Tableau 6 : Variations chromosomiques détectées et méthodes de confirmations employées.

N° patient	Dys-chromie	Anomalie chromosomique détectée	Résultats Outil 1a	Résultats Outil 1b	Résultats Outil 2	Résultats Outil 3	Commentaire	Confirmation
Monosomies								
1274	oui	Monosomie 13q13.3-qter (79.1Mb) en mosaïque	Perte 13qTer	Perte 13	Profil bimodal pour le chr13	N	Monosomie 13qTer dans 27 % des cellules	Confirmé par FISH sur une seconde biopsie (27 %), par la réinterprétation rétrospective du caryotype prénatal (amniocentèse à 22SA : 1 mitose), et par ACPA (Log ratio = -0,175 : 26%)
5152	oui	monosomie 13 partielle en mosaïque	Délétion du chromosome 13 terminale, environ 82Mb	Perte 13	chr13 : pic des hétérozygotes bas	N		Échec (qualité insuffisante pour l'ACPA).
Trisomies								
1916	oui	Trisomie 7 en mosaïque	Gain de l'ensemble du chr7, de novo	Gain 7, de novo	Profil bimodal pour le chr7	N	Trisomie 7 en mosaïque (dans 40 % des cellules). Pas d'anomalie du taux de transmission parentale, et fractions alléliques augmentées pour les variations héritées du père : hypothèse d'une non-disjonction en méiose II paternelle ou mitotique (post-zygotique)	ACPA (46 %) et en SNP-array (40 %, origine paternelle des SPN ayant une fraction allélique augmentée)

2304	oui	Trisomie 12 en mosaïque	Gain de l'ensemble du chr12, de novo	Gain 12, de novo	Profil bimodal pour le chr12	Augmentation du taux de transmission maternelle	Trisomie 12 en mosaïque, dans 22 % des cellules. Correction post-zygotique imparfaite de trisomie 12 par erreur de méiose maternelle.	Confirmé en ACPA, (log ratio = 0,152 : 22%)
2381	oui	Trisomie 15 en mosaïque	Gain de l'ensemble du chr15, <i>de novo</i>	Gain chr15	N	Augmentation du taux de transmission maternelle	Trisomie 15 en mosaïque dans 13,5 % des cellules. Correction post-zygotique imparfaite de trisomie 15 par erreur de méiose maternelle.	Confirmé en ACPA (log ratio = 0,094 : 13%) et en SPN-array
4540	oui	Trisomie 15 en mosaïque	Perte sur l'ensemble du chromosome 15, à faible taux	Perte sur l'ensemble du chromosome 15, à faible taux	N	N		En cours
1588	oui	Trisomie 16 en mosaïque	Gain de l'ensemble du chr16, confiné à la biopsie	Gain 16, confiné à la biopsie	Profil bimodal pour le chr16	NA	Trisomie 16 en mosaïque, dans 63 % des cellules	ACPA (log ratio = 0,396 : 63%)
Tétrasomies								
1884	oui	Tétrasomie 3q26.1-q29 (33.43Mb) mosaïque	Gain 3qTer confiné à la biopsie	Gain chr3 confiné à la biopsie	Élargissement du pic à 50 % pour le chr3	NA	Tétrasomie 3q26.1-qter dans 44 % des cellules	FISH et ACPA (log ratio = 0,52 : 43%)
2885	oui	Gain 5p	Gain 5p <i>de novo</i>	Gain 5p <i>de novo</i>	N	N	Trisomie ou tétrasomie 5p	En cours
1950	oui	Gain (triplication) 6p22.3-	Gain 6pTer, confiné à la biopsie	N	N	N	Hypothèse de triplication 6p22.3-p25.3 (log ratio en ACPA incompatible avec une	Confirmé en ACPA (213,630-20,221,669, log ratio = 0,815 : 76%)

		p25.3(20Mb) en mosaïque					duplication) dans 76 % des cellules. FISH en cours.	
4799	oui	Gain 11p en mosaïque	Gain 11p (biopsie et sang)	Gain chr11 (biopsie et sang)	Élargissement du pic à 50 % pour le chr11	NA	Gain de l'ensemble du bras court du chr11, dans la biopsie (dans 45 % des cellules) et dans le sang	ACPA (log ratio = 0,292 : 22%)
1934	oui	Pallister-Killian	Gain 12p confiné à la biopsie	Gain chr12 confiné à la biopsie	N	NA	Isochromosome 12p composé des deux homologues au lieu de 2 chromatides sœurs, dans 26 % des cellules	ACPA (log ratio = 0,333 : 26%)
3530	oui	Pallister Kilian	Gain 12p <i>de novo</i>	Gain 12p <i>de novo</i>	Profil bimodal pour le chr12p	N		En cours
Mixoploïdies								
1166	oui	Mixoploïdie	N	N	Perturbation de l'ensemble des chromosomes	NA	Mosaïque de diploïdie / triploïdie. Origine parentale encore non déterminée.	En cours
4165	oui	Mixoploïdie	Gain de l'X, Perte de l'Y	Gain de l'X, baisse de Y	Variations de l'X non homozygote, pic à 20 % marqué sur tous les chromosomes	Excès global de transmission du père (dont transmission de l'X à son fils)	Mosaïque de correction de triploïdie, par double contribution paternelle	Confirmée en microsatellites
4590	oui	Mixoploïdie	N	N	3 pics	Excès global de transmission de la mère	Mosaïque de correction de triploïdie par double contribution maternelle	Confirmée en microsatellites

5427	oui	Mixoploïdie	N	N	Pics à 20% marqués sur tous les chromosomes	Excès global de transmission du père.	Mosaïque de correction de triploïdie par double contribution paternelle.	Confirmée en microsatellites
Disomies uniparentales								
4204	non	Probable disomie uniparentale du chr11 sans variation quantitative	N	N	Profil bimodal pour le 11 (sang et biopsie)	NA	Pas de donnée de transmission, car exome réalisé en paire. Hypothèse d'une disomie uniparentale du 11, responsable d'un Syndrome de Beckwith-Wiedemann ?	En cours
2421	non	DUP paternelle en mosaïque et révélation d'un second hit	N	N	Anomalie du 16	N	Disomie uniparentale paternelle en mosaïque (allèles paternels à 70 %) pour l'ensemble du bras long du chromosome 16. Double hit dans le cas d'une porokeratose de Mibelli	En cours
1882	non	DUP paternelle en mosaïque, et révélation d'un second hit	N	N	Anomalie du 1	NA	Disomie uniparentale paternelle en mosaïque (allèles paternels à 70 %) pour l'ensemble du bras long du chromosome 1. Double hit dans le cas d'une porokeratose de Mibelli	En cours

N : Normal ; SA : Semaine d'Aménorrhée. DUP : Disomie uniparentale ; NA : non applicable (pas d'étude d'ES en trio).

d. Mécanismes chromosomiques rencontrés

Parmi les patients de la cohorte, l'analyse des variations chromosomiques à l'aide des outils mis en place dans le cadre de ce travail a révélé la présence d'anomalies diverses, couvrant la quasi-totalité des mécanismes connus dans ces affections, à l'exception notable du chimérisme (15,108). Ces différents mécanismes sont explicités dans les paragraphes suivants.

i. Trisomies

Des trisomies en mosaïques ont été détectées chez 5 patients, pour 4 chromosomes, avec une récurrence pour le chromosome 15. L'outil le plus adapté pour la détection des trisomies semble l'étude des profondeurs de séquençage, qui a montré un écart à la normale dans les 5 cas. Il s'agit alors d'une déviation du signal du patient pour l'ensemble d'un chromosome, d'intensité variable selon le pourcentage de cellules portant l'anomalie. La représentation des Z-scores sous forme de boîte à moustache semble apporter une meilleure sensibilité, avec une identification plus aisée des variations à faible taux telles que celle décrites en exemple ci-dessous. Dans le cas de cette représentation, l'ensemble des points utilisés (5°, 25°, 50°, 75° et 95° percentiles) sont impactés.

L'étude des fractions alléliques est parfois insuffisante (sujets 2381 et 4540), probablement dans les situations où le pourcentage de cellules portant l'anomalie est le plus faible, en raison d'un effet de lissage lors de la représentation graphique de la distribution des FA. Ce défaut est également retrouvé en représentation type *SNP-array*, en raison d'une dispersion trop importante des valeurs.

En revanche, lorsqu'elle est disponible (ES en trio), l'étude de la transmission des SNP du parent vers l'enfant est ici très informative. Elle permet en effet de différencier de situations aux mécanismes distinctes :

- d'une part, une mosaïque résultant d'une correction imparfaite de trisomie par erreur en méiose I (par exemple en méiose maternelle (sujets 2304 2381) : excès de transmission des SNP d'un parent), par présence chez l'enfant des deux homologues de la même paire chromosomique du parent. L'anomalie initiale est ici pré-zygotique,

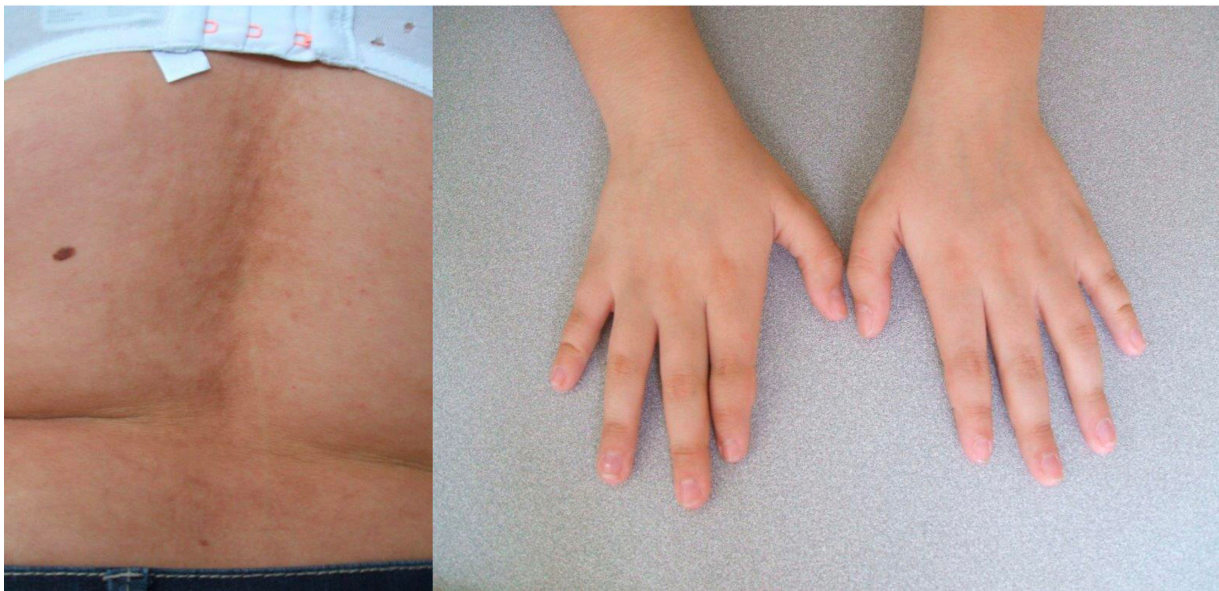
mais la mosaïque résulte bien d'un évènement post-zygotique (la correction imparfaite de trisomie)

- d'autre part, une mosaïque résultant soit d'une correction imparfaite de trisomie par erreur en méiose II (anomalie lors de la division équationnelle, avec transmission des deux chromatides du même chromosome), soit d'une duplication post-zygotique d'un chromosome (sujet 1916). Dans ce cas, l'origine parentale est déterminée par analyse des FA : pour le sujet 1916, les SNP dont la FA est augmentée sont d'origine paternelle.

Exemple : Trisomie 15 en mosaïque (sujet 2381)

Cette patiente de 20 ans présente une obésité, une déficience intellectuelle, des anomalies pigmentaires du tronc (Figure 20), des anomalies cérébrales (dilatation ventriculaire, atrophie corticale bilatérale, leucomalacie périventriculaire, une dysmorphie faciale (synophris, épicanthus, strabisme, blépharophimosis), des anomalies des extrémités, un hémangiome (tête et épaules), et une apraxie idéomotrice.

Figure 20 : Patiente 2381

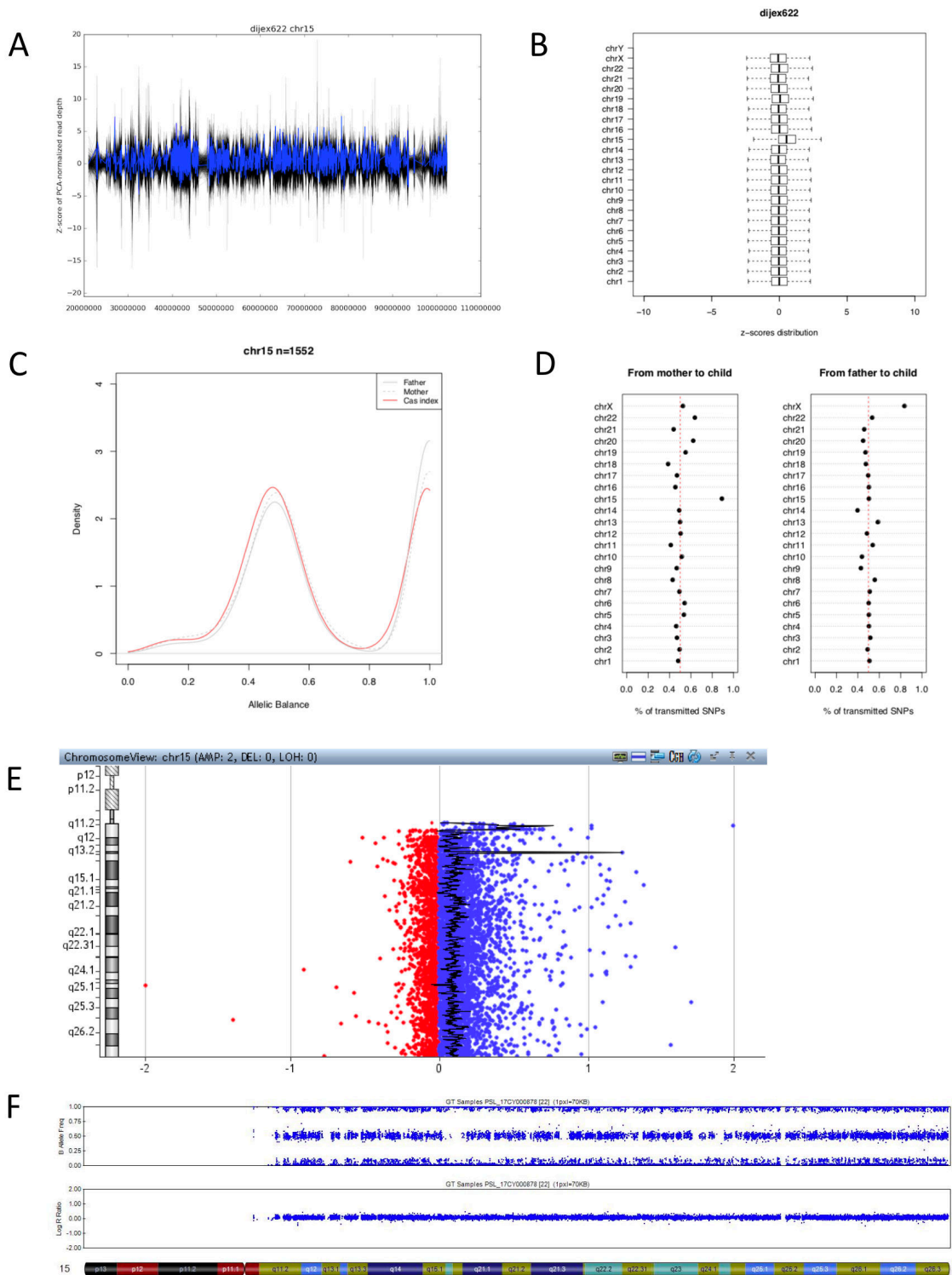


La patiente présente des anomalies pigmentaires à type d'hypomélanose en volute, de manière discrète, essentiellement dans le dos, et une brachymésophalangie.

L'ES en trio (Figure 21), initialement négatif dans l'hypothèse d'une mutation ponctuelle, a montré une augmentation très discrète de la profondeur de séquençage pour le chromosome 15 (A), plus facilement visible grâce à la représentation de la distribution des Z-scores en « boîte à moustaches » (B). Aucune variation de fraction allélique n'était détectable (C), mais on relevait en revanche une augmentation de taux de transmission des allèles maternels (D). Devant ces différents résultats, il est possible de faire l'hypothèse d'une erreur de méiose maternelle, avec transmission des deux homologues, et correction post-zygotique imparfaite de trisomie 15, avec élimination aléatoire d'un chromosome sur 3, mais persistance d'une faible fraction de cellules à 3 chromosomes 15. Dans certaines cellules, il peut exister une DUP maternelle, responsable d'un syndrome de Prader-Willi, pouvant expliquer une partie du phénotype de la patiente.

Cette patiente avait bénéficié d'une ACPA sur sang, qui était normale, ainsi que d'une étude ciblée du locus 15q11-q13 par MLPA méthyl-sensible, également normale. Une nouvelle biopsie de peau a été acceptée par la patiente, mais qui était malheureusement trop dégradée pour permettre une FISH. L'extraction d'une quantité importante d'ADN a cependant permis de réaliser une ACPA confirmant une mosaïque de trisomie 15 à faible taux ($\log \text{ratio} = 0,094$, Figure 21.E), ainsi qu'une SNP-array en trio, confirmant la disomie maternelle (F).

Figure 21 : Résultats d'ES, ACPA et SPN-array pour la patiente 2381.



ii. Tétrасomies

Chez six patients, l'analyse a montré la présence d'un gain de matériel chromosomique d'une partie d'un chromosome, consistant avec une triploïdie (présence de 4 copies de l'intervalle concerné). La nature des remaniements a été initialement suspectée devant des arguments bibliographiques (description dans la littérature d'anomalies comparables, déjà associées aux anomalies pigmentaires, telles que la tétrasomie 3q ou la tétrasomie 12p ou syndrome de Pallister Kilian) ainsi que deux arguments liés au outils utilisés :

- Importance de la déviation des Z-scores, en représentation « chromosome entier ». La déviation du signal est en effet notablement plus conséquente que dans le cas des trisomies. Ceci est également visible en représentation « boîte à moustache », mais à la différence des trisomies complètes, seule une partie des valeurs est déviée (la signature d'un CNV touchant une partie seulement d'un chromosome est donc la combinaison d'un « décalage » et d'un « élargissement » de la boîte à moustache. Par effet de normalisation, le 5° percentile peut apparaître légèrement décalé vers les valeurs basses (voir l'exemple ci-dessous).
- Absence d'anomalie des FA, pour certains sujets : devant la présence d'un profil de FA conservé, en regard d'un Z-score très dévié, l'hypothèse est celle d'une duplication des deux homologues. Il y a donc bien 4 copies de la région concernée, mais respectant la proportion initiale pour les deux haplotypes. L'analyse des FA permet donc de différencier également les isochromosomes contenant deux chromatides sœurs, résultat d'une anomalie de division du centromère (par exemple par division transversale au sein du centromère, de la région péricentrique ou d'un néocentromère) des isochromosomes contenant les deux bras homologues, résultat probablement d'une cassure double-brin et « échange de type U » (39).

Dans 1 cas, l'évènement est de trop petite taille pour être détecté par l'étude des Z-scores en boîte à moustaches ou par l'étude des FA (triplication de 20Mb en 6pter, sujet 1950). Cet évènement nous a induit à modifier notre pipeline, en réalisant l'analyse des FA non plus pour l'intégralité d'un chromosome, mais par bras chromosomique, afin de ne pas négliger des évènements de petite taille.

L'outil 3 est quant à lui constamment normal, signant l'absence de transmission par un parent d'un parqeur surnuméraire, et donc la nature post-zygotique de l'évènement dans notre cohorte, même si des tétrasomies résultant d'une erreur méiotique ont également été décrites (39).

La confirmation de la présence de quatre copies chromosomiques a été apportée de deux manières : par FISH, sur une apposition de la biopsie de peau fraîche, ou en ACPA devant la présence d'une déviation du Log ratio incompatible avec la présence d'une duplication (supérieur à 0,585 : par exemple pour le sujet 1950). La table de correspondance entre le taux de mosaïcisme et le Log ration est présentée en Annexe.

Exemple : Tétrasomie 3q en mosaïque (sujet 1884)

Ce patient a été inclus dans la cohorte M.U.S.T.A.R.D devant l'association d'une ichtyose linéaire, d'anomalies osseuses (scoliose, ...), d'une hyperpigmentation suivant les lignes de Blaschko, et d'une hypertrophie des extrémités aux membres inférieurs (Figure 22).

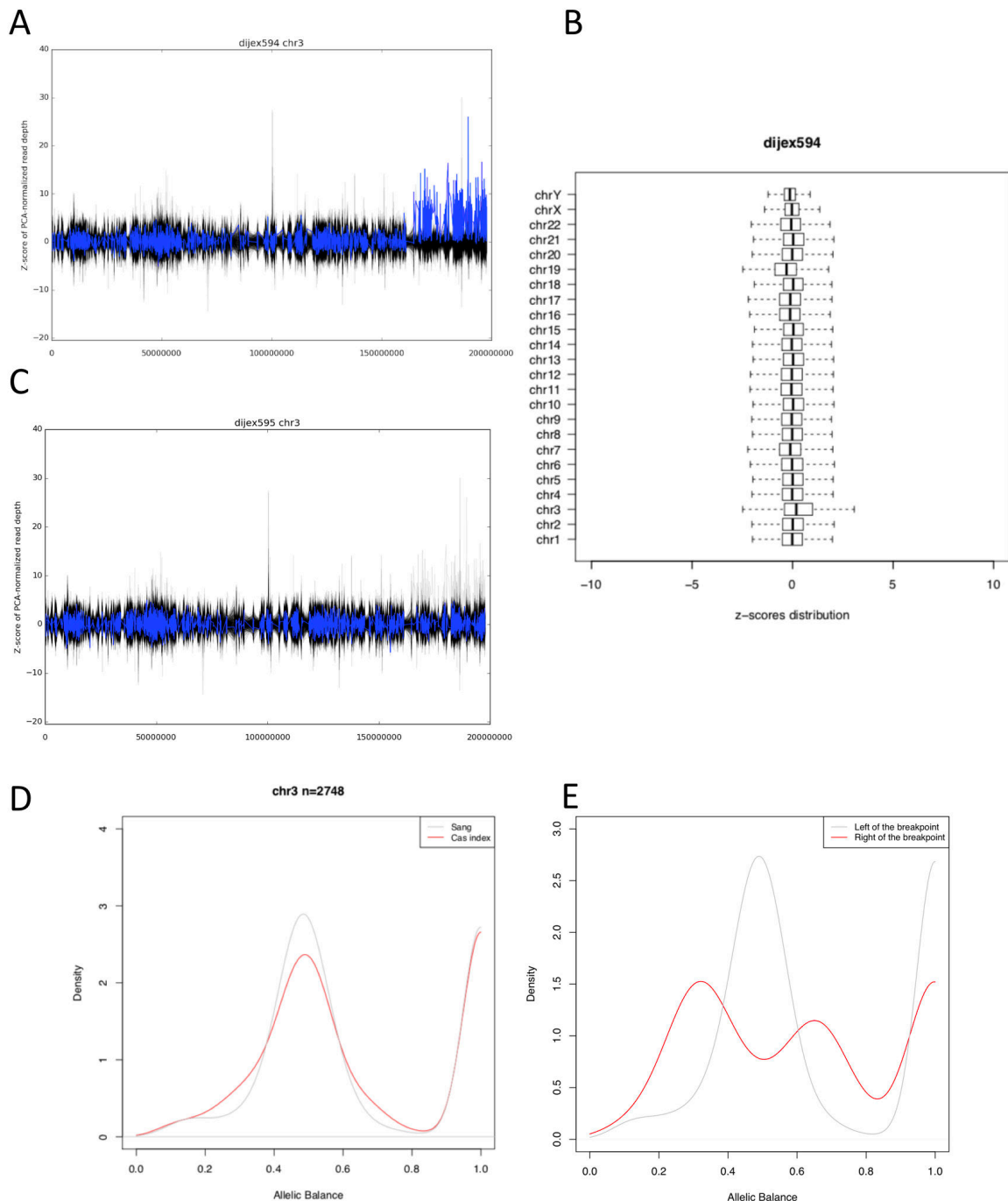
L'analyse de l'ES en 2015, pour recherche d'une mutation ponctuelle en mosaïque, était négative. L'amélioration du pipeline dans le cadre de ce travail a mené à l'identification d'un remaniement chromosomique impliquant l'extrémité du bras long du chromosome 3 (Figure 23). La représentation des Z-scores pour les chromosomes entiers montrait une augmentation notable de la profondeur de séquençage sur un intervalle d'environ 35Mb en 3qTer (A), suffisamment important pour entrainer une variation visible de la distribution des Z-scores pour ce chromosome (B). Le séquençage ayant été réalisé en paire, le taux de transmission des SNP parentaux n'est pas disponible. En revanche, la comparaison avec les données de l'ES réalisé sur sang montre que la variation est confinée à la biopsie. L'analyse des fractions alléliques montre une anomalie du pic d'hétérozygotie, qui s'intensifie.

Figure 22 : Hyperpigmentation linéaire et hypertrophie des extrémités.



Photos Pr Hadj Rabia, Necker Enfants Malades.

Figure 23 : Rapports générés pour le sujet 1884 (extraits).

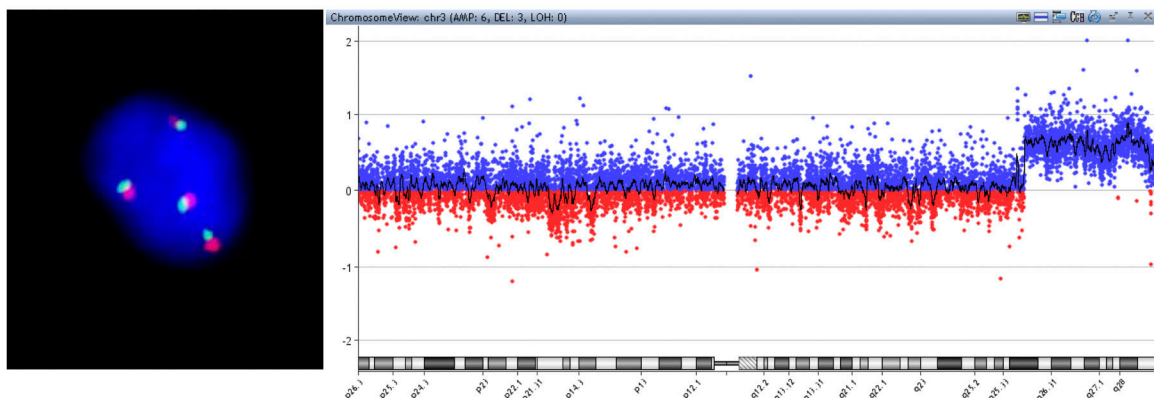


A : Représentation de la profondeur de séquençage le long du chromosome 3. B : distribution des Z-scores pour l'ensemble des chromosomes du patient. C : absence d'anomalie détectable dans le sang. D : élargissement du pic d'hétérozygotie dans les données d'ES de biopsie (rouge) par rapport au sang (gris) pour l'ensemble du chromosome 3. E : dans les données d'ES sur

biopsies, disparition du pic d'hétérozygotie dans l'intervalle anormal (rouge) par rapport au reste du chromosome 3 (gris).

Les anomalies de nombre de copie de la région 3q ont déjà été associées par plusieurs auteurs à des anomalies de la pigmentation cutanée en mosaïque. Il s'agissait de CNV de taille variable, avec une région minimale critique en 3q27-q29 également impliquée chez notre patient. Le phénotype associé couvre un large spectre de manifestations inconstantes, dont des hyperpigmentations linéaires isolées (169) ou intégrées dans un syndrome polymalformatif (40). Sur la base de ces descriptions, nous avons fait l'hypothèse que le CNV observé chez notre patient était une tétrasomie en mosaïque. À partir d'une nouvelle biopsie cutanée à laquelle le patient a consenti, il nous a été possible de réaliser une FISH par apposition, qui a révélé la présence de 4 spots dans environ 40 % des cellules. Ce gain a également été confirmé en ACPA (Figure 24).

Figure 24 : Confirmation en FISH et en ACPA de la triplification 3q27-q29



Sonde EVI 1 Breakpart, Cytocell Aquarius.

Il est intéressant de constater que le gène *PIK3CA* est contenu dans l'intervalle présent en quatre copies (en 3q26.32), et pourrait expliquer l'hypertrophie des extrémités présentée par le patient. En effet, des mutations activatrices de *PIK3CA* sont responsables d'hypertrophies segmentaires associées à des manifestations vasculaires (78), regroupées sous le vocable *PIK3CA*-Related Overgrowth Syndrome (PROS). Il peut également être envisagé (Dr J.-B. Rivière, communication personnelle) que la présence de 4 copies fonctionnelles du gène soit responsable, par effet de dosage, d'une activité enzymatique équivalente à celle

résultant des mutations activatrices pathogènes. Des pistes thérapeutiques dans les PROS sont actuellement explorées, en faisant appel à divers inhibiteurs de la voie PI3K-AKT-mTOR (89,170). Sous réserve de l'efficacité réelle de ces médicaments, la découverte de ce CNV pour ce patient constitue un rationnel pour l'utilisation thérapeutique d'inhibiteurs spécifiques visant à stabiliser l'hypertrophie segmentaire et réduire les douleurs associées.

iii. Monosomies

Deux patients de la cohorte sont porteurs d'une délétion de grande taille, en mosaïque, de l'extrémité terminale du bras long du chromosome 13. De telles anomalies sont déjà rapportées dans la littérature, mais sans association avec un phénotype pigmentaire (171). En revanche, le chromosome 13 est fréquemment associé aux dyschromies en mosaïque, dans les trisomies 13 en mosaïques ou les anneaux du chromosome 13 (108).

Des délétions de grande taille en mosaïque sont détectables à l'aide de l'outil 1 de manière très similaire aux gains partiels, avec une déviation des Z-scores en miroir. L'étude des FA est également perturbée dans l'intervalle délété, avec décalage et atténuation du pic des SNP hétérozygotes variable selon le niveau de mosaïcisme.

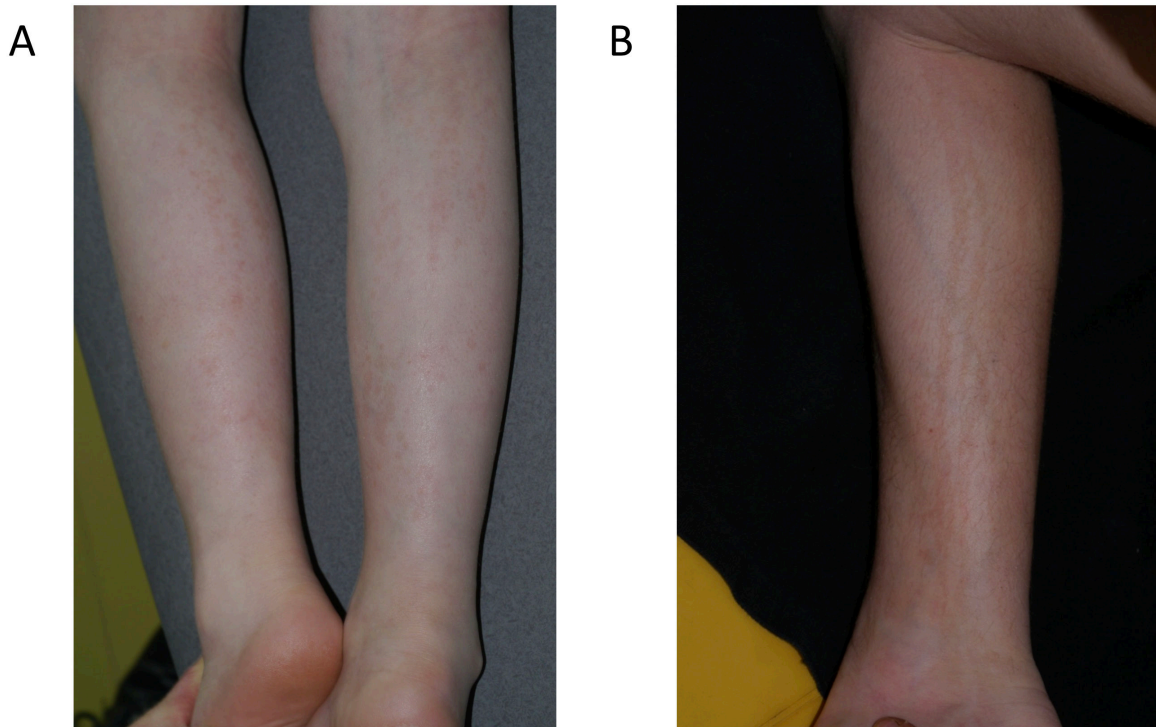
En revanche, l'outil 3 reste dans ce cas non informatif, car des SNP hérités des deux parents sont bien présents.

Exemple : Monosomie 13q13.3-qter de 79,1Mb (sujet 1274)

Il s'agit d'un garçon âgé de 10 ans au moment de l'inclusion, présentant une dépigmentation en bandes, difficilement détectable chez ce patient au phototype clair. Elle a été initialement identifiée lors d'épisodes inflammatoires, au cours desquels les régions hypopigmentées prenaient volontiers une teinte plus sombre que la peau environnante (Figure 25). Le patient présente également de petites alopecies millimétriques du vertex, et une couleur des cheveux non homogène (bruns et blonds, crépus), un retard de croissance pré- et post-natal une ambiguïté sexuelle détectée à l'échographie à 29SA, un hypospade postérieur sévère, une hypo-dysplasie rénale bilatérale avec insuffisance rénale, une dysmorphie cranio faciale (brachycéphalie, occiput plat, hypertélorisme, nez en poire avec hypoplasie des narines, brachydactylie), une constipation chronique ; une hernie inguinale, une surdité de perception bilatérale, une agénésie partielle postérieure du corps calleux, un astigmatisme et une myopie, un retard de développement psychomoteur important.

Devant les signes échographiques, il avait bénéficié d'une amniocentèse à 25SA+3, avec caryotype normal.

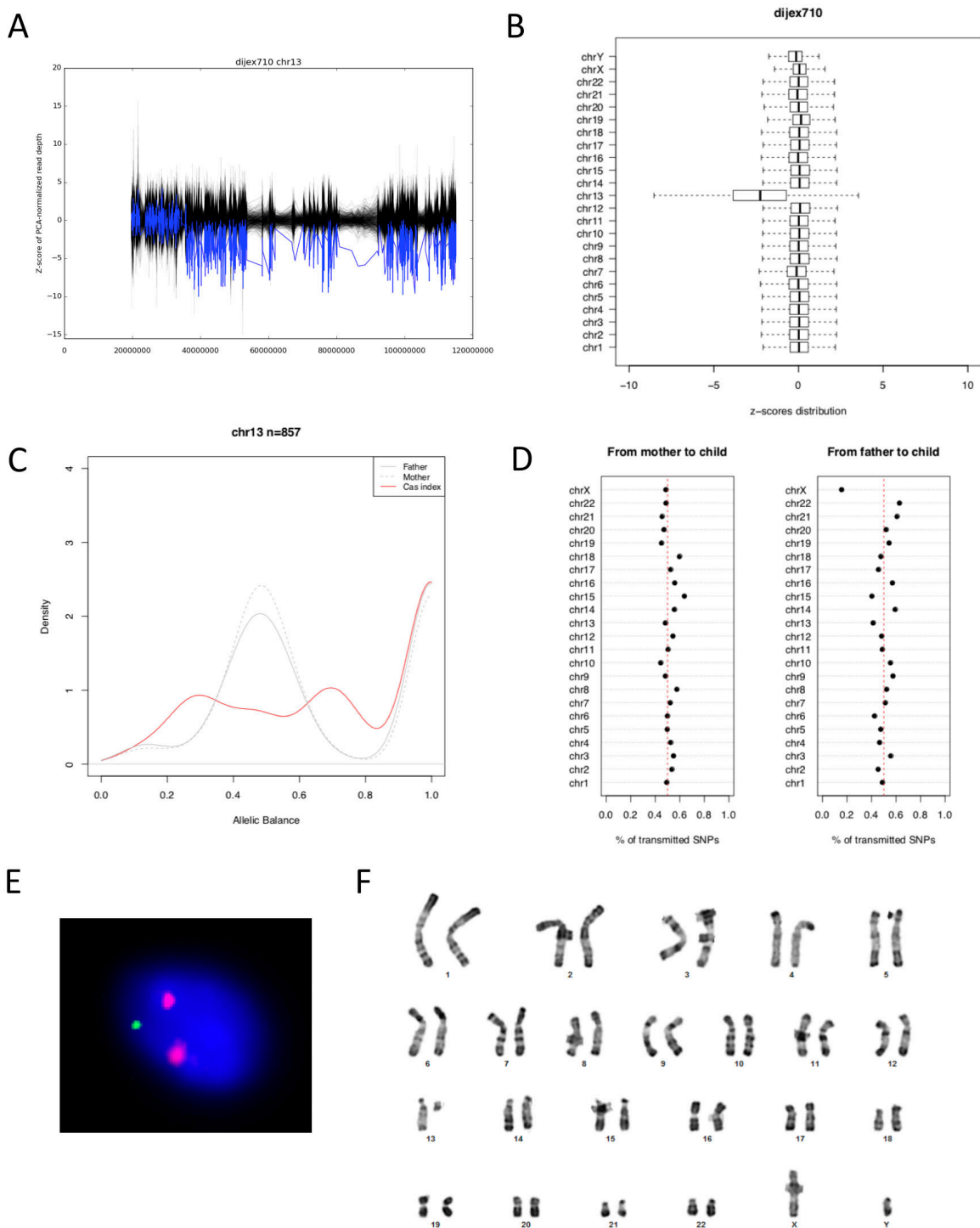
Figure 25 : Dépigmentations en bande chez le sujet 1274



La visibilité des bandes hypopigmentées (A) augmente, par contraste avec le territoire sain, lors de multiples épisodes de poussée inflammatoires (B). Photographies Dr Alice PHAN, Hospices Civils de Lyon.

Les données d'ES (Figure 26) montrent une diminution de la profondeur de séquençage d'environ 70Mb en 13qTer (A et B), avec anomalie de la fraction allélique (C), sans anomalie de transmission parentale des SNV (D). Les parents ayant accepté une nouvelle biopsie cutanée, une FISH sur apposition de tissu frais a pu être réalisée, qui a montré une délétion terminale du chromosome 13 dans 27 % des mitoses (Figure 26.E). En ACPA, on note une perte correspondant à une délétion dans 23 % des cellules (données non présentées). Enfin, il a été possible de ré-analyser les lames réalisées à partir du prélèvement de liquide amniotique : seule une mitose présentant la délétion a été visualisée (F), sur un matériel partiellement conservé, ce qui n'aurait pas permis de porter le diagnostic en période anténatale. Il est ainsi possible d'affirmer qu'il ne s'agit pas ici d'un chromosome 13 en anneau.

Figure 26 : Données d'ES, FISH (Sonde RB1) et caryotype prénatal en bandes R du sujet 1274



iv. Mixoploïdie

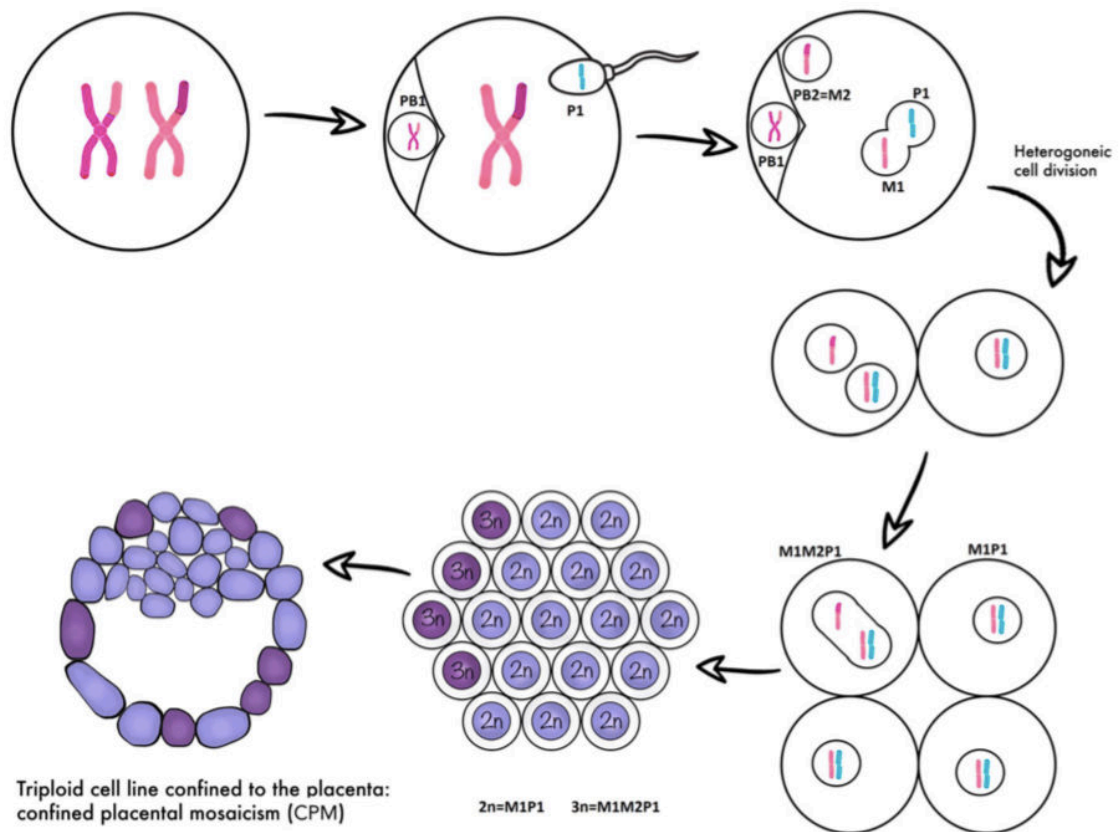
Quatre patients sont porteurs d'une mosaïque de cellules diploïdes et triploïdes, tableau également nommée mixoploïdie. Il pourrait résulter, d'après le modèle décrit par Carson et collaborateurs (41), de la présence au sein du zygote d'un troisième lot chromosomique haploïde, d'origine paternelle par incorporation tardive dans l'ovocyte d'un second spermatozoïde, ou d'origine maternelle par non-éjection du second globule polaire (Figure 27). La première division du zygote serait dans cette hypothèse une division asymétrique, donnant naissance à une cellule fille diploïde et une cellule fille triploïde. Au fil des divisions successives, la proportion relative de ces deux populations peut évoluer, généralement au détriment de la lignée triploïde qui devient minoritaire.

Dans ce tableau, la normalité des résultats de l'outil 1 s'explique par la présence d'un chromosome excédentaire de chaque paire dans des proportions similaires : il n'y a donc pas de variation quantitative détectable entre deux chromosomes. Cette configuration est possible en cas de transmission d'un chromosome X supplémentaire chez une fille (d'origine paternelle ou maternelle), mais n'est pas envisageable chez un garçon chez lequel on verrait un déséquilibre touchant les gonosomes, tel que celui détecté pour le sujet 4165.

L'étude des FA est en revanche perturbée pour l'ensemble des chromosomes, de même que l'outil 3 montre un excès de transmission des SNP pour les tous les chromosomes.

L'hypothèse d'une contamination par un ADN parental peut être exclue devant la disparition, en représentation SNP-*array*, de la ligne des SNP hétérozygote qui persisterait en cas de présence de SNP hétérozygote communs au cas index et à son parent.

Figure 27 : Mixoploïdie par défaut d'éjection du second globule polaire.



Mécanisme de mixoploïdie proposé par Carson et collaborateurs (41).

Exemple : triploïdie en mosaïque, d'origine maternelle, chez une fille (sujet 4590).

Chez une patiente présentant un tableau de LWNH associé à un syndrome de Poland (hypoplasie du membre supérieur droit et du grand pectoral droit, Figure 28), pour laquelle les explorations chromosomiques par ACPA étaient normales, nous avons réalisé un séquençage d'exome en trio.

Figure 28 : LWNH et Syndrome de Poland chez une jeune fille.



Photographie Pr Leheup / Dr Bursztejn

Aucune anomalie n'était détectée par les outils 1a et 1b (données non montrées). En revanche, l'outil 2 montrait un profil pathologique pour l'ensemble des chromosomes : disparition du pic de variations hétérozygotes, remplacés par deux pics de plus faible taille à environ 40 % et 50 % de fraction allélique, et apparition d'un pic significatif à 20 % (Figure 29). Enfin, l'outil 3 montrait un excès de transmission des SNPs de la mère, pour l'ensemble des chromosomes.

La présence d'un allèle supplémentaire a été confirmée par l'étude des microsatellites, montrant un pic excédentaire minoritaire à plusieurs loci informatifs, correspondant à un allèle maternel (Figure 30).

Figure 29 : Profil de fraction allélique (chromosome 11, gauche) et transmission des SPNs parentaux (droite)

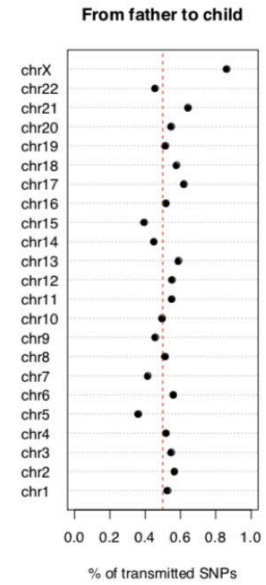
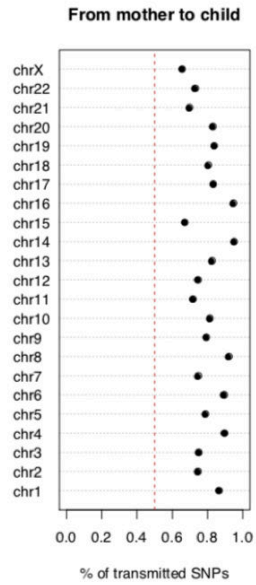
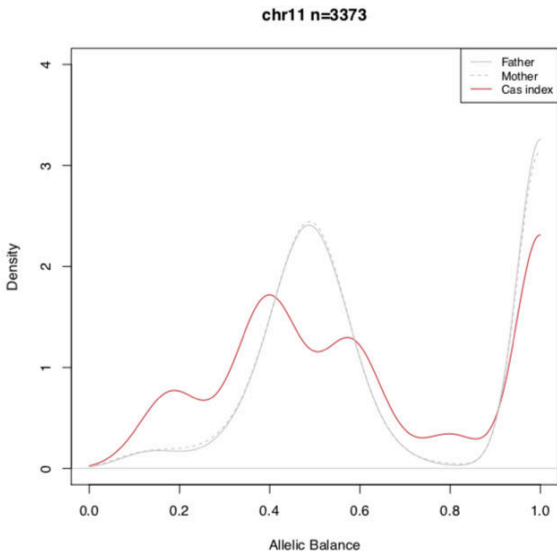
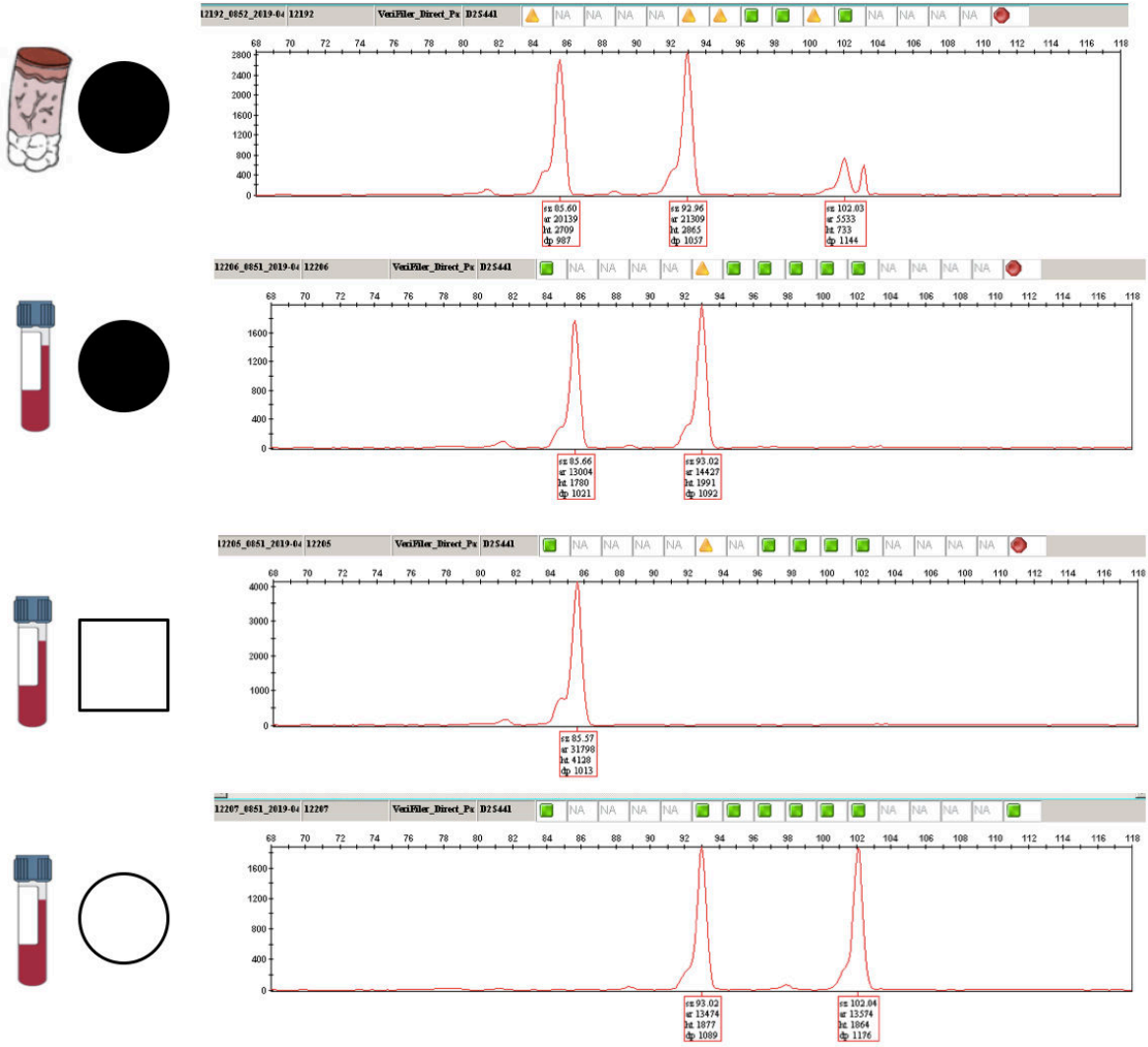


Figure 30 : Profils des microsatellites au locus D2S441



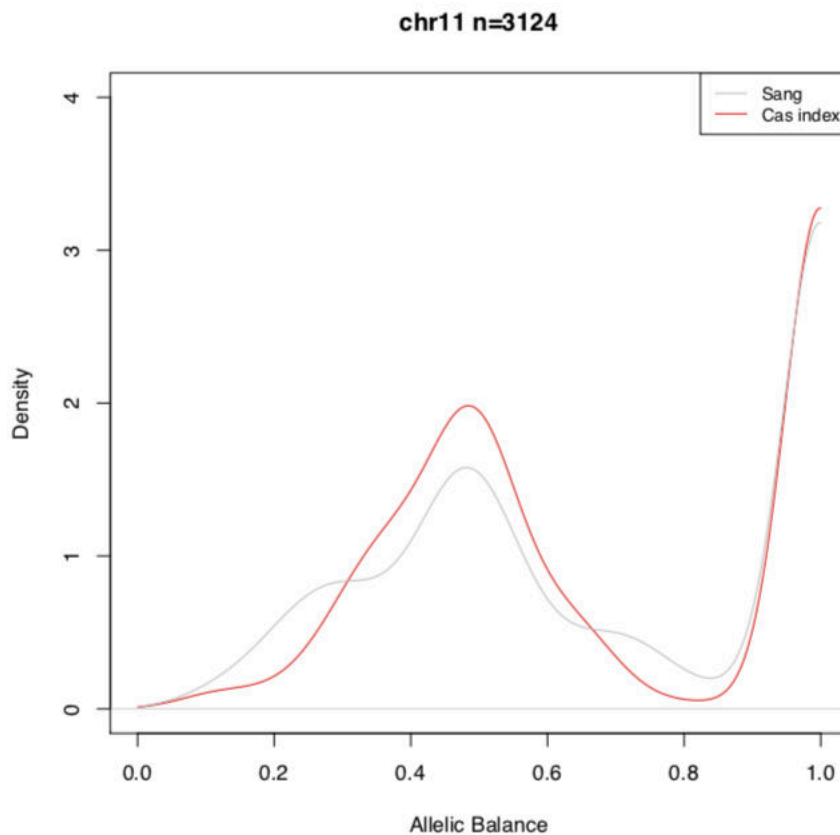
L'étude en microsatellites montre un allèle excédentaire d'origine maternelle.

v. Disomies uniparentales

Des situations de disomies uniparentales pour un bras chromosomique entier ont été détectées chez trois patients de la cohorte M.U.S.T.A.R.D. n'appartenant pas au groupe pigmentaire.

Un sujet (n° 4204) est porteur d'une disomie uniparentale (DUP) du chromosome 11, détecté par l'outil 2 (étude des fractions alléliques, Figure 31). Ce patient avait été inclus dans la cohorte M.U.S.T.A.R.D. devant une inégalité de longueur de membres, par hypertrophie segmentaire. La détection d'une DUP permet de porter chez ce patient le diagnostic de syndrome de Beckwith-Wiedemann, qui doit être confirmé par une méthode diagnostique conventionnelle.

Figure 31 : Patient n°4204 : Anomalie de répartition des fractions alléliques



Cette même anomalie de fraction allélique est visible tant dans la biopsie cutanée (rouge) que dans le sang (gris), visible par l'élargissement du pic des hétérozygotes, et l'apparition de pics secondaires dans le sang.

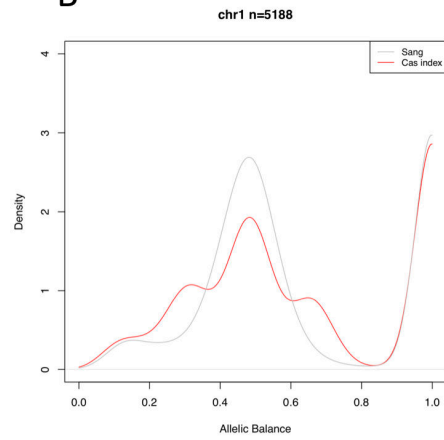
Par ailleurs, deux sujets (2421 et 1882) avaient été inclus dans la cohorte M.U.S.T.A.R.D. avec un diagnostic de Porokératose de Mibelli (nappes linéaires d'hyperkératoses, bien limitées). Il s'agit d'une affection autosomique dominante, pour laquelle plusieurs gènes de la voie des isoprénoïdes sont connus. La forme particulièrement marquée présentée par les deux patients étudiés, non apparentés, contrastant avec une présentation clinique plus discrète chez d'autres membres de la famille, faisait suspecter l'existence d'un second évènement (mosaïque segmentaire de type 2), comme rapporté récemment (72,172). Pour ces deux sujets, une perte d'hétérozygotie (disomie uniparentale en mosaïque) a été détectée, pour les bras longs du chromosome 1 ou du chromosome 16 (Figure 32). Dans les deux cas, cet évènement conduisant à l'augmentation de la fraction allélique d'une variation ponctuelle héritée du père, respectivement au sein des gènes *PMVK* (Porokeratosis 1, OMIM #607622) et *MVD* (Porokeratosis 7, OMIM #614714). La perte de l'allèle sain dans les cellules porteuses de la DUP est probablement responsable de la présentation clinique particulière.

Figure 32 : Disomie uniparentale et Porokeratose de Mibelli chez deux sujets.

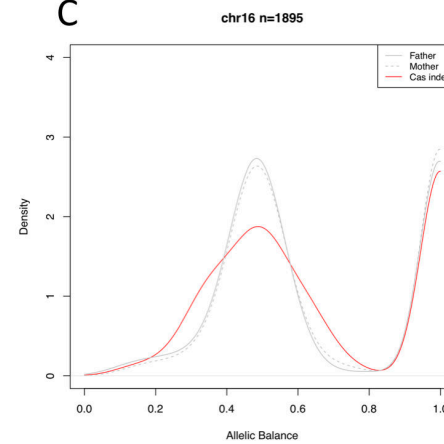
A



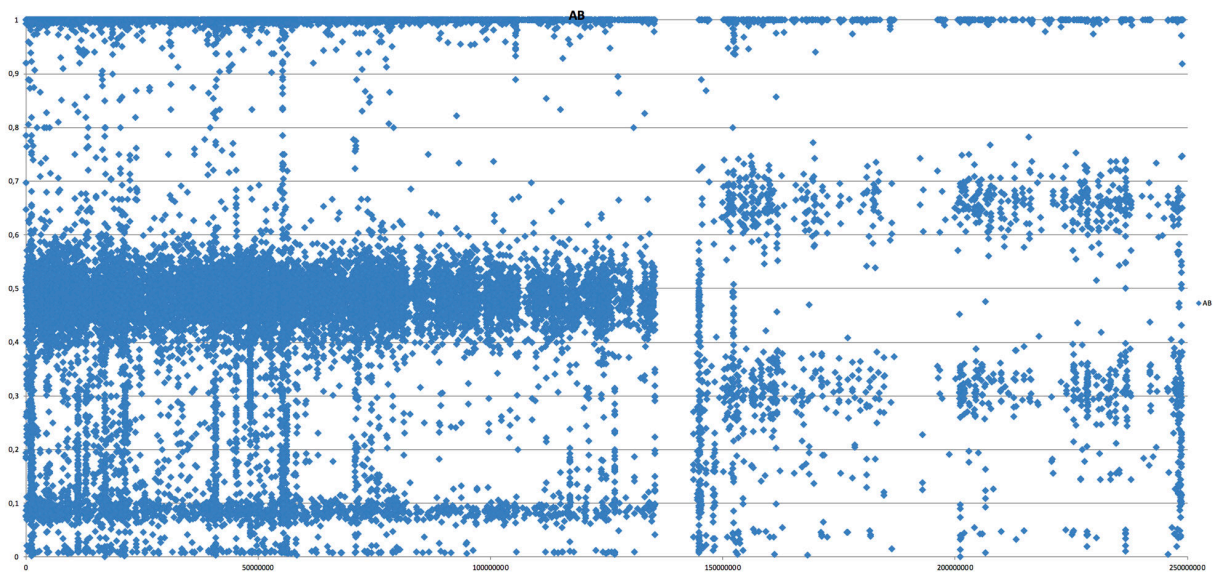
B



C



D



A : atteinte de la face postérieure du membre inférieur droit du sujet 1882 (Photographie Pr Hadj Rabia, Necker Enfants Malades). B et C : anomalies de répartitions des fractions

alléliques pour les chromosomes 1 (sujet 1882) et 16 (sujet 2421), dans les données d'ES de biopsie uniquement (rouge) : élargissement du pic d'hétérozygotes). À l'analyse détaillée des rapports d'ES en SNV du sujet 2421 (étudié en trio), on s'aperçoit que les variations héritées du père sur le bras long du chromosome 16 sont présents à une fraction allélique de 60-70 %, et ceux hérités de la mère aux alentours de 30 % (données non présentées). Dans le cas du sujet 1882, on peut représenter les fractions alléliques des variations du chromosome 1 à la manière d'une SNP-array (D : représentation d'environ 25 000 SNV présents sur le chromosome 1, non filtrés sur la qualité de séquençage) : l'anomalie de répartition des fractions alléliques ne concerne également que le bras long. L'étude de la variation familiale du gène *PMVK* par NGS ciblé (données non présentées) montre que cette variation héritée du père est présente dans 70 % des lectures.

V. Discussion et Perspectives

1. Hétérogénéité des étiologies génétiques des dyschromies en mosaïque

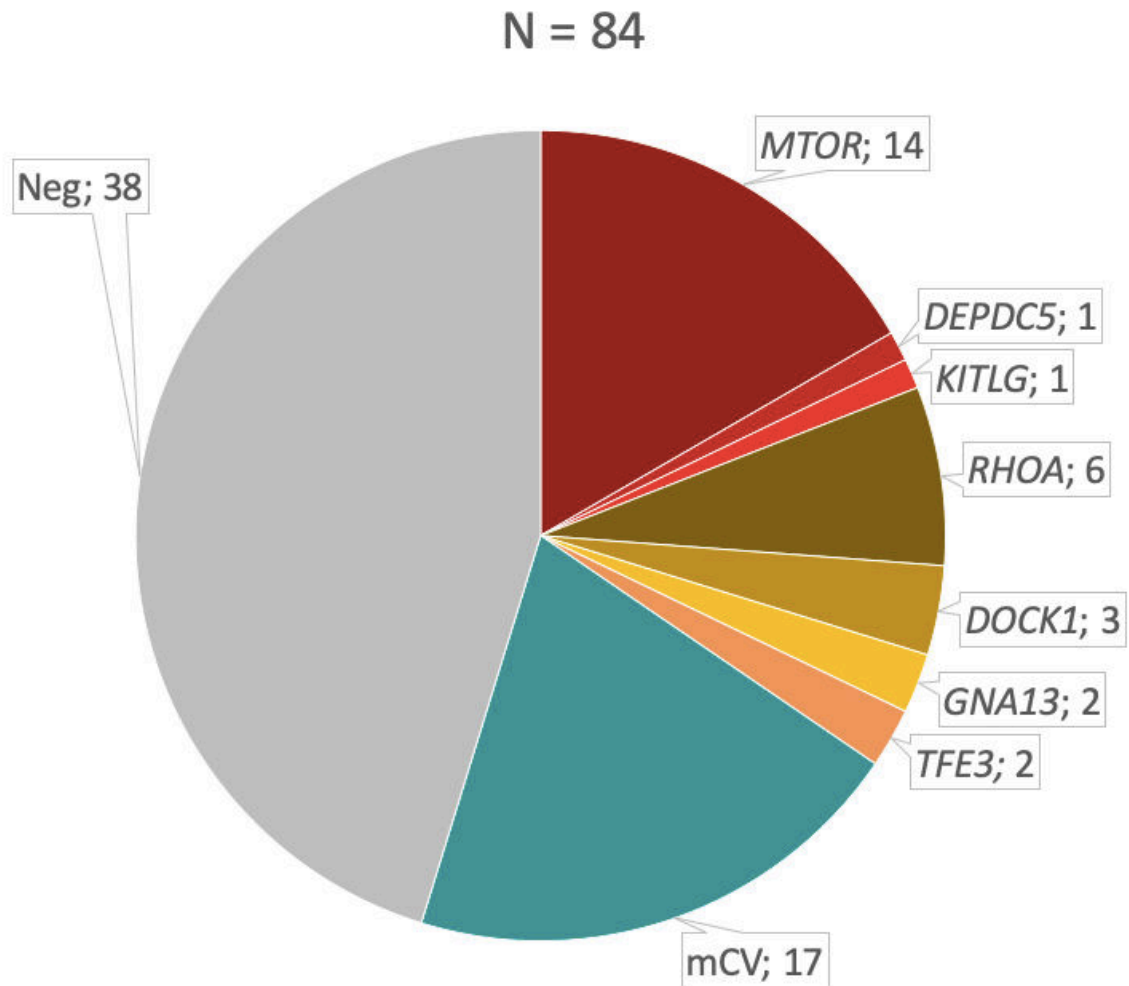
L'analyse de 88 patients de la cohorte M.U.S.T.A.R.D. avec dyschromie en mosaïque en séquençage haut débit a permis de mettre en lumière la vaste diversité de causes génétiques associées à ces phénotypes rares. Des variations nucléotidiques post-zygotiques ont été identifiées dans 6 gènes, dont 3 associés pour la première fois à une anomalie du développement (*RHOA*, *DOCK1*, *GNA13*). Un gène associé à une nouvelle affection de transmission dominante liée à l'X avec mosaïcisme fonctionnel a également été identifié. Pour la majorité de ces affections, le phénotype comporte une hypopigmentation cutanée en mosaïque. Seuls les gènes *KITLG* et *TFE3* sont associés à une hyperpigmentation. Cette fréquence relative plus élevée de l'HI par rapport aux tableaux pigmentés, a déjà été constatée dans plusieurs revues de la littérature (15,108) et dans la cohorte M.U.S.T.A.R.D. L'inclusion de patients avec associations syndromiques reconnaissables peut avoir induit un biais de recrutement associations syndromiques reconnaissables, qui peuvent avoir induit un biais de recrutement, augmentant la proportion de patient similaires suite à plusieurs appels à collaboration. Par ailleurs, 17 variations chromosomiques différentes ont été identifiées.

2. Rendement diagnostique

En tenant compte des variations nucléotidiques et chromosomiques, une cause génétique a été identifiée chez 46 patients (55 % de la cohorte, Figure 33). Cette valeur est comparable à celle rapportée dans les revues précédemment citées, qui cependant n'incluent pas les variations nucléotidiques, alors inconnues. Il aurait donc pu être attendu un meilleur taux de résolution dans notre cohorte. Une différence notable entre ces cohortes est l'absence dans notre série de variations chromosomiques impliquant les gonosomes, constitutionnelles telles que des translocations X;autosome, ou en mosaïques (syndromes de Turner ou de Klinefelter en mosaïque). Ces variations, qui peuvent être trouvées chez environ 10% des patients (15) sont en effet facilement détectables dans le sang par les méthodes de cytogénétique conventionnelles. Les patients porteurs de ces variations, qui peuvent être identifiées par tous

les laboratoires de cytogénétique, ne sont donc pour la plupart probablement pas adressés au centre de référence de Dijon.

Figure 33 : Résultats de l'étude en NGS de 84 patients avec dyschromie en mosaïque



Une variation a été identifiée chez 46 patients (55% des patients étudiés).

3. Identification de présentations syndromiques reconnaissables

Parmi les affections diagnostiquées au sein de la cohorte, plusieurs entités syndromiques reconnaissables ont pu être identifiées, permettant de décrire plusieurs formes reconnaissables d'hypomélanose d'Ito. La fréquence élevée de l'HI, et son association à des signes extra-cutanés variables, ont entraîné une confusion dans la littérature. Il a ainsi été

considéré que l'HI n'était pas une entité syndromique propre, mais une manifestation non spécifique d'un mosaïcisme, essentiellement chromosomique (173). Le présent travail montre qu'un phénotypage initial précis, tenant compte des diverses atteintes extra-cutanées, est indispensable à pour la caractérisation des syndromes comportant une HI, et a permis l'identification de causes monogéniques jusqu'alors inconnues. Ce phénotypage basé sur l'analyse clinique est un préalable indispensable au séquençage d'*exome*, puisqu'il guide l'identification d'un gène candidat commun chez plusieurs patients cliniquement similaires. À l'inverse, l'identification de la même mutation chez des patients partageant la même atteinte cutanée, mais au phénotype moins similaire par ailleurs, a conduit à une réanalyse critique *a posteriori* du phénotype de ces patients à la lumière des données du génotype (« phénotypage réverse » ou « *reverse phenotyping* » (174)), et constitue une démarche complémentaire de la caractérisation clinique *a priori* (« *phenotype first* »).

En synthèse, les associations suivantes peuvent être décrites :

Mutations post-zygotiques du gène *RHOA* : Dépigmentation linéaire, asymétrie faciale, brachydactyles, anomalies dentaires, anomalies de substance blanche, développement intellectuel normal.

Mutations post-zygotiques du gène *DOCK1* : Dépigmentation linéaire à limites nettes, kératose folliculaire et dépilation sur le territoire hypopigmenté, épilepsie ou retard de développement possible, sans anomalie de la morphologie faciale.

Mutations de post-zygotiques du gène *GNA13* : Très ressemblant au phénotype associé aux mutations post-zygotiques du gène *RHOA*, atteintes malformatives potentiellement plus sévères, intellect préservé

Mutations post-zygotiques du gène *mTOR* : Dépigmentation linéaire, épilepsie et déficience intellectuelle, macrocéphalie

Mutations constitutionnelles ou post-zygotiques du gène *TFE3* : Hypo ou hyperpigmentations linéaires, petite taille, retard global, morphologie faciale évocatrice (dysplasie fronto-nasale).

Lorsqu'un patient est adressé au laboratoire, si l'étude de son phénotype permet de suspecter le rôle de l'un de ces gènes, un séquençage ciblé en profondeur est proposé en première intention plutôt qu'une étude de l'exome.

4. Identification d'une nouvelle famille de maladies en mosaïque

Les gènes *RHOA*, *DOCK1* et *GNA13* appartiennent tous trois à la famille des petites GTPases Rho ou de leurs facteurs d'échange de guanine. Devant les similitudes cliniques de ces affections (en particulier l'asymétrie faciale, les anomalies des extrémités, l'aspect inflammatoire et fragile des territoires dépigmentés, et les anomalies à l'IRM cérébrale), il est possible d'esquisser un portrait général d'une nouvelle classe d'affections en mosaïques. Ce groupe de maladies pourrait être nommé « rhopathies en mosaïque », par analogie avec les rasopathies, causées par différentes mutations dans des gènes de la voie Ras.

Il sera sans doute intéressant à l'avenir d'accorder une attention particulière aux variations présentes dans d'autres gènes de la voie Rho chez les patients actuellement sans diagnostic. Devant le grand nombre de gènes impliqués dans cette voie, et leurs fonctions variées, il est envisageable que d'autres affections soient encore à identifier dans cette voie.

5. Variations chromosomiques et compréhension de la physiopathologie des dyschromies en mosaïque

La confirmation de l'association des anomalies chromosomiques en mosaïques avec les dyschromies en mosaïque ne permet malheureusement pas de préciser le mécanisme d'apparition de ces troubles pigmentaires. En effet, s'agissant de remaniements de grande taille, de nombreux gènes sont concernés, et il est difficile dans la plupart des cas d'isoler le rôle de l'un d'entre eux en particulier.

Par ailleurs, le phénotype associé à ces variations est extrêmement variable d'un patient à l'autre. On peut citer l'exemple de la trisomie 7 en mosaïque, détectée ici chez un patient porteur d'une dépigmentation linéaire et d'une anomalie de substance blanche : elle est rapportée dans la littérature chez des patients dont le développement psychomoteur peut être normal ou fortement impacté, dans un contexte isolé ou malformatif (43,175,176).

L'identification de telles variations, par exemple en période prénatale, ne permettra pas de formuler un pronostic précis.

6. Rendement des outils bioinformatiques de détection d'anomalies chromosomiques

Devant la diversité des anomalies chromosomiques détectées, l'hétérogénéité clinique des patients, et l'absence de stratégie de référence dans cette thématique, il est difficile d'estimer la sensibilité de notre approche. La combinaison d'une méthode semi-quantitative (étude de la variation de profondeur de séquençage) et de deux méthodes qualitatives (étude des fractions alléliques et des taux de transmission des allèles parentaux) permet d'envisager une sensibilité élevée, même pour des mosaïques assez faibles. Ainsi, notre approche semble plus efficace pour la détection d'une trisomie 15 en mosaïque, avec DUP maternelle, qu'une étude ciblée par MLPA méthyl-sensible, qui atteint ses limites en dessous de 25% mosaïque (129). Des données de génome complet permettraient probablement d'améliorer la détection d'évènements de plus petite taille (le plus petit évènement détecté dans ce travail étant un gain de 20Mb), mais la profondeur de séquençage moyenne de plus de 100X nécessaire pour un calcul fiable de la fraction allélique rend le coût de cette méthode encore élevé en 2019.

7. Nécessité d'une lecture combinée SNV et chromosomique

Plusieurs exemples d'un second évènement chromosomique, révélant le caractère pathogène d'une mutation ponctuelle, ont été apportés par ce travail, en particulier dans le cas de la prokeratose de Mibelli. D'autres situations restent encore à explorer, par exemple dans le cas du sujet 4799. La récurrence d'anomalies impliquant le bras court du chromosome 11 a effectivement déjà été décrite dans la littérature (177) chez des patients présentant un nævus de Spitz. La présence de multiples nævi chez la patiente faisait supposer l'existence d'un second évènement, chromosomique ou nucléotidique, qui n'a à ce jour pas été identifié.

Ces résultats préliminaires, tout en confirmant la polyvalence de cette méthode, plaident pour une lecture pluridisciplinaire des données d'ES, à la fois cytogénétique et moléculaire. Cet aspect doit être pris en compte dans la formation des futurs praticiens, à l'heure où la complémentarité de ces deux disciplines est particulièrement mise en évidence par les nouvelles techniques d'études des maladies génétiques.

8. Automatisation de l'interprétation des données d'ES

L'ensemble des rapports produits au cours de ce travail ont été interprétés indépendamment par deux lecteurs. Au total, pour chaque patient, 23 (sujets féminins) ou 24 (sujets masculins) graphiques ont été générés pour l'outil 1A, 1 pour l'outil 1b, 23 pour l'outil 3 et 1 pour l'outil 3, soit 48 ou 49 graphiques à interpréter. Il n'y a pas eu de divergence d'interprétation, ce qui est en faveur d'une relative simplicité de cette analyse. En revanche, il est à noter que la durée d'analyse par patient se voit augmentée de 10 à 15 minutes, par rapport à l'analyse SNV conventionnelle. À l'échelle d'une grande cohorte, ou d'une généralisation de cette méthode à d'autres indications, un travail d'automatisation de la détection de résultats anormaux doit être entrepris, et est actuellement en cours. Cette mise à jour majeure du pipeline devra être validée sur une cohorte plus importante. Dans cet objectif, une collaboration avec l'équipe du Pr Veronica Kinsler, University College of London, a été initiée, et 40 exomes de patients porteurs d'une dyschromie en mosaïque seront analysés. Sur une première série de 6 exomes, 2 anomalies chromosomiques ont déjà été détectées (1 syndrome de Pallister Killian et 1 trisomie 15 en mosaïque).

9. Validation par une seconde méthode

La découverte d'anomalies chromosomiques en mosaïque par technique d'ES pose également la question de la validation des résultats, qui doit nécessairement être fournie par une technique de référence. Malgré les essais réalisés avec 3 protocoles d'extraction différents, il reste inenvisageable d'obtenir pour la majorité des patients une qualité et une grande quantité d'ADN autorisant la réalisation d'une ACPA pour la validation des variations chromosomiques.

Ainsi, depuis les premiers résultats de ce travail, une apposition sur lame blanche, conservée au congélateur, est systématiquement réalisée lors de la réception d'un prélèvement de patient porteur d'une dyschromie en mosaïque, permettant la réalisation ultérieure d'une FISH.

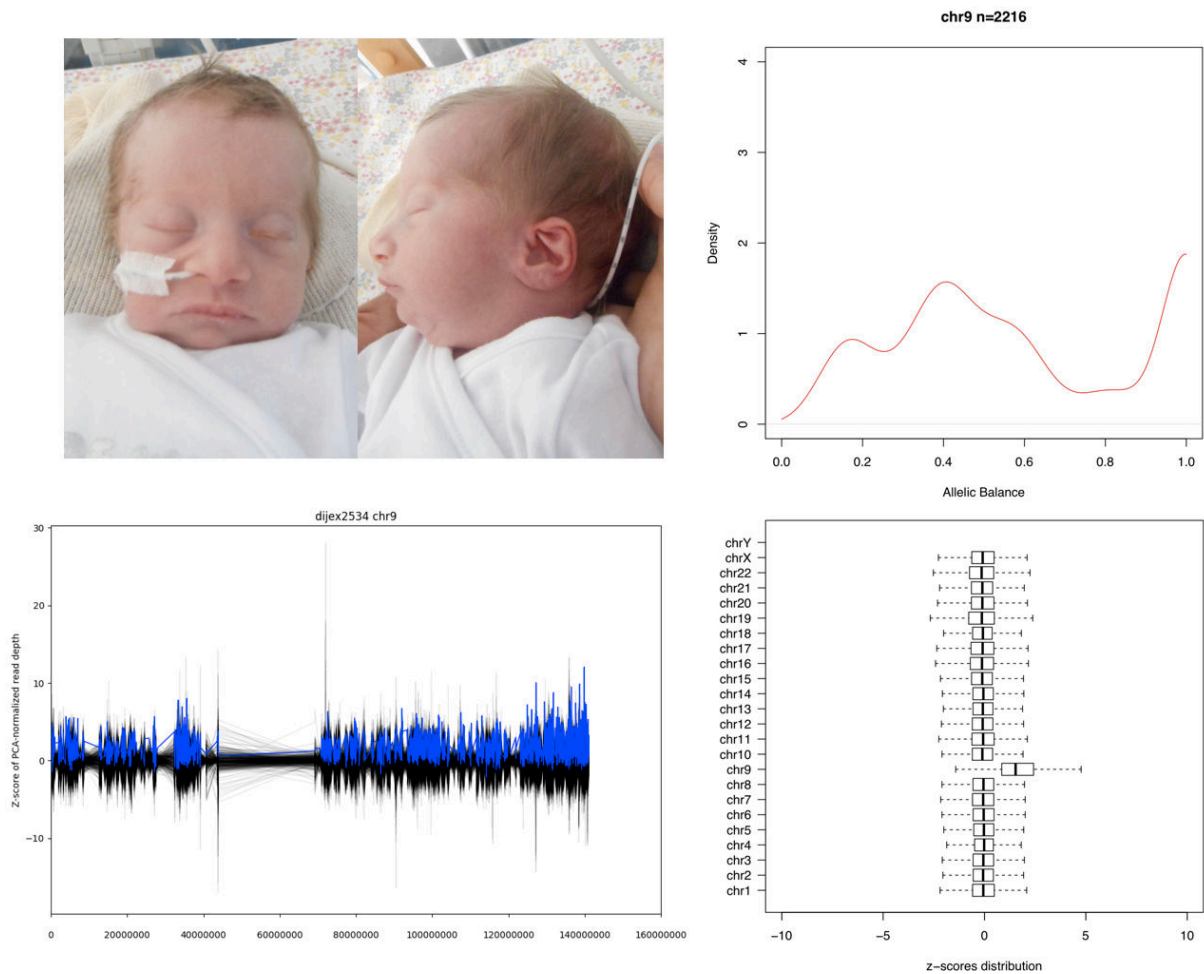
Devant l'hypothèse d'une disomie uniparentale, des techniques d'analyse des microsatellites pourraient être mises en œuvre. Ces techniques sont accessibles au Laboratoire de Génétique Chromosomique et Moléculaire de Dijon, mais ne sont actuellement pas réalisées systématiquement.

10. Généralisation de la méthode

L'importante diversité des anomalies détectées par cette approche permet d'envisager qu'elle soit également pertinente dans d'autres indications, comme les anomalies du développement avec ou sans déficience intellectuelle, ou les syndromes malformatifs à révélation anténatale. En effet, il peut paraître souhaitable d'explorer, en une seule technique, et à partir d'un prélèvement unique, une vaste gamme d'étiologies génétiques. Dans cet objectif, nous avons entrepris d'évaluer l'apport de cette méthode dans diverses indications sortant du cadre des anomalies cutanées en mosaïque. Sur un premier échantillon de 140 cas index, les premiers résultats sont en faveur d'un rendement diagnostique modéré de 2,9%, permettant la résolution de cas atypiques, tels que des disomies uniparentales ou des mosaïques à faible taux (un sujet porteur d'une trisomie 9 en mosaïque (Figure 34), deux sujets porteurs d'une isodisomie uniparentale homogène pour un chromosome entier (17 et 22), et un sujet porteur d'une mosaïque d'isodisomie uniparentale maternelle du chromosome 8).

Dans le contexte du plan France Médecine Génomique 2025, prévoyant la généralisation des techniques de séquençage haut débit dans la prise en charge des patients atteintes de maladies rares génétiques, ce travail pourrait apporter un éclairage utile sur la diversité des stratégies d'analyses applicables à partir du séquençage d'exome et, à l'avenir, de génome.

Figure 34 : détection d'une trisomie 9 en mosaïque



Trisomie 9 en mosaïque chez une patient présentant des particularités de la morphologie faciale, des malformations cérébrales et cardiaques, détectée dans le cadre de l'application des outils mis au point pour ce travail de thèse aux patients de la cohorte « anomalies du développement » (constitutionnelles) du laboratoire.

11. Limites de la stratégie d'analyse actuelle

La stratégie employée pour l'étude des bases moléculaires des anomalies de la pigmentation cutanée en mosaïque, en deux temps (une analyse d'exome en trio, sur prélèvement de tissu atteint, en cas d'absence d'orientation diagnostique, ou une analyse ciblée d'un ou plusieurs gènes en cas de présentation clinique évocatrice d'un syndrome identifié), a montré une relative efficacité. Cependant, l'approche actuelle comporte plusieurs limites, pour lesquelles des améliorations pourront être envisagées :

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

Problème de la détection des mosaïques à faible taux – Les variants présents à des taux inférieurs à 10 % dans au moins une lecture, ne sont pas détectés par l'outil de *variant calling*, intégré au protocole actuel (GATK). Ils doivent donc être recherchés manuellement, par la revue sur IGV des gènes candidats. Cette approche est donc inadaptée à la découverte de nouveau gène d'intérêt. Pour autant il a été démontré qu'en séquençage d'exome sur technologie Illumina, la significativité peut être atteinte à partir de 3 lectures portant la variation (10). D'autres outils de *variant calling* doivent donc être envisagés.

Mosaïcisme physiologique – Une autre limite de l'approche en trio est l'accumulation de mosaïcisme inter- et intra-organe qui survient avec l'âge, et qui peut être une source de confusion : jusqu'à 551 SNV et 28 indels ont par exemple été détectés chez une patiente centenaire (178). De telles variations constitueraient donc des faux-positifs. Les données dans la littérature à ce sujet sont encore trop rares pour identifier des points-chauds de « mutations somatiques physiologiques » qu'il conviendrait d'exclure de l'analyse.

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

Quantité minimale d'ADN – Le ES en profondeur nécessite actuellement un minimum de 3 à 5µg d'ADN, qui ne sont pas toujours disponibles compte tenu de la petite taille de la plupart des prélèvements. Si l'amélioration des techniques de séquençage autorisera peut être à l'avenir de travailler à partir de volumes plus faibles, il est aujourd'hui nécessaire de

développer des techniques complémentaires, moins consommatrices d'ADN. Dans ce contexte, un panel permettant l'étude d'un petit nombre de gènes, dont les gènes identifiés lors de ce travail, et nécessitant environ 10 fois moins d'ADN, est en développement.

De même permettre la détection des variations chromosomiques sur les données d'exome, pour éviter le recours à l'ACPA en complément de la recherche de SNP par NGS, permet d'éviter la multiplicité des examens.

Pertinence des bases de données de variants – Lors de l'interprétation des données issues d'ES, il est utile d'interroger des bases de données permettant de classer un variant selon ses conséquences fonctionnelles connues – bénin, pathogène, indéterminé, non répertorié. Deux bases de données majeures peuvent être citées : ClinVar (119), répertoriant l'ensemble des variants, et COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer) (120) dédiée aux variants somatiques présents dans des prélèvements tumoraux. Aucune de ces deux bases n'est donc réellement adaptée aux mutations post-zygotiques : elles ne peuvent pas être enregistrées dans COSMIC, et leur nature particulière n'est pas identifiable dans ClinVar, où il n'existe pas de catégorie « *post-zygotic* ». En l'absence d'évolution de ClinVar pour permettre l'intégration des variations post-zygotiques, une base de données spécialisée reste donc à créer.

12. Conséquences sur le conseil génétique

L'identification des causes génétiques des dyschromies en mosaïque, a mis fin chez ces patients à l'inévitable incertitude diagnostique, et a permis de préciser leur conseil génétique. Au sein de la fratrie, dans le cas d'une mutation post-zygotique, le risque de récurrence dans la fratrie peut être considéré comme nul. À la différence des mutations constitutionnelles *de novo*, le risque de mosaïque germinale parentale (179), qui donnerait lieu à une atteinte homogène chez un autre enfant de la fratrie, n'existe pas. Pour la descendance du patient lui-même, à la lumière des résultats de ce travail, deux cas de figures peuvent être distingués.

D'une part, pour des gènes nécessaires au développement et dont les mutations sont létales en période embryonnaire, tels que *RHOA*, *DOCK1* et *GNA13*, le risque est virtuellement nul. Pour ces gènes, aucun phénotype associé à des mutations constitutionnelles n'est connu. Il existe cependant un risque théorique de fausse-couche précoce plus élevé, si la mosaïque comporte également une atteinte de la lignée germinale (mosaïque somato-gonadique (180)).

D'autre part, dans le cas des variations des gènes *MTOR*, *KITLG* ou *DEPDC5*, une forme constitutionnelle est rapportée. Elle est éventuellement différente sur le plan phénotypique de la forme en mosaïque, et potentiellement plus sévère car présente de manière homogène dans toutes les cellules et plus précocement au cours du développement embryonnaire. Ainsi, un patient porteur d'une forme en mosaïque présente un risque, en cas d'atteinte de la lignée germinale, de transmission de la mutation à sa descendance, à l'origine d'une forme clinique plus sévère.

À ce jour, il n'a pas été rapporté de cas de transmission à la descendance de mutation post-zygotique d'un parent, ni d'hypofertilité en lien avec des fausses-couches. Cette absence de données peut s'expliquer par le fait que l'identification des bases moléculaires des affections en mosaïque est récente, et que le recrutement des patients est principalement pédiatrique. Un suivi prospectif de la cohorte pourrait permettre de répondre à ces interrogations. Afin de préciser ce risque, une collaboration est en cours de constitution avec l'équipe du Pr Anne Goriely (Oxford) dans le cadre du projet PREGCARE⁵, visant à préciser le risque de récurrence en cas de mutation en mosaïque. Dans un premier temps, ce protocole permettra de rechercher une atteinte de la lignée germinale chez des patients masculins porteurs de mutations postzygotiques responsables de dyschromie en mosaïque ou d'autres atteintes en mosaïque, en particulier les mutations de *PIK3CA*.

13. Perspectives thérapeutiques

L'identification des bases moléculaires d'une affection est un pas important vers l'élaboration de pistes thérapeutiques. Pour certaines maladies en mosaïque, l'implication du gène responsable dans les cancers a permis d'envisager le recours à certains médicaments inhibiteurs spécifique ou en cours de développement déjà employés en oncologie, tels que des inhibiteurs de la voie PI3K-AKT- mTOR ou de la voie RAS-MAPK.

⁵ <https://www.hra.nhs.uk/planning-and-improving-research/application-summaries/research-summaries/precision-genetic-counselling-and-reproduction-pregcare/>

Le gène *RHOA* est effectivement impliqué dans de nombreux cancers, mais le fait que les mutations post-zygotiques de *RHOA* aient ici un effet dominant-négatif et entraînent une dysplasie non évolutive au lieu d'une hypertrophie évolutive n'en font pas un bon candidat aux traitements ciblés. En l'état actuel, la prise en charge des patients reste donc essentiellement symptomatique, avec en particulier une prise en compte de l'atteinte fonctionnelle oculaire et dentaire, et du préjudice esthétique de l'atteinte faciale.

Dans le cas des mutations du gène *MTOR*, un traitement inhibiteur par sirolimus a été administré à une patiente de la cohorte (Hadouiri et collaborateurs, en préparation), sans effet sur l'épilepsie ni sur les fonctions cognitives de cette patiente, âgée de 12 ans. Une intervention plus précoce aurait peut-être été plus efficace.

14. Poursuite des travaux dans le cadre d'une collaboration nationale financée par l'ANR

Les résultats de ce travail, en particulier la mise en lumière du rôle d'une nouvelle voie de signalisation liée aux GTPases Rho dans les dyschromies en mosaïque, soulèvent de nombreuses questions concernant la physiopathologie des atteintes cutanées en mosaïque. Ces aspects seront notamment étudiés dans le cadre d'un projet qui vient d'être financé par l'ANR (Appel à Projet Générique 2019), coordonné par Asma SMAHI (Institut Imagine), en collaboration avec les équipes de Jérôme Delon (Institut Cochin), Jacqueline Cherfils (ENS Cachan) et Pierre Vabres (Centre de référence MAGEC, équipe GAD). Ce projet (*RIDES : Rho GTPases et maladies cutanées rares*) comporte plusieurs axes de travail : 1) Identification de nouveaux patients, en poursuivant les efforts de séquençage en exome et en génome pour des patients supplémentaires ; 2) Étude de l'activité des GTPases Rho et de DOCK1 dans des systèmes sans cellule ; 3) Génération de lignées cellulaires portant les différentes mutations identifiées ; 4) Quantification, étude de la localisation sub-cellulaire et étude de l'activité des protéines mutées dans les lignées générées ; 5) Détermination de l'impact des mutations sur les fonctions cellulaires ; 6) Création de modèles *in vivo*.

Ce projet ambitionne ainsi d'améliorer notre compréhension de la manière dont des mutations en mosaïque dans des gènes de la voie Rho conduisent à un phénotype pigmentaire

et aux différentes anomalies constatées dans la cohorte, et ultimement de permettre la mise au point de stratégies thérapeutiques.

VI. Bibliographie

1. Dou Y, Gold HD, Luquette LJ, Park PJ. Detecting Somatic Mutations in Normal Cells. *Trends Genet TIG*. 2018;34(7):545–57.
2. Martincorena I. Somatic mutation and clonal expansions in human tissues. *Genome Med*. 2019 28;11(1):35.
3. Alexandrov LB, Jones PH, Wedge DC, Sale JE, Campbell PJ, Nik-Zainal S, et al. Clock-like mutational processes in human somatic cells. *Nat Genet*. 2015 Dec;47(12):1402–7.
4. Ju YS, Martincorena I, Gerstung M, Petljak M, Alexandrov LB, Rahbari R, et al. Somatic mutations reveal asymmetric cellular dynamics in the early human embryo. *Nature*. 2017 30;543(7647):714–8.
5. Lynch M. Rate, molecular spectrum, and consequences of human mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jan 19;107(3):961–8.
6. Bernardis A, Gusella JF. The Importance of Genetic Mosaicism in Human Disease. *N Engl J Med*. 1994 Nov 24;331(21):1447–9.
7. Youssoufian H, Pyeritz RE. Mechanisms and consequences of somatic mosaicism in humans. *Nat Rev Genet*. 2002 Oct;3(10):748–58.
8. Happle R. Mosaicism in human skin. Understanding the patterns and mechanisms. *Arch Dermatol*. 1993 Nov;129(11):1460–70.
9. Lindhurst MJ, Sapp JC, Teer JK, Johnston JJ, Finn EM, Peters K, et al. A Mosaic Activating Mutation in *AKT1* Associated with the Proteus Syndrome. *N Engl J Med*. 2011 août;365(7):611–9.
10. Rivière J-B, Mirzaa GM, O’Roak BJ, Beddaoui M, Alcantara D, Conway RL, et al. De novo germline and postzygotic mutations in *AKT3*, *PIK3R2* and *PIK3CA* cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. *Nat Genet*. 2012 août;44(8):934–40.
11. Kurek KC, Luks VL, Ayturk UM, Alomari AI, Fishman SJ, Spencer SA, et al. Somatic Mosaic Activating Mutations in *PIK3CA* Cause CLOVES Syndrome. *Am J Hum Genet*. 2012 juin;90(6):1108–15.
12. Groesser L, Herschberger E, Ruetten A, Ruivenkamp C, Lopriore E, Zutt M, et al. Postzygotic *HRAS* and *KRAS* mutations cause nevus sebaceous and Schimmelpenning syndrome. *Nat Genet*. 2012 juillet;44(7):783–7.
13. Thomas AC, Zeng Z, Rivière J-B, O’Shaughnessy R, Al-Olabi L, St-Onge J, et al. Mosaic Activating Mutations in *GNA11* and *GNAQ* Are Associated with Phakomatosis Pigmentovascularis and Extensive Dermal Melanocytosis. *J Invest Dermatol*. 2016

avril;136(4):770–8.

14. Mirzaa GM, Campbell CD, Solovieff N, Goold C, Jansen LA, Menon S, et al. Association of MTOR Mutations With Developmental Brain Disorders, Including Megalencephaly, Focal Cortical Dysplasia, and Pigmentary Mosaicism. *JAMA Neurol.* 2016 Jul 1;73(7):836–45.
15. Sybert VP. Hypomelanosis of Ito: a description, not a diagnosis. *J Invest Dermatol.* 1994 Nov 1;103(5):S141–3.
16. Maruani A, Khallouf R, Machet M-C, Lorette G. Diffuse linear and whorled nevoid hypermelanosis in a newborn. *J Pediatr.* 2012 Jan;160(1):171.
17. Izumi K, Krantz ID. Pallister–Killian syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2014;166(4):406–13.
18. Poduri A, Evrony GD, Cai X, Walsh CA. Somatic Mutation, Genomic Variation, and Neurological Disease. *Science.* 2013 Jul 5;341(6141):1237758.
19. Pangalos C, Avramopoulos D, Blouin JL, Raoul O, deBlois MC, Prieur M, et al. Understanding the mechanism(s) of mosaic trisomy 21 by using DNA polymorphism analysis. *Am J Hum Genet.* 1994 Mar;54(3):473–81.
20. Abuelo D. Clinical significance of chimerism. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2009 mai;151C(2):148–51.
21. Blaschko A. Die Nervenverteilung in der Haut in ihrer Beziehung zu den Erkrankungen der Haut. In Breslau: Wien ; Leipzig : W. Braumèuller; 1901.
22. Happle R. Mosaicism in Human Skin - Understanding Nevi, Nevoid Skin Disorders, and Cutaneous Neoplasia [Internet]. Berlin: Springer; 2014 [cited 2017 May 7]. Available from: <http://www.springer.com/gp/book/9783642387647>
23. Lynch M. Evolution of the mutation rate. *Trends Genet TIG.* 2010 Aug;26(8):345.
24. Jacobs KB, Yeager M, Zhou W, Wacholder S, Wang Z, Rodriguez-Santiago B, et al. Detectable clonal mosaicism and its relationship to aging and cancer. *Nat Genet.* 2012 Jun;44(6):651–8.
25. Forsberg LA, Gisselsson D, Dumanski JP. Mosaicism in health and disease — clones picking up speed. *Nat Rev Genet.* 2017 février;18(2):128–42.
26. Vanneste E, Voet T, Le Caignec C, Ampe M, Konings P, Melotte C, et al. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med.* 2009 mai;15(5):577–83.
27. Taylor TH, Gitlin SA, Patrick JL, Crain JL, Wilson JM, Griffin DK. The origin, mechanisms, incidence and clinical consequences of chromosomal mosaicism in humans. *Hum Reprod*

Update. 2014 Aug;20(4):571–81.

28. Dreyer WJ, Roman JM. Immunology and embryogenesis: the chromosomal editing hypothesis. *Adv Exp Med Biol.* 1984;181:87–97.
29. Lodato MA, Woodworth MB, Lee S, Evrony GD, Mehta BK, Karger A, et al. Somatic mutation in single human neurons tracks developmental and transcriptional history. *Science.* 2015 Oct 2;350(6256):94.
30. McConnell MJ, Lindberg MR, Brennand KJ, Piper JC, Voet T, Cowing-Zitron C, et al. Mosaic Copy Number Variation in Human Neurons. *Science.* 2013 Nov 1;342(6158):632–7.
31. Baillie JK, Barnett MW, Upton KR, Gerhardt DJ, Richmond TA, De Sapia F, et al. Somatic retrotransposition alters the genetic landscape of the human brain. *Nature.* 2011 Oct 30;479(7374):534–7.
32. Ford CE, Polani PE, Briggs JH, Bishop PM. A presumptive human XXY/XX mosaic. *Nature.* 1959 Apr 11;183(4667):1030–2.
33. Clarke CM, Edwards JH, Smallpeice V. 21-trisomy/normal mosaicism in an intelligent child with some mongoloid characters. *Lancet Lond Engl.* 1961 May 13;1(7185):1028–30.
34. Lejeune J, Turpin R, Gautier M. [Chromosomic diagnosis of mongolism]. *Arch Fr Pediatr.* 1959;16:962–3.
35. Freed D, Stevens EL, Pevsner J. Somatic Mosaicism in the Human Genome. *Genes.* 2014 Dec 11;5(4):1064–94.
36. Schinzel A. Autosomal chromosome aberrations. A review of the clinical syndromes caused by structural chromosome aberrations, mosaic-trisomies 8 and 9, and triploidy. *Ergeb Inn Med Kinderheilkd.* 1976;38:37–94.
37. Motegi T, Ichikawa A, Noda M, Hashimoto G, Kaga M. 18p-Mosaicism: case report and review. *Hum Genet.* 1978 Oct 31;44(2):213–7.
38. Golabi M, James AW, Good WV, Cotter PD. Tissue-limited mosaicism for monosomy 13. *Am J Med Genet A.* 2010 Oct 1;152A(10):2634–9.
39. Turleau C, Simon-Bouy B, Austruy E, Grisard MC, Lemaire F, Molina-Gomes D, et al. Parental origin and mechanisms of formation of three cases of 12p tetrasomy. *Clin Genet.* 1996 Jul;50(1):41–6.
40. Cunha KS, Simioni M, Vieira TP, Gil-da-Silva-Lopes VL, Puzzi MB, Steiner CE. Tetrasomy 3q26.32-q29 due to a supernumerary marker chromosome in a child with pigmentary mosaicism of Ito. *Genet Mol Biol.* 2016;39(1):35–9.

41. Carson JC, Hoffner L, Conlin L, Parks WT, Fisher RA, Spinner N, et al. Diploid/triploid mixoploidy: A consequence of asymmetric zygotic segregation of parental genomes. *Am J Med Genet A*. 2018 Dec;176(12):2720–32.
42. Edwards MJ, Park JP, Wurster-Hill DH, Graham JM. Mixoploidy in humans: two surviving cases of diploid-tetraploid mixoploidy and comparison with diploid-triploid mixoploidy. *Am J Med Genet*. 1994 Sep 1;52(3):324–30.
43. Petit F, Holder-Espinasse M, Duban-Bedu B, Bouquillon S, Boute-Benejean O, Bazin A, et al. Trisomy 7 mosaicism prenatally misdiagnosed and maternal uniparental disomy in a child with pigmentary mosaicism and Russell-Silver syndrome. *Clin Genet*. 2012 Mar;81(3):265–71.
44. Scheuvens R, Begemann M, Soellner L, Meschede D, Raabe-Meyer G, Elbracht M, et al. Maternal uniparental disomy of chromosome 16 [upd(16)mat]: clinical features are rather caused by (hidden) trisomy 16 mosaicism than by upd(16)mat itself. *Clin Genet*. 2017 Jul 1;92(1):45–51.
45. Robinson WP, Binkert F, Bernasconi F, Lorda-Sanchez I, Werder EA, Schinzel AA. Molecular studies of chromosomal mosaicism: relative frequency of chromosome gain or loss and possible role of cell selection. *Am J Hum Genet*. 1995 Feb;56(2):444–51.
46. Montgomery RA, Geraghty MT, Bull E, Gelb BD, Johnson M, McIntosh I, et al. Multiple molecular mechanisms underlying subdiagnostic variants of Marfan syndrome. *Am J Hum Genet*. 1998 Dec;63(6):1703–11.
47. Plant KE, Boye E, Green PM, Vetrie D, Flintner FA. Somatic mosaicism associated with a mild Alport syndrome phenotype. *J Med Genet*. 2000 Mar;37(3):238–9.
48. Klopstock T, Chahrokh-Zadeh S, Holinski-Feder E, Meindl A, Gasser T, Pongratz D, et al. Markedly different course of Friedreich's ataxia in sib pairs with similar GAA repeat expansions in the frataxin gene. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1999 Feb;97(2):139–42.
49. Kvittingen EA, Rootwelt H, Berger R, Brandtzaeg P. Self-induced correction of the genetic defect in tyrosinemia type I. *J Clin Invest*. 1994 Oct 1;94(4):1657–61.
50. Holterhus PM, Brüggewirth HT, Hiort O, Kleinkauf-Houcken A, Kruse K, Sinnecker GH, et al. Mosaicism due to a somatic mutation of the androgen receptor gene determines phenotype in androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Nov;82(11):3584–9.
51. Gottlieb B, Beitel LK, Trifiro MA. Somatic mosaicism and variable expressivity. *Trends Genet*. 2001 Feb 1;17(2):79–82.

52. Boileau C, Junien C. Misdiagnosed normal fetus owing to undetected germinal mosaicism for DMD deletion. *J Med Genet.* 1989 Dec;26(12):790–1.
53. Jackson R. The lines of Blaschko: a review and reconsideration. *Br J Dermatol.* 1976 Oct 1;95(4):349–60.
54. Happle R. Genetic significance of Blaschko’s lines. *Z Hautkr.* 1977 Sep 15;52(18):935–44.
55. Happle R. The categories of cutaneous mosaicism: A proposed classification. *Am J Med Genet A.* 2016 Feb;170A(2):452–9.
56. Biesecker LG, Spinner NB. A genomic view of mosaicism and human disease. *Nat Rev Genet.* 2013 May;14(5):307–20.
57. Myers JN, Davis L, Sheehan D, Kulharya AS. Mosaic tetrasomy 13q and phylloid hypomelanosis: a case report and review of the literature. *Pediatr Dermatol.* 2015 Apr;32(2):263–6.
58. Ruggieri M, Roggini M, Kennerknecht I, Polizzi A, Distefano A, Pavone V. Spectrum of skeletal abnormalities in a complex malformation syndrome with “cutis tricolor” (Ruggieri-Happle syndrome). *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992. 2011 Jan;100(1):121–7.
59. Happle R. Cutaneous manifestation of lethal genes. *Hum Genet.* 1986 Mar;72(3):280.
60. Lim YH, Moscato Z, Choate KA. Mosaicism in Cutaneous Disorders. *Annu Rev Genet.* 2017 27;51:123–41.
61. Tinschert S, Naumann I, Stegmann E, Buske A, Kaufmann D, Thiel G, et al. Segmental neurofibromatosis is caused by somatic mutation of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. *Eur J Hum Genet EJHG.* 2000 Jun;8(6):455–9.
62. McGrae JD, Hashimoto K. Unilateral facial angiofibromas--a segmental form of tuberous sclerosis. *Br J Dermatol.* 1996 Apr;134(4):727–30.
63. Verhoef S, Vrtel R, van Essen T, Bakker L, Sikkens E, Halley D, et al. Somatic mosaicism and clinical variation in tuberous sclerosis complex. *Lancet Lond Engl.* 1995 Jan 21;345(8943):202.
64. Sakuntabhai A, Dhitavat J, Burge S, Hovnanian A. Mosaicism for ATP2A2 mutations causes segmental Darier’s disease. *J Invest Dermatol.* 2000 Dec;115(6):1144–7.
65. Guerra L, Pedicelli C, Proto V, Condorelli AG, Mazzanti C, Castiglia D. A Postzygotic ATP2A2 Novel Mutation Identified by Next-generation Sequencing in Mosaic Darier Disease. *Acta Derm Venereol.* 2019 Jan 1;99(1):115–6.

66. Choate KA, Lu Y, Zhou J, Choi M, Elias PM, Farhi A, et al. Mitotic Recombination in Patients with Ichthyosis Causes Reversion of Dominant Mutations in KRT10. *Science*. 2010 Oct 1;330(6000):94–7.
67. Lim YH, Fisher JM, Choate KA. Revertant mosaicism in genodermatoses. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2017 Jun;74(12):2229–38.
68. Happle R. Progressive osseous heteroplasia is not a Mendelian trait but a type 2 segmental manifestation of GNAS inactivation disorders: A hypothesis. *Eur J Med Genet*. 2016 May;59(5):290–4.
69. Steinmann K, Kluwe L, Friedrich RE, Mautner V-F, Cooper DN, Kehrer-Sawatzki H. Mechanisms of loss of heterozygosity in neurofibromatosis type 1-associated plexiform neurofibromas. *J Invest Dermatol*. 2009 Mar;129(3):615–21.
70. Happle R. Superimposed segmental manifestation of both rare and common cutaneous disorders: a new paradigm. *Actas Dermosifiliogr*. 2009 Nov;100 Suppl 1:77–85.
71. Fölster-Holst R, Nellen RGL, Jensen J-M, Poblete-Gutiérrez P, Steijlen PM, Schwarz T, et al. Molecular genetic support for the rule of dichotomy in type 2 segmental Darier disease. *Br J Dermatol*. 2012 Feb;166(2):464–6.
72. Atzmony L, Khan HM, Lim YH, Paller AS, Levinsohn JL, Holland KE, et al. Second-Hit, Postzygotic PMVK and MVD Mutations in Linear Porokeratosis. *JAMA Dermatol* [Internet]. 2019 Apr 3 [cited 2019 Apr 4]; Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamadermatology/fullarticle/2729597>
73. Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV, Merino MJ, Friedman E, Spiegel AM. Activating Mutations of the Stimulatory G Protein in the McCune–Albright Syndrome. *N Engl J Med*. 1991 décembre;325(24):1688–95.
74. Paller AS, Syder AJ, Chan YM, Yu QC, Hutton E, Tadini G, et al. Genetic and clinical mosaicism in a type of epidermal nevus. *N Engl J Med*. 1994 Nov 24;331(21):1408–15.
75. Munro CS, Wilkie AO. Epidermal mosaicism producing localised acne: somatic mutation in FGFR2. *Lancet Lond Engl*. 1998 Aug 29;352(9129):704–5.
76. Hafner C, van Oers JMM, Vogt T, Landthaler M, Stoehr R, Blaszyk H, et al. Mosaicism of activating FGFR3 mutations in human skin causes epidermal nevi. *J Clin Invest*. 2006 Aug;116(8):2201–7.
77. Gajecka M. Unrevealed mosaicism in the next-generation sequencing era. *Mol Genet Genomics*. 2016;291:513–30.

78. Kuentz P, St-Onge J, Duffourd Y, Courcet J-B, Carmignac V, Jouan T, et al. Molecular diagnosis of PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS) in 162 patients and recommendations for genetic testing. *Genet Med*. 2017;19(9):989–97.
79. Shirley MD, Tang H, Gallione CJ, Baugher JD, Frelin LP, Cohen B, et al. Sturge–Weber Syndrome and Port-Wine Stains Caused by Somatic Mutation in GNAQ. *N Engl J Med*. 2013 mai;368(21):1971–9.
80. van Steensel MAM. Neurocutaneous manifestations of genetic mosaicism. *J Pediatr Genet*. 2015 Sep;4(3):144–53.
81. Nathan N, Keppler-Noreuil KM, Biesecker LG, Moss J, Darling TN. Mosaic Disorders of the PI3K/PTEN/AKT/TSC/mTORC1 Signaling Pathway. *Dermatol Clin*. 2017 Jan;35(1):51–60.
82. Hafner C, Groesser L. Mosaic RASopathies. *Cell Cycle*. 2013 Jan 1;12(1):43–50.
83. Brandt R, Sell T, Lüthen M, Uhlitz F, Klinger B, Riemer P, et al. Cell type-dependent differential activation of ERK by oncogenic KRAS in colon cancer and intestinal epithelium. *Nat Commun*. 2019 02;10(1):2919.
84. Barbosa TC, Andrade FG, Lopes BA, de Andrade CFG, Mansur MB, Emerenciano M, et al. Impact of mutations in FLT3, PTPN11 and RAS genes on the overall survival of pediatric B cell precursor acute lymphoblastic leukemia in Brazil. *Leuk Lymphoma*. 2014 Jul;55(7):1501–9.
85. Guerrero-Zotano A, Mayer IA, Arteaga CL. PI3K/AKT/mTOR: role in breast cancer progression, drug resistance, and treatment. *Cancer Metastasis Rev*. 2016;35(4):515–24.
86. Reddy BY, Miller DM, Tsao H. Somatic driver mutations in melanoma. *Cancer*. 2017 01;123(S11):2104–17.
87. Zhang X-Y, Zhang P-Y. Genetics and epigenetics of melanoma. *Oncol Lett*. 2016 Nov;12(5):3041–4.
88. Parker VER, Keppler-Noreuil KM, Faivre L, Luu M, Oden NL, De Silva L, et al. Safety and efficacy of low-dose sirolimus in the PIK3CA-related overgrowth spectrum. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2018 Oct 1;
89. Venot Q, Blanc T, Rabia SH, Berteloot L, Ladraa S, Duong J-P, et al. Targeted therapy in patients with PIK3CA-related overgrowth syndrome. *Nature*. 2018 Jun;558(7711):540–6.
90. Kuentz P, Mignot C, St-Onge J, Duffourd Y, Bonniaud B, Faivre L, et al. Postzygotic BRAF p.Lys601Asn Mutation in Phacomatosis Pigmentokeratotica with Woolly Hair Nevus and Focal Cortical Dysplasia. *J Invest Dermatol*. 2016 May;136(5):1060–2.

91. Bennett JT, Tan TY, Alcantara D, Tétrault M, Timms AE, Jensen D, et al. Mosaic Activating Mutations in FGFR1 Cause Encephalocraniocutaneous Lipomatosis. *Am J Hum Genet.* 2016 Mar 3;98(3):579–87.
92. Kuentz P, Fraitag S, Gonzales M, Dhombres F, St-Onge J, Duffourd Y, et al. Mosaic-activating FGFR2 mutation in two fetuses with papillomatous pedunculated sebaceous naevus. *Br J Dermatol.* 2017 Jan;176(1):204–8.
93. Melnik BC, Vakilzadeh F, Aslanidis C, Schmitz G. Unilateral segmental acneiform naevus: a model disorder towards understanding fibroblast growth factor receptor 2 function in acne? *Br J Dermatol.* 2008;158(6):1397–9.
94. Avitan-Hersh E, Tatur S, Indelman M, Gepstein V, Shreter R, Hershkovitz D, et al. Postzygotic HRAS mutation causing both keratinocytic epidermal nevus and thymoma and associated with bone dysplasia and hypophosphatemia due to elevated FGF23. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Jan;99(1):E132-136.
95. Hafner C, Toll A, Real FX. HRAS Mutation Mosaicism Causing Urothelial Cancer and Epidermal Nevus. *N Engl J Med.* 2011 Nov 17;365(20):1940–2.
96. Groesser L, Herschberger E, Sagraera A, Shwayder T, Flux K, Ehmann L, et al. Phacomatosis pigmentokeratolica is caused by a postzygotic HRAS mutation in a multipotent progenitor cell. *J Invest Dermatol.* 2013 Aug;133(8):1998–2003.
97. Peacock JD, Dykema KJ, Toriello HV, Mooney MR, Scholten DJ, Winn ME, et al. Oculoectodermal syndrome is a mosaic RASopathy associated with KRAS alterations. *Am J Med Genet A.* 2015;167(7):1429–35.
98. Kinsler VA, Thomas AC, Ishida M, Bulstrode NW, Loughlin S, Hing S, et al. Multiple Congenital Melanocytic Nevi and Neurocutaneous Melanosis Are Caused by Postzygotic Mutations in Codon 61 of NRAS. *J Invest Dermatol.* 2013 Sep 1;133(9):2229–36.
99. Lim YH, Ovejero D, Sugarman JS, DeKlotz CMC, Maruri A, Eichenfield LF, et al. Multilineage somatic activating mutations in HRAS and NRAS cause mosaic cutaneous and skeletal lesions, elevated FGF23 and hypophosphatemia. *Hum Mol Genet.* 2014 Jan 15;23(2):397–407.
100. Soblet J, Kangas J, Nätyнки M, Mendola A, Helaers R, Uebelhoer M, et al. Blue Rubber Bleb Nevus (BRBN) Syndrome Is Caused by Somatic TEK (TIE2) Mutations. *J Invest Dermatol.* 2017 Jan 1;137(1):207–16.
101. Ruggieri M, Praticò AD. Mosaic Neurocutaneous Disorders and Their Causes. *Semin*

Pediatr Neurol. 2015 Dec;22(4):207–33.

102. Ito M. Studies on melanin XI. Incontinentia pigmenti achrominans. A singular case of nevus depigmentosus systematicus bilateralis. *Tohoku J Exp Med.* 1952;55(Supplement):57–9.

103. Ruiz-Maldonado R, Toussaint S, Tamayo L, Laterza A, del Castillo V. Hypomelanosis of Ito: Diagnostic Criteria and Report of 41 Cases. *Pediatr Dermatol.* 1992 Mar 1;9(1):1–10.

104. Donnai D, Read AP, McKeown C, Andrews T. Hypomelanosis of Ito: a manifestation of mosaicism or chimerism. *J Med Genet.* 1988 Dec 1;25(12):809–18.

105. Pinheiro A, Mathew MC, Thomas M, Jacob M, Srivastava VM, Cherian R, et al. The Clinical Profile of Children in India with Pigmentary Anomalies along the Lines of Blaschko and Central Nervous System Manifestations. *Pediatr Dermatol.* 2007;24(1):11–7.

106. Woods CG, Bankier A, Curry J, Sheffield LJ, Slaney SF, Smith K, et al. Asymmetry and skin pigmentary anomalies in chromosome mosaicism. *J Med Genet.* 1994 Sep;31(9):694–701.

107. Taibjee SM, Bennett DC, Moss C. Abnormal pigmentation in hypomelanosis of Ito and pigmentary mosaicism: the role of pigmentary genes. *Br J Dermatol.* 2004 Aug;151(2):269–82.

108. Kromann AB, Ousager LB, Ali IKM, Aydemir N, Bygum A. Pigmentary mosaicism: a review of original literature and recommendations for future handling. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 2018 Mar 5 [cited 2019 Aug 19];13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5839061/>

109. Schubert R, Viersbach R, Eggermann T, Hansmann M, Schwanitz G. Report of two new cases of Pallister-Killian syndrome confirmed by FISH: tissue-specific mosaicism and loss of i(12p) by in vitro selection. *Am J Med Genet.* 1997 Oct 3;72(1):106–10.

110. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009 Jul 15;25(14):1754–60.

111. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 2010 Sep 1;20(9):1297–303.

112. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, et al. Variation across 141,456 human exomes and genomes reveals the spectrum of loss-of-function intolerance across human protein-coding genes. *bioRxiv.* 2019 Aug 13;531210.

113. Karczewski KJ, Weisburd B, Thomas B, Solomonson M, Ruderfer DM, Kavanagh D, et al. The ExAC browser: displaying reference data information from over 60 000 exomes. *Nucleic*

Acids Res. 2017 Jan 4;45(D1):D840–5.

114. Kircher M, Witten DM, Jain P, O’Roak BJ, Cooper GM, Shendure J. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet.* 2014 Mar;46(3):310–5.

115. Grantham R. Amino Acid Difference Formula to Help Explain Protein Evolution. *Science.* 1974 Sep 6;185(4154):862–4.

116. Cooper GM, Stone EA, Asimenos G, Green ED, Batzoglou S, Sidow A. Distribution and intensity of constraint in mammalian genomic sequence. *Genome Res.* 2005 Jul 1;15(7):901–13.

117. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet.* 2013 Jan;Chapter 7:Unit7.20.

118. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc.* 2009 Jun;4(7):1073–81.

119. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown G, Chao C, Chitipiralla S, et al. ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jan 4;44(D1):D862–8.

120. Forbes SA, Beare D, Gunasekaran P, Leung K, Bindal N, Boutselakis H, et al. COSMIC: exploring the world’s knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res.* 2015 Jan 28;43(D1):D805–11.

121. Stenson PD, Mort M, Ball EV, Evans K, Hayden M, Heywood S, et al. The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Hum Genet.* 2017;136(6):665–77.

122. Fromer M, Purcell SM. Using XHMM software to detect copy number variation in whole-exome sequencing data. *Curr Protoc Hum Genet* Editor Board Jonathan Haines AI. 2014 Apr 24;81:7.23.1-7.23.21.

123. Straver R, Weiss MM, Waisfisz Q, Sistermans EA, Reinders MJT. WISExome: a within-sample comparison approach to detect copy number variations in whole exome sequencing data. *Eur J Hum Genet.* 2017 Dec;25(12):1354.

124. Sathirapongsasuti JF, Lee H, Horst BAJ, Brunner G, Cochran AJ, Binder S, et al. Exome sequencing-based copy-number variation and loss of heterozygosity detection: ExomeCNV. *Bioinforma Oxf Engl.* 2011 Oct 1;27(19):2648–54.

125. Tisserant E, Thevenon J, Vitobello A, Bruel A-L, Aho S, Sorlin A, et al. Complementary identification of copy number variants by array-CGH using whole-exome sequencing data with the eXome Hidden Markov Model (XHMM).
126. King DA, Sifrim A, Fitzgerald TW, Rahbari R, Hobson E, Homfray T, et al. Detection of structural mosaicism from targeted and whole-genome sequencing data. *Genome Res.* 2017;27(10):1704–14.
127. Izumi K, Santani AB, Deardorff MA, Feret HA, Tischler T, Thiel BD, et al. Mosaic maternal uniparental disomy of chromosome 15 in Prader–Willi syndrome: Utility of genome-wide SNP array. *Am J Med Genet A.* 2013 Jan 1;161(1):166–71.
128. Jinawath N, Zambrano R, Wohler E, Palmquist MK, Hoover-Fong J, Hamosh A, et al. Mosaic trisomy 13: understanding origin using SNP array. *J Med Genet.* 2011 May;48(5):323–6.
129. Morandi A, Bonnefond A, Lobbens S, Carotenuto M, del Giudice EM, Froguel P, et al. A girl with incomplete Prader–Willi syndrome and negative MS-PCR, found to have mosaic maternal UPD-15 at SNP array. *Am J Med Genet A.* 2015 Nov 1;167(11):2720–6.
130. Conlin LK, Kaur M, Izumi K, Campbell L, Wilkens A, Clark D, et al. Utility of SNP arrays in detecting, quantifying, and determining meiotic origin of tetrasomy 12p in blood from individuals with Pallister-Killian syndrome. *Am J Med Genet A.* 2012 Dec;158A(12):3046–53.
131. Orgaz JL, Herraiz C, Sanz-Moreno V. Rho GTPases modulate malignant transformation of tumor cells. *Small GTPases.* 2014 Oct 2;5(4):e983867.
132. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* 1998 Jan 23;279(5350):509–14.
133. Burridge K, Guilluy C. Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension. *Exp Cell Res.* 2016 Apr 10;343(1):14–20.
134. Pan ZK, Ye RD, Christiansen SC, Jagels MA, Bokoch GM, Zuraw BL. Role of the Rho GTPase in bradykinin-stimulated nuclear factor- κ B activation and IL-1 β gene expression in cultured human epithelial cells. *J Immunol.* 1998 Mar 15;160(6):3038–45.
135. Zhao X, Lu L, Pokhriyal N, Ma H, Duan L, Lin S, et al. Overexpression of RhoA induces preneoplastic transformation of primary mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 2009 Jan 15;69(2):483–91.
136. Kinsler VA, Larue L. The patterns of birthmarks suggest a novel population of melanocyte precursors arising around the time of gastrulation. *Pigment Cell Melanoma Res.*

2017 Sep 23;

137. Sorlin A, Maruani A, Aubriot-Lorton M-H, Kuentz P, Duffourd Y, Teyssie S, et al. Mosaicism for a KITLG mutation in linear and whorled nevoid hypermelanosis. *J Invest Dermatol*. 2017 Feb 28;
138. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016;536(7616):285–91.
139. Petrovski S, Wang Q, Heinzen EL, Allen AS, Goldstein DB. Genic Intolerance to Functional Variation and the Interpretation of Personal Genomes. *PLOS Genet*. 2013;9(8):e1003709.
140. Blomen VA, Májek P, Jae LT, Bigenzahn JW, Nieuwenhuis J, Staring J, et al. Gene essentiality and synthetic lethality in haploid human cells. *Science*. 2015 Nov 27;350(6264):1092–6.
141. Wang T, Birsoy K, Hughes NW, Krupczak KM, Post Y, Wei JJ, et al. Identification and characterization of essential genes in the human genome. *Science*. 2015 Nov 27;350(6264):1096–101.
142. Hart T, Chandrashekar M, Aregger M, Steinhart Z, Brown KR, MacLeod G, et al. High-Resolution CRISPR Screens Reveal Fitness Genes and Genotype-Specific Cancer Liabilities. *Cell*. 2015 décembre;163(6):1515–26.
143. Zhang S, Zhou X, Lang RA, Guo F. RhoA of the Rho family small GTPases is essential for B lymphocyte development. *PLOS ONE*. 2012 Mar 16;7(3):e33773.
144. Zazo Seco C, Serrão de Castro L, van Nierop JW, Morín M, Jhangiani S, Verver EJJ, et al. Allelic Mutations of KITLG, Encoding KIT Ligand, Cause Asymmetric and Unilateral Hearing Loss and Waardenburg Syndrome Type 2. *Am J Hum Genet*. 2015 Nov 5;97(5):647–60.
145. Wang Z-Q, Si L, Tang Q, Lin D, Fu Z, Zhang J, et al. Gain-of-function mutation of KIT ligand on melanin synthesis causes familial progressive hyperpigmentation. *Am J Hum Genet*. 2009 May;84(5):672–7.
146. Amyere M, Vogt T, Hoo J, Brandrup F, Bygum A, Boon L, et al. KITLG mutations cause familial progressive hyper- and hypopigmentation. *J Invest Dermatol*. 2011 Jun;131(6):1234–9.
147. Cuell A, Bansal N, Cole T, Kaur MR, Lee J, Loffeld A, et al. Familial progressive hyper- and hypopigmentation and malignancy in two families with new mutations in KITLG. *Clin Exp Dermatol*. 2015;40(8):860–4.

148. Ogawa Y, Kono M, Akiyama M. Pigmented macules in Waardenburg syndrome type 2 due to KITLG mutation. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2017 Sep 1;30(5):501–4.
149. Metta AK, Ramachandra S, Sadath N, Manupati S. Linear and whorled nevoid hypermelanosis in three successive generations. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2011 May 1;77(3):403.
150. Gordo G, Tenorio J, Arias P, Santos-Simarro F, García-Miñaur S, Moreno JC, et al. mTOR mutations in Smith-Kingsmore syndrome: Four additional patients and a review. *Clin Genet.* 2018 Apr;93(4):762–75.
151. Rodríguez-García ME, Cotrina-Vinagre FJ, Bellusci M, Martínez de Aragón A, Hernández-Sánchez L, Carnicero-Rodríguez P, et al. A novel de novo MTOR gain-of-function variant in a patient with Smith-Kingsmore syndrome and Antiphospholipid syndrome. *Eur J Hum Genet EJHG.* 2019 Sep;27(9):1369–78.
152. Smith L, Saunders C, Dinwiddie D, Atherton A, Miller N, Soden S, et al. Exome Sequencing Reveals De Novo Germline Mutation of the Mammalian Target of Rapamycin (MTOR) in a Patient with Megalencephaly and Intractable Seizures. *J Genomes Exomes.* 2013 Sep 1;2013:63–72.
153. Handoko M, Emrick LT, Rosenfeld JA, Wang X, Tran AA, Turner A, et al. Recurrent mosaic MTOR c.5930C > T (p.Thr1977Ile) variant causing megalencephaly, asymmetric polymicrogyria, and cutaneous pigmentary mosaicism: Case report and review of the literature. *Am J Med Genet A.* 2019 Mar;179(3):475–9.
154. Villegas F, Lehalle D, Mayer D, Rittirsch M, Stadler MB, Zinner M, et al. Lysosomal Signaling Licenses Embryonic Stem Cell Differentiation via Inactivation of Tfe3. *Cell Stem Cell.* 2019 Feb 7;24(2):257-270.e8.
155. Sobreira N, Schiettecatte F, Valle D, Hamosh A. GeneMatcher: a matching tool for connecting investigators with an interest in the same gene. *Hum Mutat.* 2015 Oct;36(10):928–30.
156. Kiyokawa E, Hashimoto Y, Kobayashi S, Sugimura H, Kurata T, Matsuda M. Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes Dev.* 1998 Nov 1;12(21):3331–6.
157. Gumienny TL, Brugnera E, Tosello-Trampont A-C, Kinchen JM, Haney LB, Nishiwaki K, et al. CED-12/ELMO, a Novel Member of the CrkII/Dock180/Rac Pathway, Is Required for Phagocytosis and Cell Migration. *Cell.* 2001 Oct 5;107(1):27–41.
158. Katoh H, Yasui H, Yamaguchi Y, Aoki J, Fujita H, Mori K, et al. Small GTPase RhoG is a

- key regulator for neurite outgrowth in PC12 cells. *Mol Cell Biol*. 2000 Oct;20(19):7378–87.
159. Blasius AL, Brandl K, Crozat K, Xia Y, Khovananth K, Krebs P, et al. Mice with mutations of Dock7 have generalized hypopigmentation and white-spotting but show normal neurological function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Feb 24;106(8):2706–11.
160. Gadea G, Blangy A. Dock-family exchange factors in cell migration and disease. *Eur J Cell Biol*. 2014 Oct;93(10–12):466–77.
161. Suzuki N, Nakamura S, Mano H, Kozasa T. Gα12 activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF. *Proc Natl Acad Sci*. 2003 Jan 21;100(2):733–8.
162. O’Hayre M, Inoue A, Kufareva I, Wang Z, Mikelis CM, Drummond RA, et al. Inactivating mutations in GNA13 and RHOA in Burkitt’s lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma: a tumor suppressor function for the Gα13/RhoA axis in B cells. *Oncogene*. 2016 21;35(29):3771–80.
163. Baulac S. mTOR signaling pathway genes in focal epilepsies. *Prog Brain Res*. 2016;226:61–79.
164. Dibbens LM, de Vries B, Donatello S, Heron SE, Hodgson BL, Chintawar S, et al. Mutations in DEPDC5 cause familial focal epilepsy with variable foci. *Nat Genet*. 2013 May;45(5):546–51.
165. 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 Off J Am Coll Med Genet*. 2015 May;17(5):405–24.
166. de Calbiac H, Dabacan A, Marsan E, Tostivint H, Devienne G, Ishida S, et al. Depdc5 knockdown causes mTOR-dependent motor hyperactivity in zebrafish. *Ann Clin Transl Neurol*. 2018 May;5(5):510–23.
167. Ribierre T, Deleuze C, Bacq A, Baldassari S, Marsan E, Chipaux M, et al. Second-hit mosaic mutation in mTORC1 repressor DEPDC5 causes focal cortical dysplasia-associated epilepsy. *J Clin Invest*. 2018 Jun 1;128(6):2452–8.
168. Lee WS, Stephenson SEM, Howell KB, Pope K, Gillies G, Wray A, et al. Second-hit DEPDC5 mutation is limited to dysmorphic neurons in cortical dysplasia type IIA. *Ann Clin Transl Neurol*. 2019 Jul;6(7):1338–44.
169. Portnoi M, Boutchnei S, Bouscarat F, Morlier G, Nizard S, Dersarkissian H, et al. Skin pigmentary anomalies and mosaicism for an acentric marker chromosome originating from

3q. *J Med Genet.* 1999 Mar;36(3):246–50.

170. Luu M, Fleck C, Hadj-Rabia S, Martin L, Bessis D, Coubes C, et al. Essai de phase 2a du sirolimus dans les hypertrophies liées à PIK3CA (PROMISE) : données préliminaires de tolérance dans la cohorte française. *Ann Dermatol Vénéréologie.* 2016 Dec 1;143(12, Supplement):S394–5.

171. Bestetti I, Sironi A, Catusi I, Mariani M, Giardino D, Manoukian S, et al. 13q mosaic deletion including RB1 associated to mild phenotype and no cancer outcome – case report and review of the literature. *Mol Cytogenet.* 2018 Dec;11(1):1–8.

172. Kubo A, Sasaki T, Suzuki H, Shiohama A, Aoki S, Sato S, et al. Clonal expansion of second-hit cells with somatic recombinations or C>T transitions form porokeratosis in MVD or MVK mutant heterozygotes. *J Invest Dermatol.* 2019 Jun 14;

173. Ruggieri M, Pavone L. Topical Review: Hypomelanosis of Ito: clinical syndrome or just phenotype? *J Child Neurol.* 2000 Oct 1;15(10):635–44.

174. Schulze TG, McMahon FJ. Defining the Phenotype in Human Genetic Studies: Forward Genetics and Reverse Phenotyping. *Hum Hered.* 2004;58(3–4):131–8.

175. Hsu LY, Yu MT, Neu RL, Van Dyke DL, Benn PA, Bradshaw CL, et al. Rare trisomy mosaicism diagnosed in amniocytes, involving an autosome other than chromosomes 13, 18, 20, and 21: karyotype/phenotype correlations. *Prenat Diagn.* 1997 Mar;17(3):201–42.

176. Gouveia MP de, Coutinho I, Teixeira V, d'Oliveira R, Venâncio M, Moreno A. Do you know this syndrome? Dyspigmentation along the Blaschko lines caused by trisomy 7 mosaicism. *An Bras Dermatol.* 2016 Dec;91(6):837–9.

177. Bastian BC, Wesselmann U, Pinkel D, LeBoit PE. Molecular Cytogenetic Analysis of Spitz Nevi Shows Clear Differences to Melanoma. *J Invest Dermatol.* 1999 Dec 1;113(6):1065–9.

178. Holstege H, Pfeiffer W, Sie D, Hulsman M, Nicholas TJ, Lee CC, et al. Somatic mutations found in the healthy blood compartment of a 115-yr-old woman demonstrate oligoclonal hematopoiesis. *Genome Res.* 2014 May;24(5):733–42.

179. Acuna-Hidalgo R, Bo T, Kwint MP, van de Vorst M, Pinelli M, Veltman JA, et al. Postzygotic Point Mutations Are an Underrecognized Source of De Novo Genomic Variation. *Am J Hum Genet.* 2015 Jul 2;97(1):67–74.

180. Happle R. Gonosomal versus somatogonadal mosaicism: What is in a name? *Am J Med Genet A.* 2019;179(8):1678–1678.

VII. Annexe

Table de correspondance entre le log ratio d'ACPA et le taux de mosaïque

Selon le type de CNV (duplication, tripllication), un même log ratio est associé à un pourcentage de cellules portant l'anomalie différent. Ainsi, le log ratio maximal pour une duplication, correspondant à l'état homogène, est de 0,584. Un log ratio supérieur, comme dans le cas du sujet 1950 (log ratio de l'ordre de 0,815) permet d'affirmer un gain de 2 copies par cellule mutée, qui représentent environ 76% des cellules.

Délétion		Duplication		Tripllication	
Log ratio	%	Log ratio	%	Log ratio	%
-0,007	1	0,007	1	0,014	1
-0,014	2	0,014	2	0,029	2
-0,022	3	0,021	3	0,043	3
-0,029	4	0,029	4	0,057	4
-0,037	5	0,036	5	0,070	5
-0,044	6	0,043	6	0,084	6
-0,051	7	0,050	7	0,098	7
-0,059	8	0,057	8	0,111	8
-0,066	9	0,064	9	0,124	9
-0,074	10	0,070	10	0,138	10
-0,082	11	0,077	11	0,151	11
-0,089	12	0,084	12	0,163	12
-0,097	13	0,091	13	0,176	13
-0,105	14	0,098	14	0,189	14
-0,112	15	0,104	15	0,202	15
-0,120	16	0,111	16	0,214	16
-0,128	17	0,118	17	0,227	17
-0,136	18	0,124	18	0,239	18
-0,144	19	0,131	19	0,251	19
-0,152	20	0,138	20	0,263	20
-0,160	21	0,144	21	0,275	21

-0,168	22	0,151	22	0,287	22
-0,176	23	0,157	23	0,299	23
-0,184	24	0,163	24	0,310	24
-0,193	25	0,170	25	0,322	25
-0,201	26	0,176	26	0,333	26
-0,209	27	0,183	27	0,345	27
-0,218	28	0,189	28	0,356	28
-0,226	29	0,195	29	0,367	29
-0,234	30	0,202	30	0,379	30
-0,243	31	0,208	31	0,390	31
-0,252	32	0,214	32	0,401	32
-0,260	33	0,220	33	0,411	33
-0,269	34	0,227	34	0,422	34
-0,278	35	0,233	35	0,433	35
-0,286	36	0,239	36	0,444	36
-0,295	37	0,245	37	0,454	37
-0,304	38	0,251	38	0,465	38
-0,313	39	0,257	39	0,475	39
-0,322	40	0,263	40	0,485	40
-0,331	41	0,269	41	0,496	41
-0,340	42	0,275	42	0,506	42
-0,349	43	0,281	43	0,516	43
-0,358	44	0,287	44	0,526	44
-0,368	45	0,293	45	0,536	45
-0,377	46	0,299	46	0,546	46
-0,386	47	0,305	47	0,556	47
-0,396	48	0,310	48	0,566	48
-0,405	49	0,316	49	0,575	49
-0,415	50	0,322	50	0,585	50
-0,425	51	0,328	51	0,595	51
-0,434	52	0,333	52	0,604	52
-0,444	53	0,339	53	0,614	53
-0,454	54	0,345	54	0,623	54

-0,464	55	0,350	55	0,632	55
-0,474	56	0,356	56	0,642	56
-0,484	57	0,362	57	0,651	57
-0,494	58	0,367	58	0,660	58
-0,504	59	0,373	59	0,669	59
-0,515	60	0,379	60	0,678	60
-0,525	61	0,384	61	0,687	61
-0,535	62	0,390	62	0,696	62
-0,546	63	0,395	63	0,705	63
-0,556	64	0,401	64	0,714	64
-0,567	65	0,406	65	0,722	65
-0,578	66	0,411	66	0,731	66
-0,589	67	0,417	67	0,740	67
-0,599	68	0,422	68	0,748	68
-0,610	69	0,428	69	0,757	69
-0,621	70	0,433	70	0,766	70
-0,633	71	0,438	71	0,774	71
-0,644	72	0,444	72	0,782	72
-0,655	73	0,449	73	0,791	73
-0,667	74	0,454	74	0,799	74
-0,678	75	0,459	75	0,807	75
-0,690	76	0,465	76	0,816	76
-0,701	77	0,470	77	0,824	77
-0,713	78	0,475	78	0,832	78
-0,725	79	0,480	79	0,840	79
-0,737	80	0,485	80	0,848	80
-0,749	81	0,491	81	0,856	81
-0,761	82	0,496	82	0,864	82
-0,773	83	0,501	83	0,872	83
-0,786	84	0,506	84	0,880	84
-0,798	85	0,511	85	0,888	85
-0,811	86	0,516	86	0,895	86
-0,824	87	0,521	87	0,903	87

-0,837	88	0,526	88	0,911	88
-0,849	89	0,531	89	0,918	89
-0,862	90	0,536	90	0,926	90
-0,876	91	0,541	91	0,934	91
-0,889	92	0,546	92	0,941	92
-0,902	93	0,551	93	0,949	93
-0,916	94	0,556	94	0,956	94
-0,930	95	0,561	95	0,963	95
-0,943	96	0,566	96	0,971	96
-0,957	97	0,570	97	0,978	97
-0,971	98	0,575	98	0,986	98
-0,986	99	0,580	99	0,993	99
-1,000	100	0,585	100	1,000	100
-1,415	125	0,700	125	1,170	125
-2,000	150	0,807	150	1,322	150
$-\infty$	200	1,000	200	1,585	200



Caractérisation génomique des anomalies de la pigmentation cutanée en mosaïque

Mots clés : Séquençage haut débit, Mosaïque, Pigmentation cutanée, Hypomélanose d'Ito

Introduction : Les dyschromies cutanées en mosaïque ont fait suspecter de longue date l'implication d'un mosaïcisme génétique sous-jacent. Ces événements post-zygotiques sont cependant difficilement détectables par les techniques conventionnelles. Ainsi, les bases génétiques des dyschromies en mosaïque étaient restées mal connues. **Matériel et méthodes :** La cohorte M.U.S.T.A.R.D rassemble des échantillons d'ADN de biopsies cutanées de patients porteurs d'un mosaïcisme pigmentaire. Après une analyse phénotypique spécialisée, ces échantillons sont étudiés en séquençage à forte profondeur, d'exome (ES) en trio, ou ciblé. Les données sont analysées à l'aide d'un pipeline dédié, permettant la détection de variations ponctuelles en mosaïque (mSNV) mais également de diverses anomalies chromosomiques en mosaïque. **Résultats :** De 2013 à 2019, 101 patients ont été inclus. Un ES a été réalisé pour 56 patients, identifiant un mSNV chez 12 patients, dans 7 gènes dont 4 nouveaux (*RHOA*, *DOCK1*, *GNA13*, *TFE3*), et une anomalie chromosomique chez 17 patients. Une étude ciblée de ces gènes chez 40 autres patients était positive pour 17, soit un rendement diagnostique global à 55% (46/84). **Conclusion :** Ce travail illustre l'importance d'une approche bioinformatique polyvalente, combinée à une expertise clinique, pour la détermination des causes génétiques des dyschromies cutanées en mosaïque. Il a également mis en évidence le rôle de la voie de signalisation dépendant des Rho GTPases, faisant progresser notre compréhension de la physiopathologie des dyschromies en mosaïque, une étape nécessaire à l'amélioration de la prise en charge de ces patients porteurs de maladies rares et complexes.

Genomic characterization of mosaic cutaneous pigmentary disorders

Keywords: Next generation sequencing, Mosaic, Cutaneous pigmentation, Hypomelanosis of Ito

Introduction: Mosaic cutaneous dyschromia is strongly evocative of an underlying genetic mosaicism. These post-zygotic events are challenging for conventional diagnostic tools. Thus, genetic basis of mosaic cutaneous dyschromia still remained poorly understood. **Materials and Methods:** The M.U.S.T.A.R.D. cohort gathers DNA from skin biopsies of patients with mosaic cutaneous dyschromia. After a specialised phenotype analysis, they are referred to either trio exome sequencing (ES) at 200X, or targeted ultra-deep sequencing (60,000X) of candidate genes. Data are analysed with a tailored pipeline, allowing detection of both low-rate nucleotidic variations or chromosomal events. **Results:** From 2013 to 2019, 101 patients were included. ES was performed for 56, with identification of mosaic SNV in 12 patients in 7 new genes, including 4 new genes (*RHOA*, *DOCK1*, *GNA13*, *TFE3*), and mosaic chromosomal anomalies in 17 patients. A targeted sequencing of these genes was performed for 40 more patients, with a confirmed mosaic SNV in 17, and a global diagnostic yield of 55% (46/84). **Conclusion:** This work highlights the importance of a versatile bioinformatic approach combined to a clinical expertise, to decipher the chromosomal and molecular aetiologies of developmental anomalies with mosaic cutaneous dyschromia. It also pinpoints the role of the Rho GTPase pathway, which will help enhancing our understanding of mosaic cutaneous dyschromia, and may ultimately result in better patients' care.