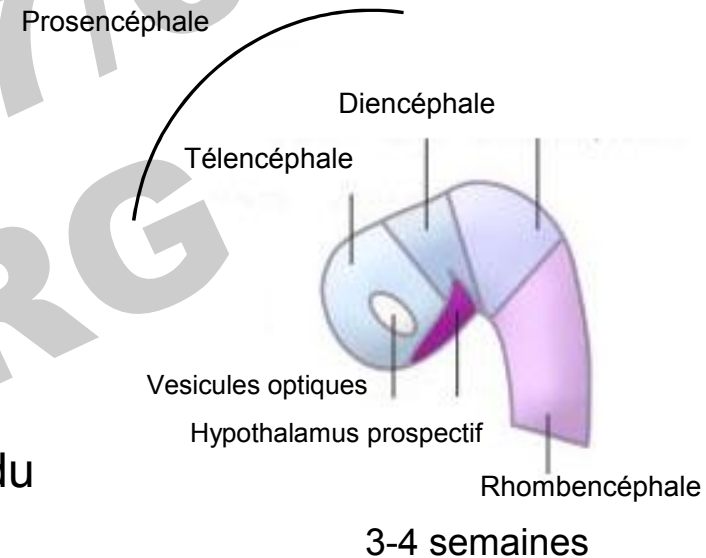


Définition

- Malformation congénitale cérébrale la plus fréquente chez l'Homme
 - 1/250 produits de conception
 - 1/10,000 naissances
- Division incomplète du prosencéphale lors du développement cérébral précoce



Adapté de Geng et al, 2009

L'holoprosencéphalie (HPE) : Introduction



- Souvent associée à des anomalies de la face



Sévérité

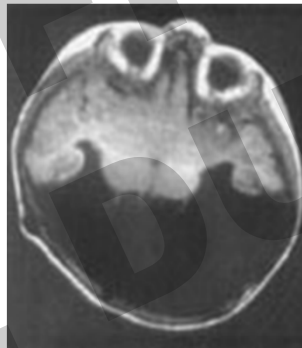
Alobaire

Semi-lobaire

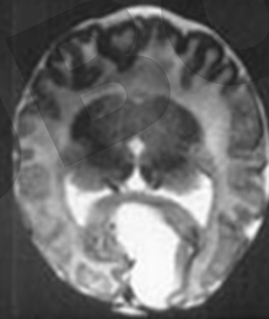
Lobaire

Syntélencéphalie

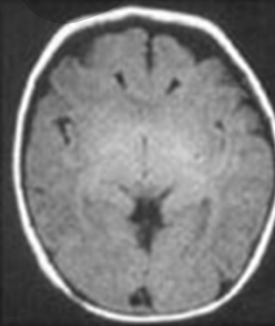
Microforme



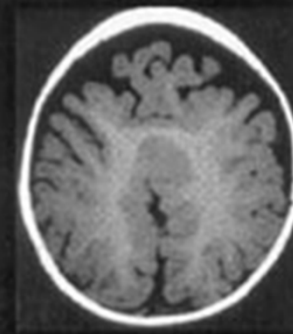
Corps calleux
absent



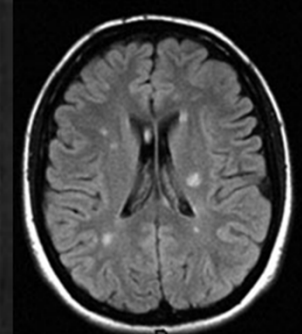
Corps calleux antérieur
absent



Corps calleux
absent dans
région affectée

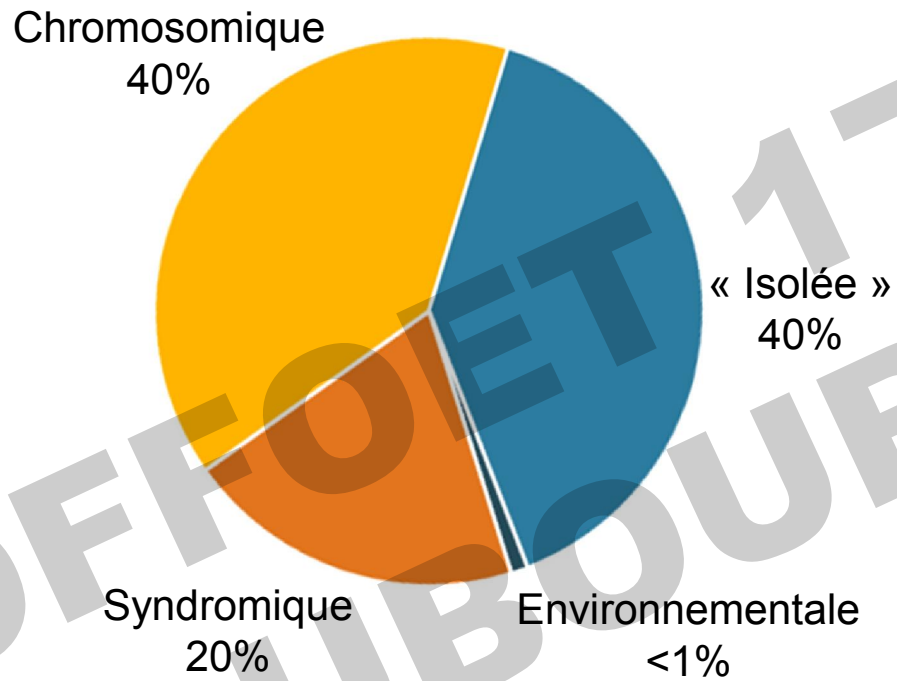


Tronc du corps calleux
absent

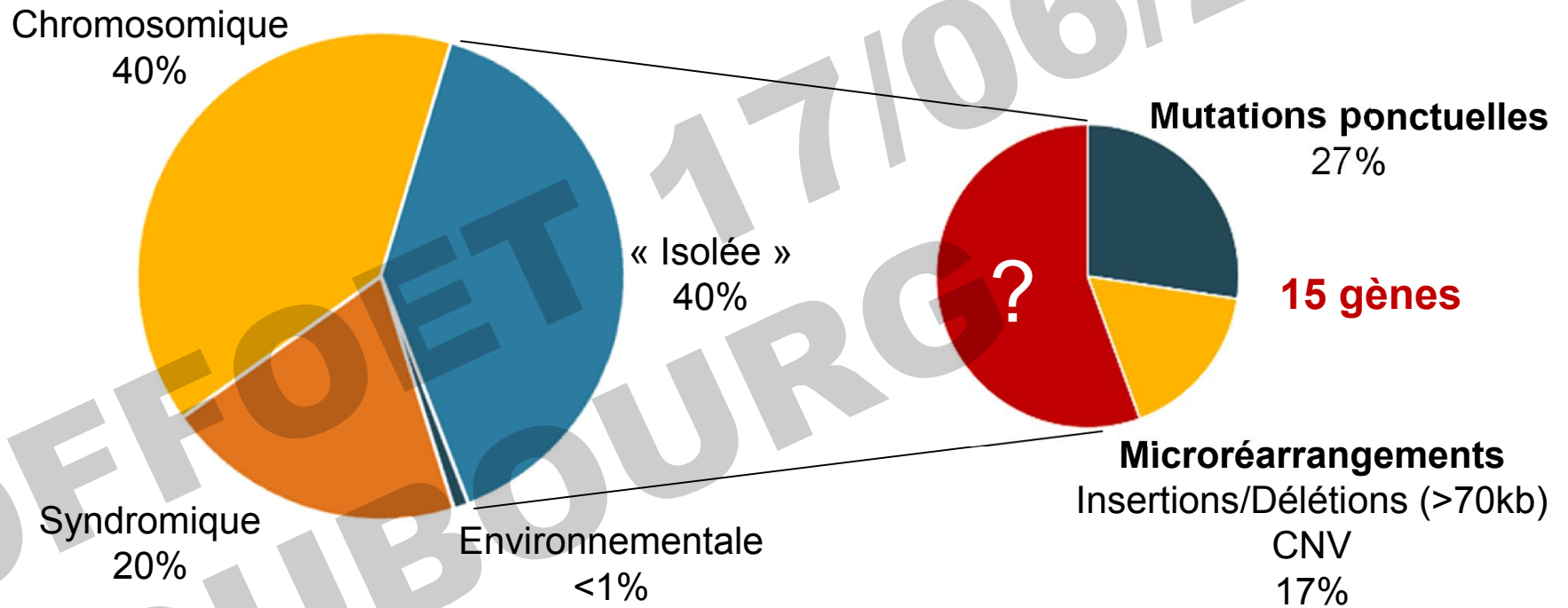


Défauts subtiles
du corps calleux

Origine de l'HPE



Origine de l'HPE



Quid des gènes : avant le NGS

Gènes	Fréquence
<i>SHH</i>	12%
<i>ZIC2</i>	9%
<i>SIX3</i>	5%
<i>TGIF1</i>	1 %
<i>CDON</i>	<1%
<i>DISP1</i>	<1%
<i>NODAL</i>	<1%
<i>GLI2</i>	<1%
<i>PTCH</i>	<1%
<i>TDGF1</i>	<1%
<i>FOXH1</i>	<1%
<i>FGF8</i>	<1%
<i>GAS1</i>	<1%
<i>DLL1</i>	<1%

Séquençage de Sanger
SHH, ZIC2, SIX3, TGIF1 (et GLI2)



NGS (Next Generation Sequencing)

Ion Torrent PGM

Re-séquençage d'un panel
de 20 gènes HPE

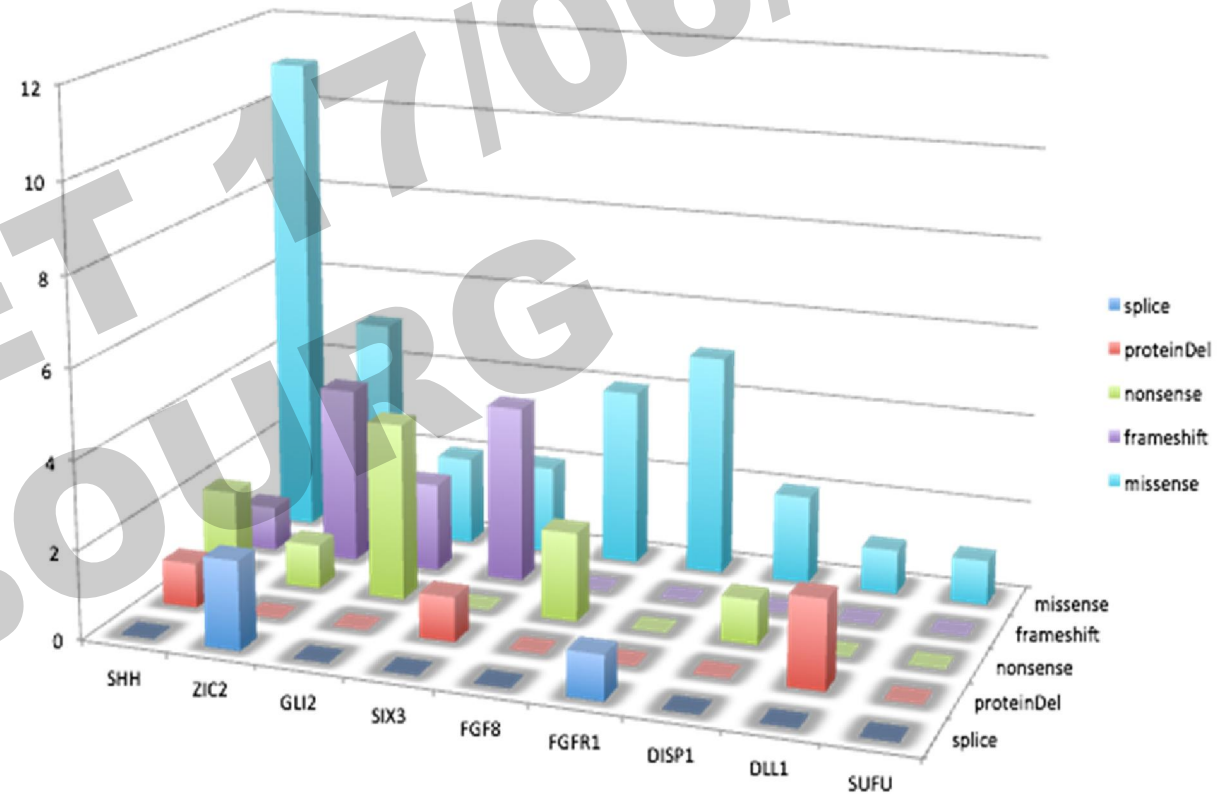


Dubourg et al, 2007
Mercier et al, 2011
Dupé et al, 2011

Quid des gènes : après la mise en place du NGS

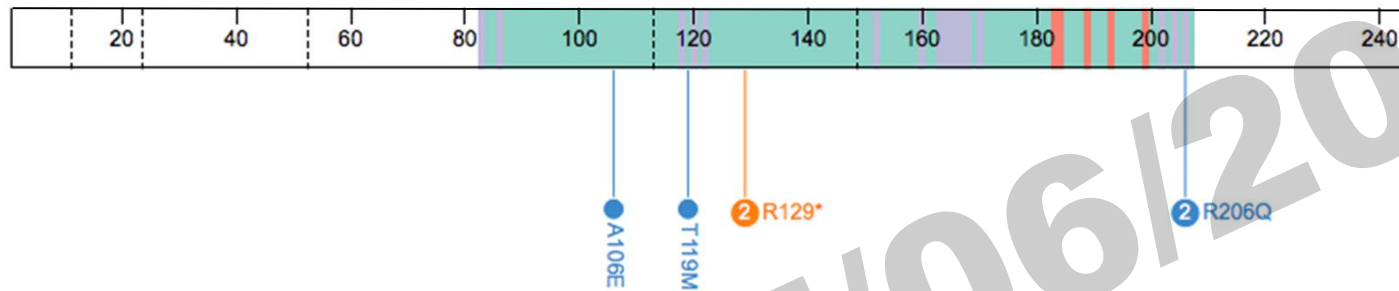
Gènes	Fréquences
<i>SHH</i>	5,8%
<i>ZIC2</i>	4,7%
<i>GLI2</i>	3,1%
<i>SIX3</i>	2,7%
<i>FGF8</i>	2,3%
<i>FGFR1</i>	2,3%
<i>DISP1</i>	1,2%
<i>DLL1</i>	1,2%
<i>SUFU</i>	0,4%
<i>TGIF1</i>	<
<i>CDON</i>	<
<i>NODAL</i>	<
<i>PTCH</i>	<
<i>TDGF1</i>	<
<i>FOXH1</i>	<
<i>GAS1</i>	<

Gènes impliqués dans l'HPE



Dubourg et al, soumis à
Human Mutation

Mutations *FGF8*

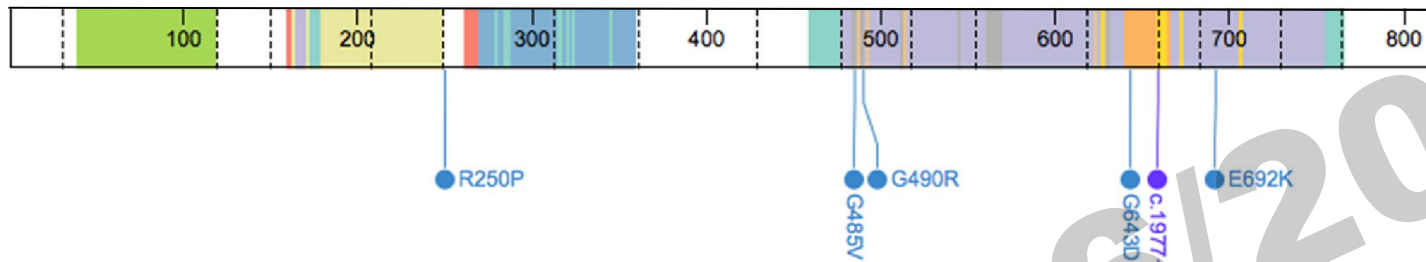


<i>FGF8</i>	g.103534509G>T	c.317C>A	p.Ala106Glu	D:9 P:0 T:1	semilobar HPE	de novo	
	g.103531308G>A	c.356C>T	p.Thr119Met	D:9 P:0 T:1	semilobar HPE	?	<i>FGFR1</i> : c.1977+1G>A
	g.103531279G>A	c.385C>T	p.Arg129*	Stop gain	alobar syntelencephaly	father ?	
	g.103530204C>T	c.617G>A	p.Arg206Gln	D:9 P:1 T:0	NPAS, SMMCI, hypotelorism lobar HPE	mother (hypotelorism, microretrognathism) ?	<i>DLL1</i> : p.Asp601_Ile602 delinsVal

FGF8 NM_033163

- **FGF** Acidic and basic fibroblast growth factor family; cd00058
- **other** receptor interaction site
- **other** heparin binding site (glycine box) [chemical binding]

Mutations *FGFR1*



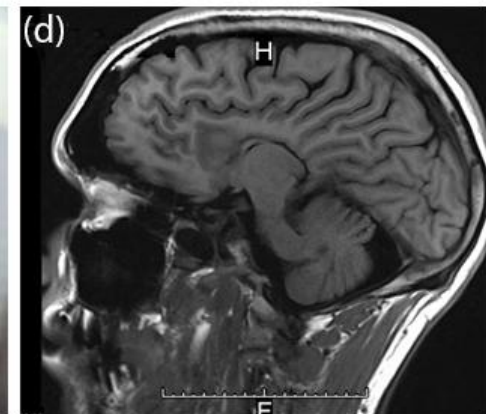
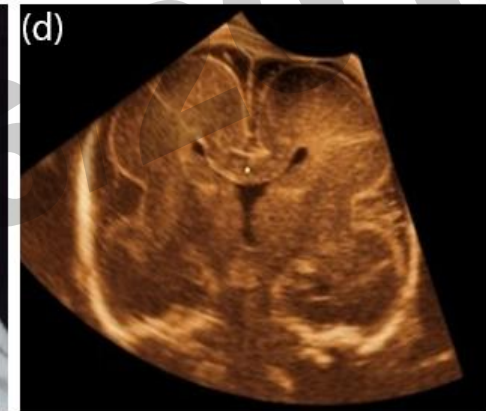
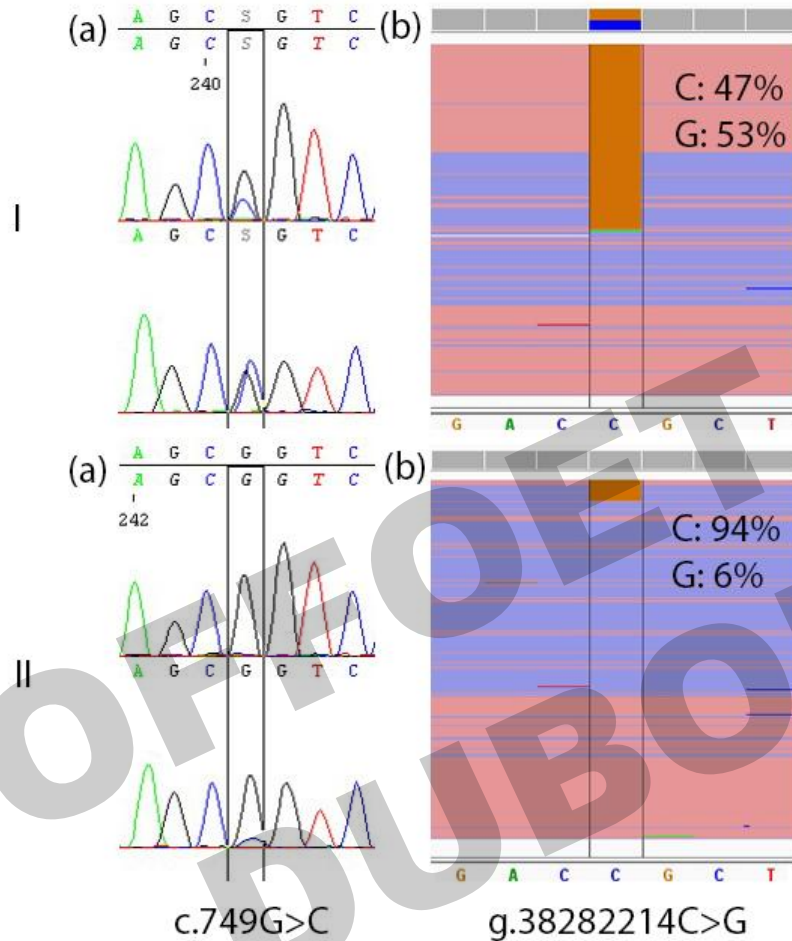
<i>FGFR1</i>	g.38282214C>G	c.749G>C	p.Arg250Pro	D:8 P:0 T:2	lobar HPE, cleft lip palate	father (microform): mosaicism 6%	
	g.38275486C>A	c.1454G>T	p.Gly485Val	D:10 P:0 T:0	Hartsfield	de novo	
	g.38275472C>G	c.1468G>C	p.Gly490Arg	D:9 P:1 T:0	Hartsfield	de novo	
	g.38272346C>T	c.1928G>A	p.Gly643Asp	D:9 P:0 T:1	NPAS, SMMCI, DI	de novo	
	g.38272296C>T	c.1977+1G>A	p.?	Splicing	Semilobar HPE	?	<i>FGF8</i> : p.Thr119Met
	g.38271782C>T	c.2074G>A	p.Glu692Lys	D:10 P:0 T:0	HPE, cleft	mother (hypogonadotropic hypogonadism)	

FGFR1 NM_023110

- **Ig1_FGFR** First immunoglobulin (Ig)-like domain of fibroblast growth factor receptor (FGFR); cd04973
- **I-set** Immunoglobulin I-set domain; pfam07679
- **Ig2_FGFR** Second immunoglobulin (Ig)-like domain of fibroblast growth factor (FGF) receptor; cd05857
- **other** FGF binding site [polypeptide binding]
- **other** ligand binding site [chemical binding]
- **Ig3_FGFR-2** Third immunoglobulin (Ig)-like domain of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2); cd05858
- **PTKc_FGFR1** Catalytic domain of the Protein Tyrosine Kinase, Fibroblast Growth Factor Receptor 1; cd05098
- **Pkinase_Tyr** Protein tyrosine kinase; pfam07714
- **active**
- **other** ATP binding site [chemical binding]
- **other** substrate binding site [chemical binding]
- **other** activation loop (A-loop)

Mutations *FGFR1*: exemple de la c.749G>C ou p.Arg250Pro

Dossier suivi par Joëlle Roume, Poissy



Fente narinaire
Hypoplasie du bourgeon
maxillaire droit et
rétraction latérale droite
de lèvre supérieure

Agénésie du corps
calleux

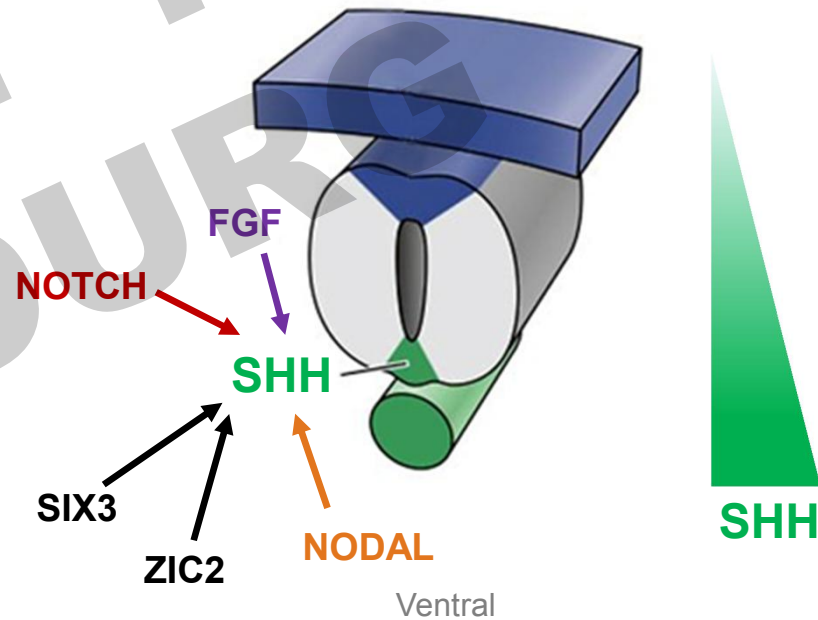
Voies de signalisation

Genes	Frequencies
<i>SHH</i>	5,8%
<i>ZIC2</i>	4,7%
<i>GLI2</i>	3,1%
<i>SIX3</i>	2,7%
<i>FGF8</i>	2,3%
<i>FGFR1</i>	2,3%
<i>DISP1</i>	1,2%
<i>DLL1</i>	1,2%
<i>SUFU</i>	0,4%
<i>TGIF1</i>	<
<i>CDON</i>	<
<i>NODAL</i>	<
<i>PTCH</i>	<
<i>TDGF1</i>	<
<i>FOXH1</i>	<
<i>GAS1</i>	<

Gènes impliqués dans l'HPE :

- Appartiennent à des voies de signalisation majeures du développement cérébral
- Majoritairement impliqués dans la transmission ou la régulation du signal Shh

La voie FGF doit être considérée maintenant comme une voie de signalisation importante pour l'HPE.



Dubourg et al, soumis à *Human Mutation*

Adapté de Gilbert, 2010

Modèle autosomique dominant
Expressivité variable
(Odent et al, 1998)

Transmission dominante
“apparente”

Pénétrance incomplète
Taux élevé d'héritabilité
(> 70% SHH, SIX3, TGIF1)

Variabilité intrafamiliale
(alobaire → microforme)

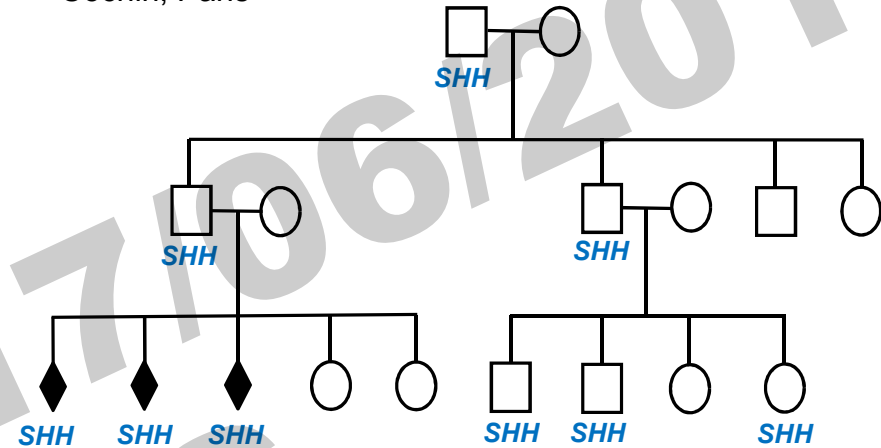
Facteurs environnementaux
(diabète, cholestérol...)

Hypothèse “multi-hit”:
≥ 2 évènements

Exemple 1 : Digénisme *SHH* / *DISP1*

- ***SHH* p.Pro347Gln hétérozygote**
 - Chr7 :155595943G>T
 - ExAC : 0
 - Prédiction : D:9 P:1 T:0
- **Test fonctionnel cellulaire**
 - Différenciation shh-dépendente de cellules C3H10T1/2 en ostéoblastes
 - Evaluation de la différenciation par mesure de l'activité phosphatase alcaline

Famille suivie par Géraldine Viot, Houria Salhi, Hôpital Cochin, Paris



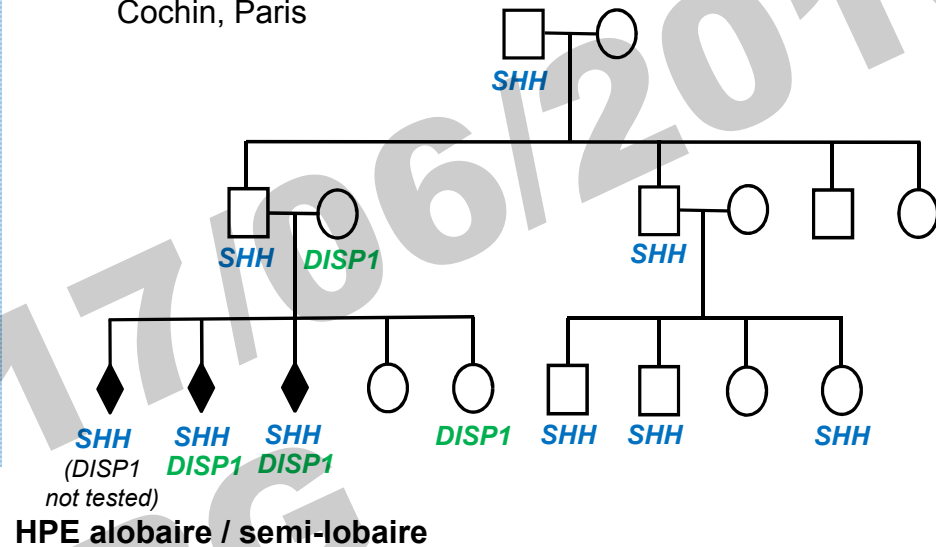
HPE lobaire et semi-lobaire



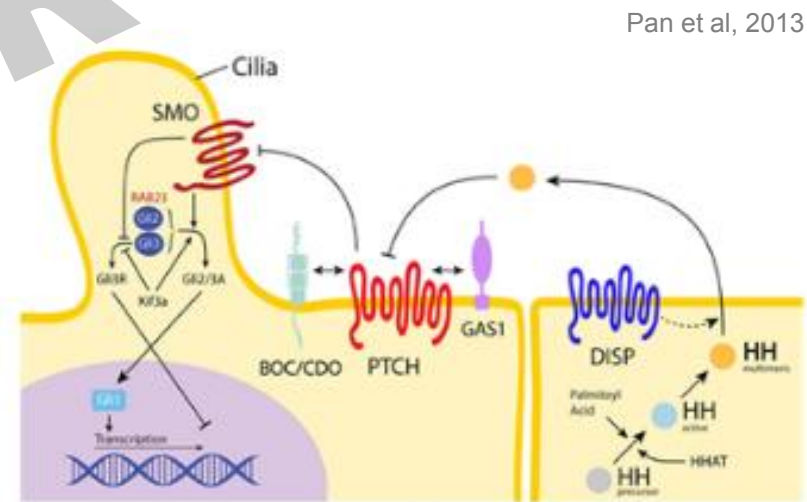
Exemple 1 : Digénisme *SHH* / *DISP1*

- ***SHH* p.Pro347Gln hétérozygote**
 - Chr7 :155595943G>T
 - ExAC : 0
 - Prédications : D:9 P:1 T:0
- **Test fonctionnel cellulaire**
 - Différenciation shh-dépendente de cellules C3H10T1/2 en ostéoblastes
 - Evaluation de la différenciation par mesure de l'activité phosphatase alcaline

Famille suivie par Géraldine Viot, Houria Salhi, Hôpital Cochin, Paris

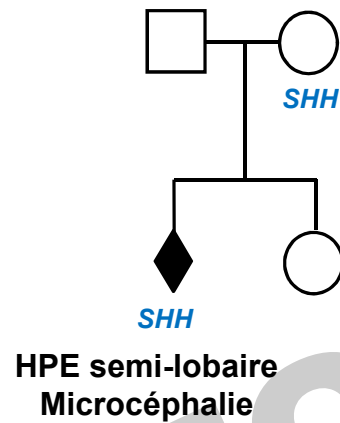


- ***DISP1* p.Met1096Thr**
 - Chr1 : 223178026T>C
 - ExAC : 0,006194
 - Prédications : D:3 P:1 T:4
- ***DISP1* = Dispatched 1**
 - Protéine membranaire impliquée dans la sécrétion de Shh
 - Quelques mutations reportées dans des cas d'HPE



Exemple 2 : Trigénisme *SHH* / *NDST1* / *FAT1* ?

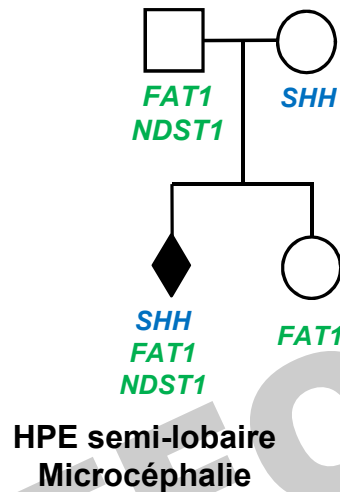
Dossier suivi par Sylvie Odent, Philippe Loget, Rennes



- ***SHH* p.Asp171His**
 - Chr7:155599041C>G
 - ExAC: 0
 - Predictions: D:10 P:0 T:0

Exemple 2 : Trigénisme *SHH* / *NDST1* / *FAT1* ?

Dossier suivi par Sylvie Odent, Philippe Loget, Rennes



- ***SHH* p.Asp171His**
 - Chr7:155599041C>G
 - ExAC: 0
 - Predictions: D:10 P:0 T:0

- ***NDST1* p.Arg80His**
 - Chr5 : 149901055G>A
 - ExAC : 0,0025
 - Predictions : D:4 P:1 T:5

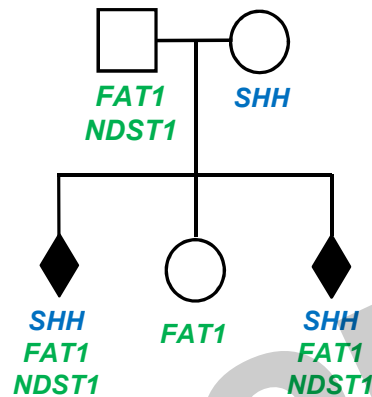
- ***NDST1* = N-deacetylase-sulfotransferase**
 - Une déficience en *Ndst1* sensibilise les souris aux variations d'expression de *Shh*
 - Un défaut de sulfatation des héparanes sulfates du à une déficience de *Ndst1* entraîne des malformations spécifiques de la tête et du prosencéphale chez la souris (Grobe et al, 2005)

- ***FAT1* p.Tyr1770Cys**
 - Chr4:187542431T>C
 - ExAC : 0,0001144
 - Predictions : D:8 P:1 T:1

- ***FAT1* = FAT atypical cadherin 1**
 - Protocadhérine impliquée dans l'adhésion cellulaire
 - Souris KO
 - 40% des embryons présentent des anomalies des yeux
 - 6% ont une HPE sévère (cyclopia, proboscis)

Exemple 2 : Trigénisme *SHH* / *NDST1* / *FAT1* ?

Dossier suivi par Sylvie Odent, Philippe Loget, Rennes



HPE semi-lobaire
Microcéphalie

- ***SHH* p.Asp171His**
 - Chr7:155599041C>G
 - ExAC: 0
 - Predictions: D:10 P:0 T:0

- ***NDST1* p.Arg80His**

- Chr5 : 149901055G>A
- ExAC : 0,0025
- Predictions : D:4 P:1 T:5

- ***NDST1* = N-deacetylase-sulfotransferase**

- Une déficience en *Ndst1* sensibilise les souris aux variations d'expression de *Shh*
- Un défaut de sulfatation des héparanes sulfates du à une déficience de *Ndst1* entraîne des malformations spécifiques de la tête et du prosencéphale chez la souris (Grobe et al, 2005)

- ***FAT1* p.Tyr1770Cys**

- Chr4:187542431T>C
- ExAC : 0,0001144
- Predictions : D:8 P:1 T:1

- ***FAT1* = FAT atypical cadherin 1**

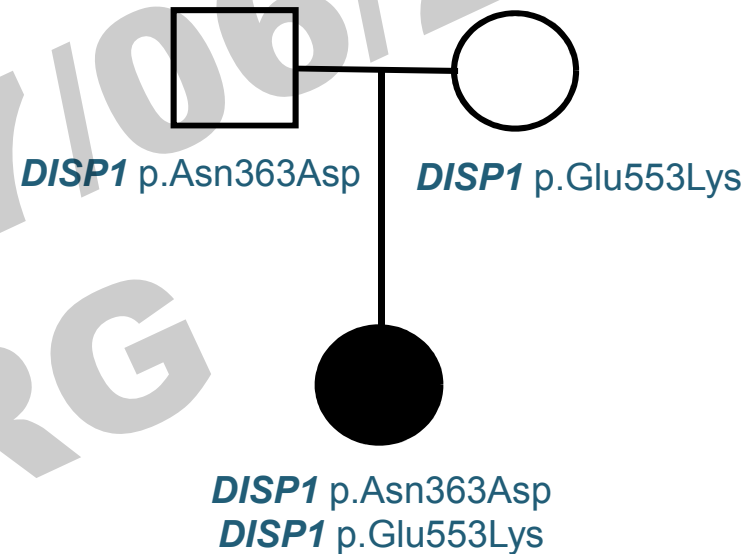
- Protocadhérine impliquée dans l'adhésion cellulaire
- Souris KO
 - 40% des embryons présentent des anomalies des yeux
 - 6% ont une HPE sévère (cyclopi, proboscis)

Exemple 3 : Transmission récessive de deux variants hétérozygotes composites dans *DISP1*

Dossier suivi par Chloé Quelin, Catherine Tréguier, Rennes



Fusion très localisée au niveau frontal

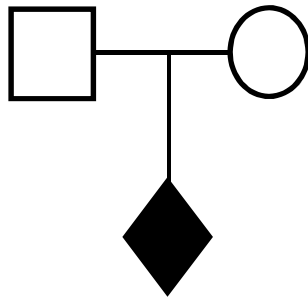


- **p.Asn363Asp**
Prédictions: D:10 P:0 T:0
- **p.Glu553Lys**
Prédictions: D:5 P:1 T:4



Exemple 4 : Digénisme *DISP1/SUFU*

Dossier suivi par Marie Gonzales, Antoinette Gelot, Paris

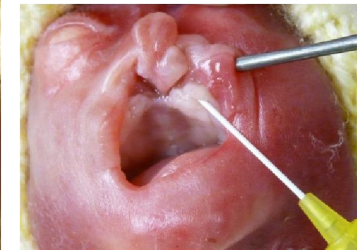


DISP1 p.Trp966*
SUFU p.Pro341Leu

- ***DISP1*: p.Trp966***
Stop gain
- ***SUFU*: p.Pro341Leu**
Prédictions: D:3 P:2 T:5



Syndrome polymalformatif avec fente labionarinaire et palatine bilatérale



Modèle autosomique dominant
Expressivité variable
(Odent et al, 1998)

Transmission dominante
“apparente”



Modèle autosomique dominant
ZIC2

SOFEO ET 17/06/2016
C. DUBOURG

Modèle autosomique dominant

Expressivité variable
(Odent et al, 1998)

Transmission dominante
“apparente”



Modèle autosomique dominant
ZIC2

Modèle oligogénique

SHH/DISP1

FGF8/FGFR1

FGF8/DLL1

SHH/DLL1

SHH/NDST1/FAT1

DISP1/SUFU

SOFFO ET AL 17/06/2016
C. DUBOURG

Modèle autosomique dominant
Expressivité variable
(Odent et al, 1998)

Transmission dominante
"apparente"



Modèle autosomique dominant
ZIC2

Modèle oligogénique

SHH/DISP1

FGF8/FGFR1

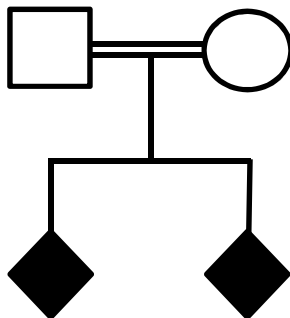
FGF8/DLL1

SHH/DLL1

SHH/NDST1/FAT1

DISP1/SUFU

Modèle autosomique récessif
DISP1
STIL

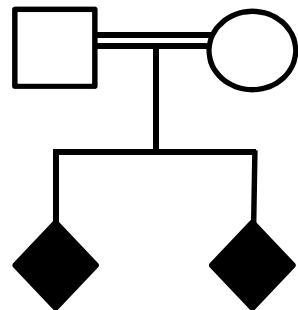


Familles
consanguines

Puce
SNP

Séquençage
de l'exome

SOFFROET 17/06/2016
C. DUBOURG

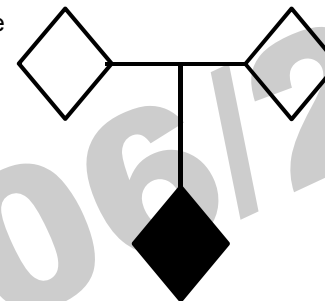


Familles consanguines

Puce SNP

Séquençage de l'exome

1 mutation gène majeur
SHH
SIX3
TGIF1



?

1 mutation gène majeur
SHH
SIX3
TGIF1

?

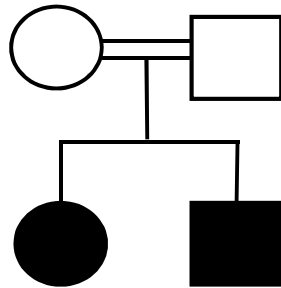
Trios

Séquençage de l'exome

SOFFROET 17/06/20
C. DUBOURG

Approche 1 : Etude de familles consanguines

Famille suivie par Sue Tomkins, Bristol , Royaume-Uni



Familles
consanguines

Puce SNP

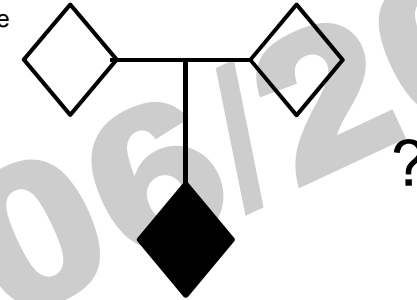
Séquençage
de l'exome

STIL	p.Gly717Glu
<i>RNF180</i>	p.His229Arg
<i>FAT1</i>	p.Asn3732Ser
<i>PLCH1</i>	p.Cys1041fs*17
<i>MAST4</i>	p.Asp931Gly
<i>ABCC2</i>	p.Ser281Asn



Mouden et al, *PLoS One* 2015

1 mutation gène
majeur
SHH
SIX3
TGIF1



1 mutation gène
majeur
SH
SIX3
TGIF1

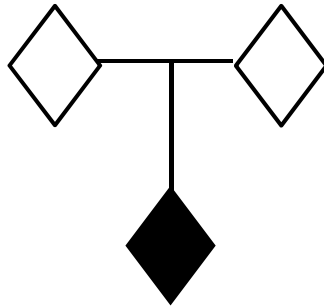
?

Trios

Séquençage
de l'exome

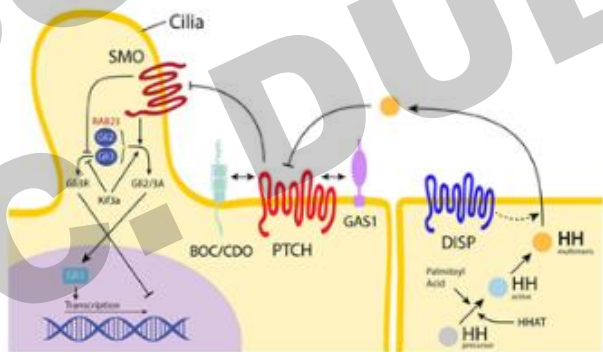
Approche exomique : Etude de trios

1 mutation gène majeur
SHH
SIX3
TGIF1



1 mutation gène majeur
SHH
SIX3
TGIF1

?



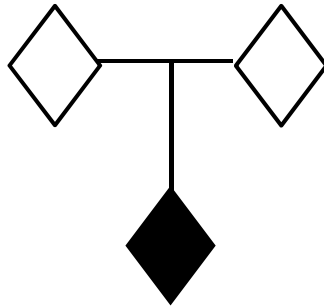
Famille	Mutation héritée	Mutations candidates	
		héritées autre parent	de novo
1	père SHH	CROCC	
		PTCH2	
2	mère SHH	FAT1	
		VPS13B	
		NDST1	
4	mère SHH	PLXNA2	
		IFT172	
		PCSK6	
		LAMA5	
		LAMA5	
		PCNT	
5	mère SIX3	DPC1A	PDHB
		NIPBL	
		DMRT2	
		CHTOP	LRP3
		ADAMTS9	
6	père SIX3	CEP70	
		IFT88	
		COL4A2	
		SYNE2	
		ACVR2A	ITPR1
7	mère SIX3	PLK4	
		IFT88	

Famille	Mutation héritée	Mutations candidates	
		héritées autre parent	de novo
8	mère TGIF1	ASPM	OR4C16
		SSPO	
		PAH	
9	père TGIF1	PRICKLE	
		PLCB4	
		ADAM17	
		ABCB6	
		LIFR	
		ARC	
10	mère SIX3	CARD10	
		CEP72	
		PCDHGA1	
		GTF2IRD1	
		CRB2	NOTCH1
		OGDHL	
		ARHGAP11A	
		PIGN	
		PCNT	
		CKAP2L	
WNT10A			
11	père SHH	DAB2	
		SSR1	
		LAMA4	
		PCSK6	
		

→ Gènes impliqués dans la transmission ou régulation des voies SHH, NODAL et NOTCH

Approches exomiques

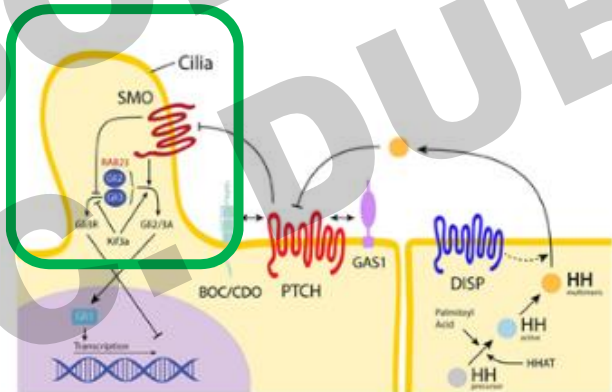
1 mutation gène majeur
SHH
SIX3
TGIF1



1 mutation gène majeur
SHH
SIX3
TGIF1

?

Cil primaire



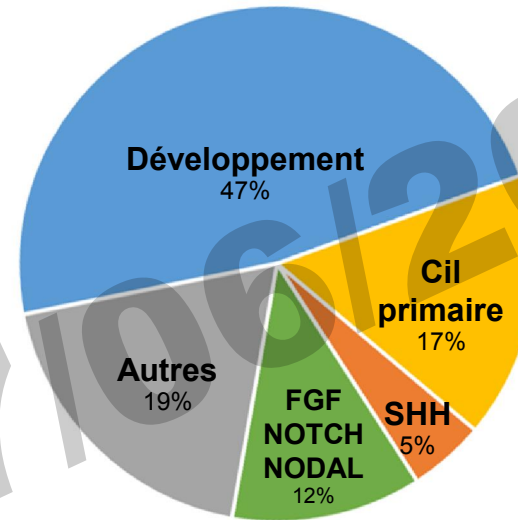
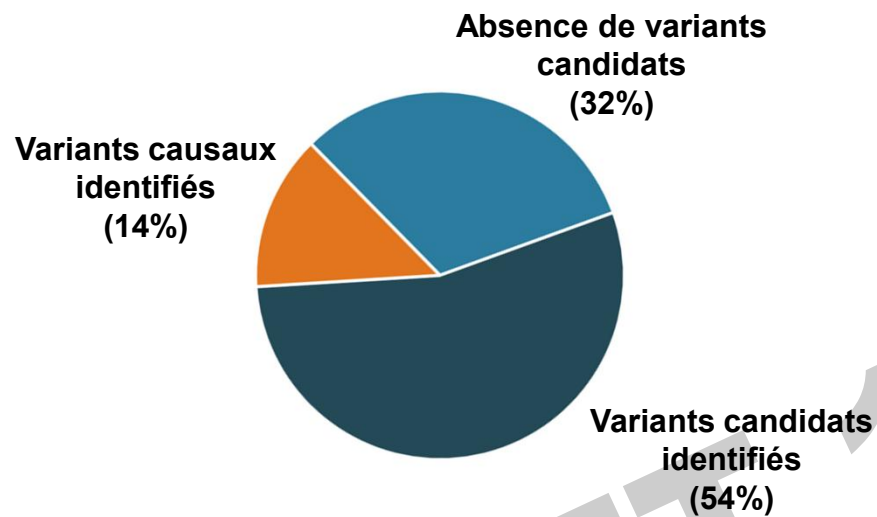
Famille	Mutation héritée	Mutations candidates	
		héritées autre parent	de novo
1	père SHH	CROCC PTCH2	
2	mère SHH	FAT1 VPS13B NDST1 PLXNA2 IFT172	
4	mère SHH	PCSK6 LAMA5 LAMA5 PCNT	
5	mère SIX3	DPC1A NIPBL DMRT2 CHTOP ADAMTS9	PDHB LRP3
6	père SIX3	CEP70 IFT88 COL4A2 SYNE2	
7	mère SIX3	ACVR2A PLK4 IFT88	ITPR1

Famille	Mutation héritée	Mutations candidates	
		héritées autre parent	de novo
8	mère TGIF1	ASPM SSPO PAH PRICKLE PLCB4 ADAM17	OR4C16
9	père TGIF1	ABCB6 LIFR ARC CARD10	
10	mère SIX3	CEP72 PCDHGA1 GTF2IRD1 CRB2 NOTCH1 OGDHL ARHGAP11A PIGN	
11	père SHH	PCNT CKAP2L WNT10A DAB2 SSR1 LAMA4 PCSK6	

→ Gènes impliqués dans la transmission ou régulation des voies SHH, NODAL et NOTCH

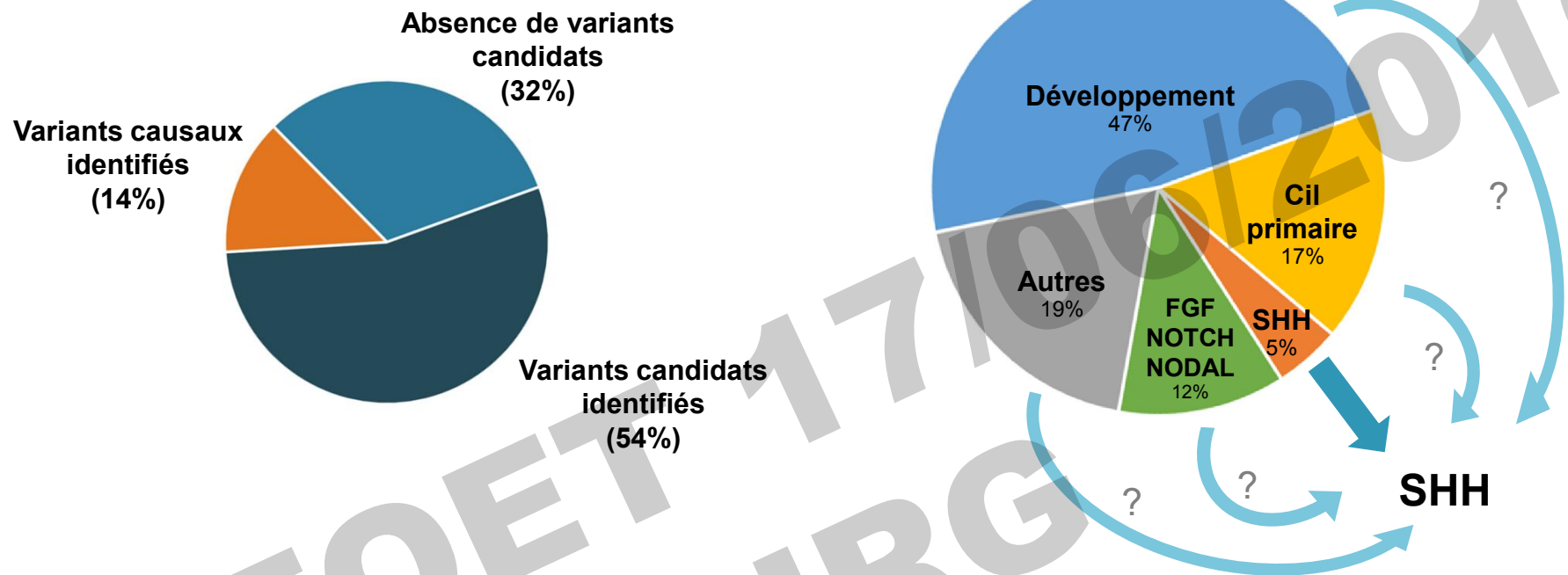
→ Gènes impliqués dans la formation et le fonctionnement des cils primaires

Approches exomiques : bilan

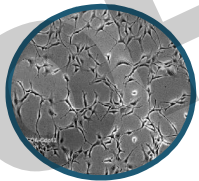


SOFFOET 17/10/2016
C. DUBOURG

Approches exomiques : bilan et perspectives

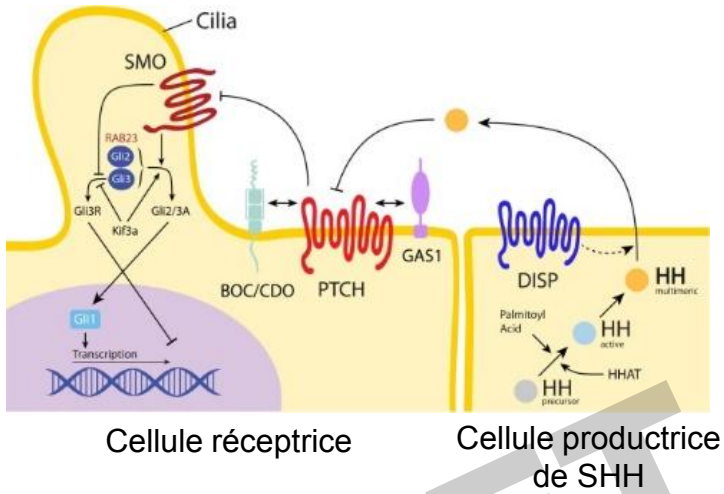


- **Test fonctionnel cellulaire (système rapporteur Shh-Light2)**
 - Lien entre gènes candidats et voie SHH

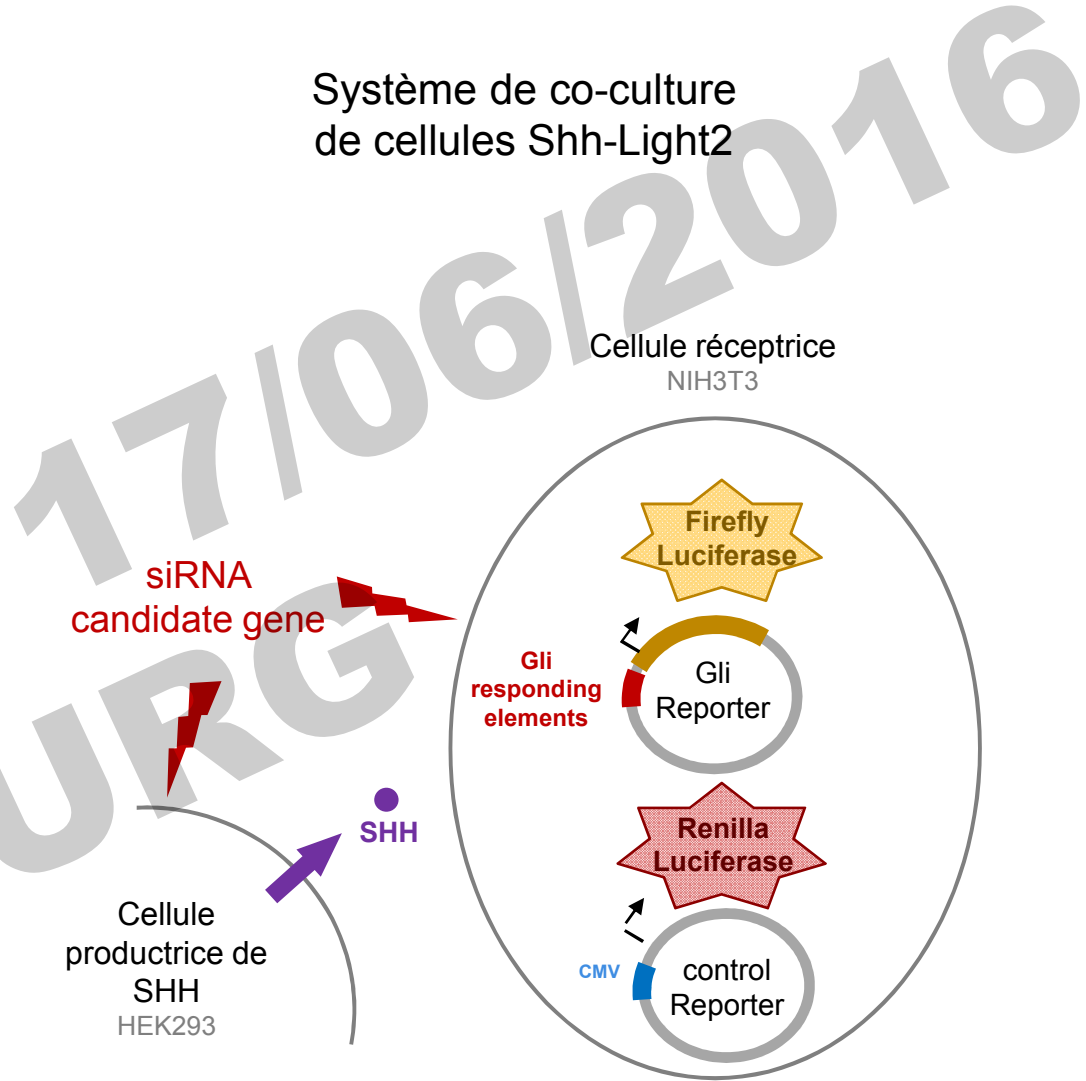


Test fonctionnel cellulaire

Voie de signalisation SHH



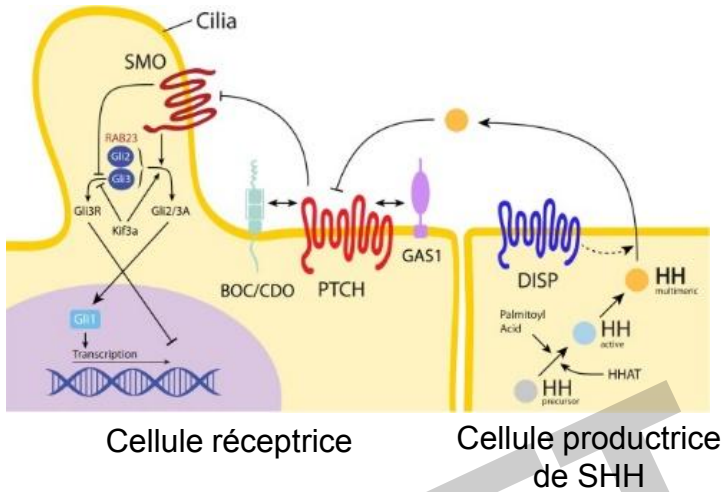
Système de co-culture de cellules Shh-Light2



SOFFOEN
C. DUBOURG

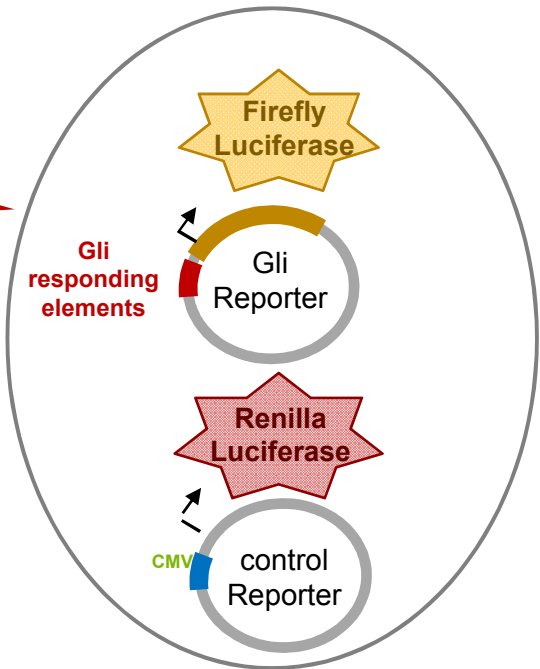
Test fonctionnel cellulaire

Voie de signalisation SHH

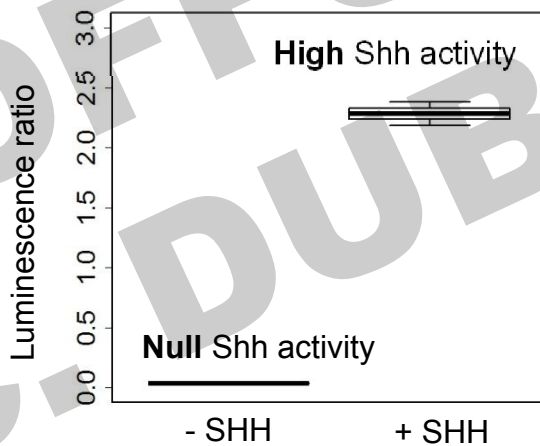


Système de co-culture de cellules Shh-Light2

Cellule réceptrice
NIH3T3



$$\text{Shh pathway activity} = \frac{\text{Firefly luminescence}}{\text{Renilla luminescence}}$$



siRNA
candidate gene

Cellule
productrice de
SHH
HEK293

SHH

Gli
responding
elements

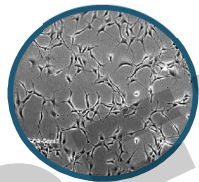
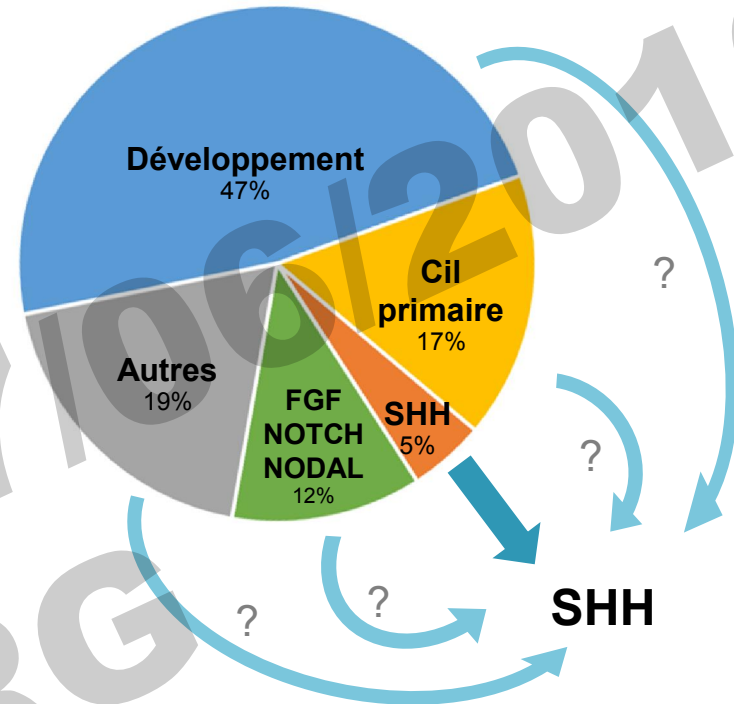
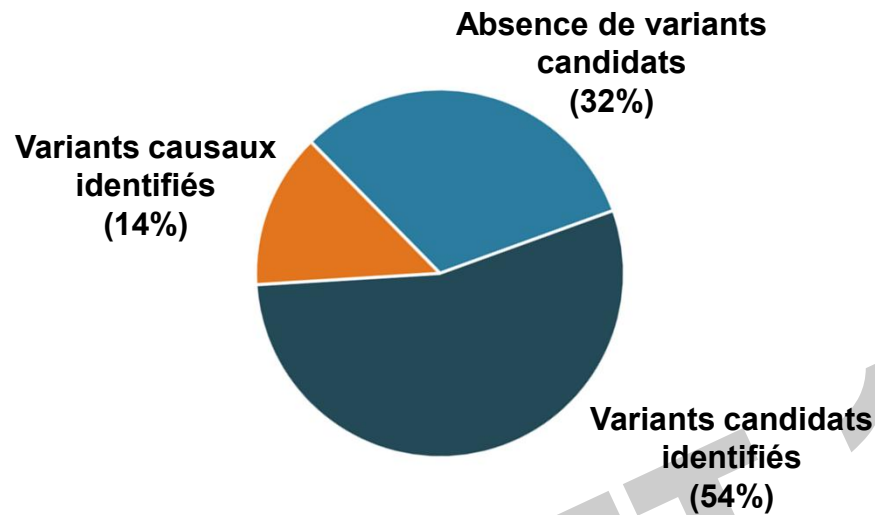
Gli
Reporter

Renilla
Luciferase

CMV

control
Reporter

Approches exomiques : bilan et perspectives



- **Test fonctionnel cellulaire (système rapporteur Shh-Light2)**
 - Lien entre gènes candidats et voie SHH



- **Séquençage de familles supplémentaires**
 - WES
 - WGS



- **Diagnostic**

NGS ciblé → Exome médical (4800 gènes OMIM) ?



Merci !



Foetopathologistes
Cliniciens
Généticiens
Radiologues

...

Génétique Clinique

CHU Rennes

Sylvie Odent

Laurent Pasquier

Chloé Quelin

Florence Demurger

Mélanie Fradin

Foetopathologie

CHU Rennes

Philippe Loget

Chloé Quelin

Equipe de recherche IGDR

Rennes

Valérie Dupé

Véronique David

Charlotte Mouden

Sylvie Odent

Marie de Tayrac

Houda Hamdi-Rozé

Hélène Guyodo

Laboratoire de Génétique

Moléculaire

CHU Rennes

Véronique David

Wilfrid Carré

Techniciens



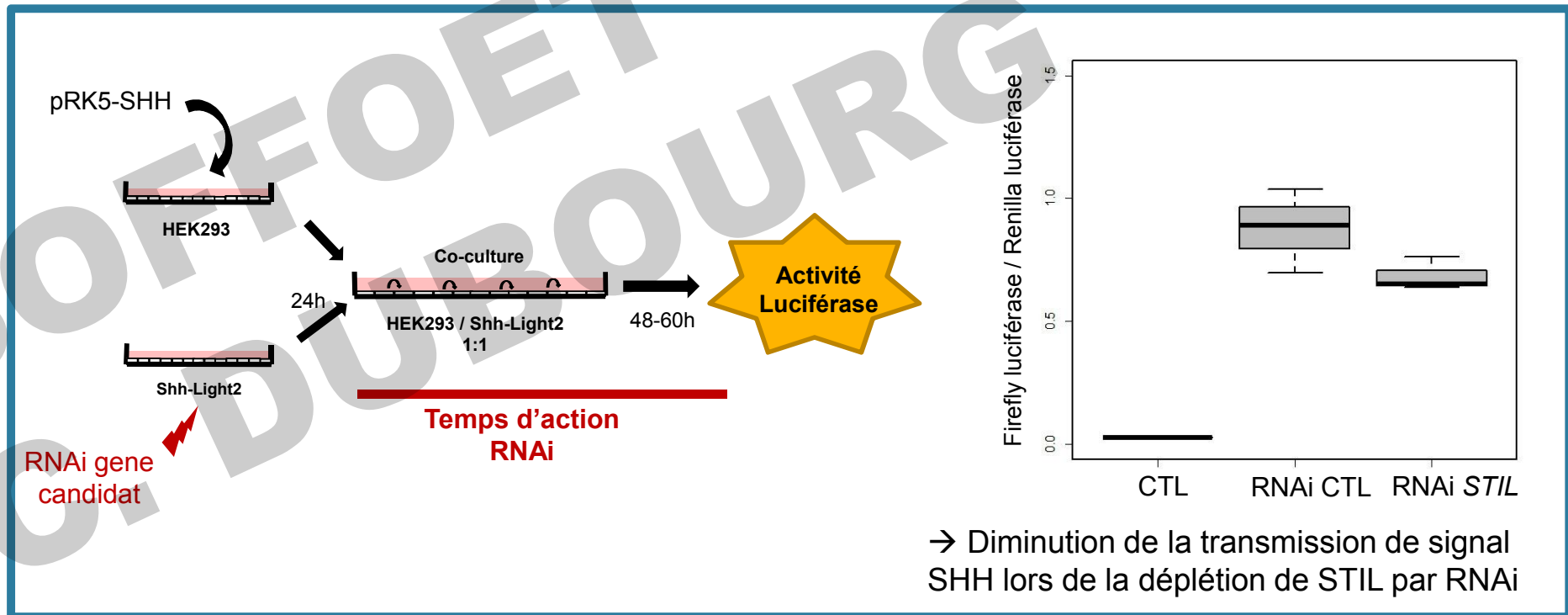
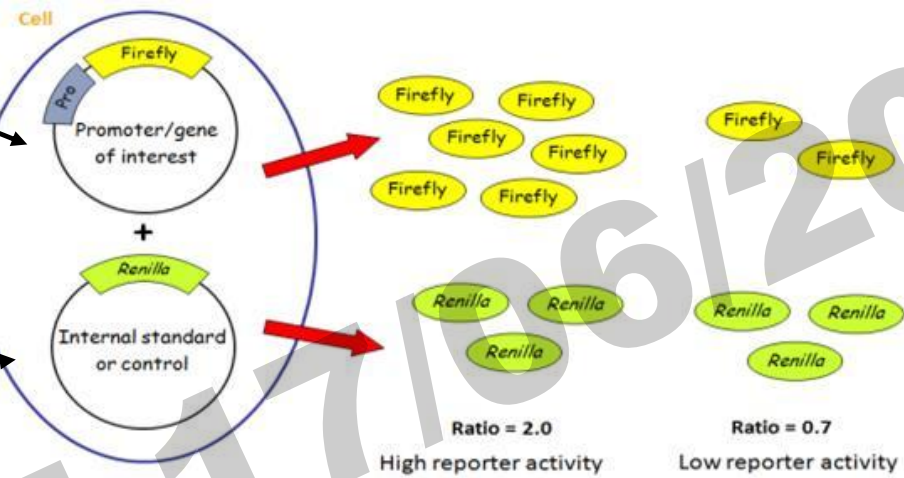


SOFFOET 17/06/2016
C. DUBOURG

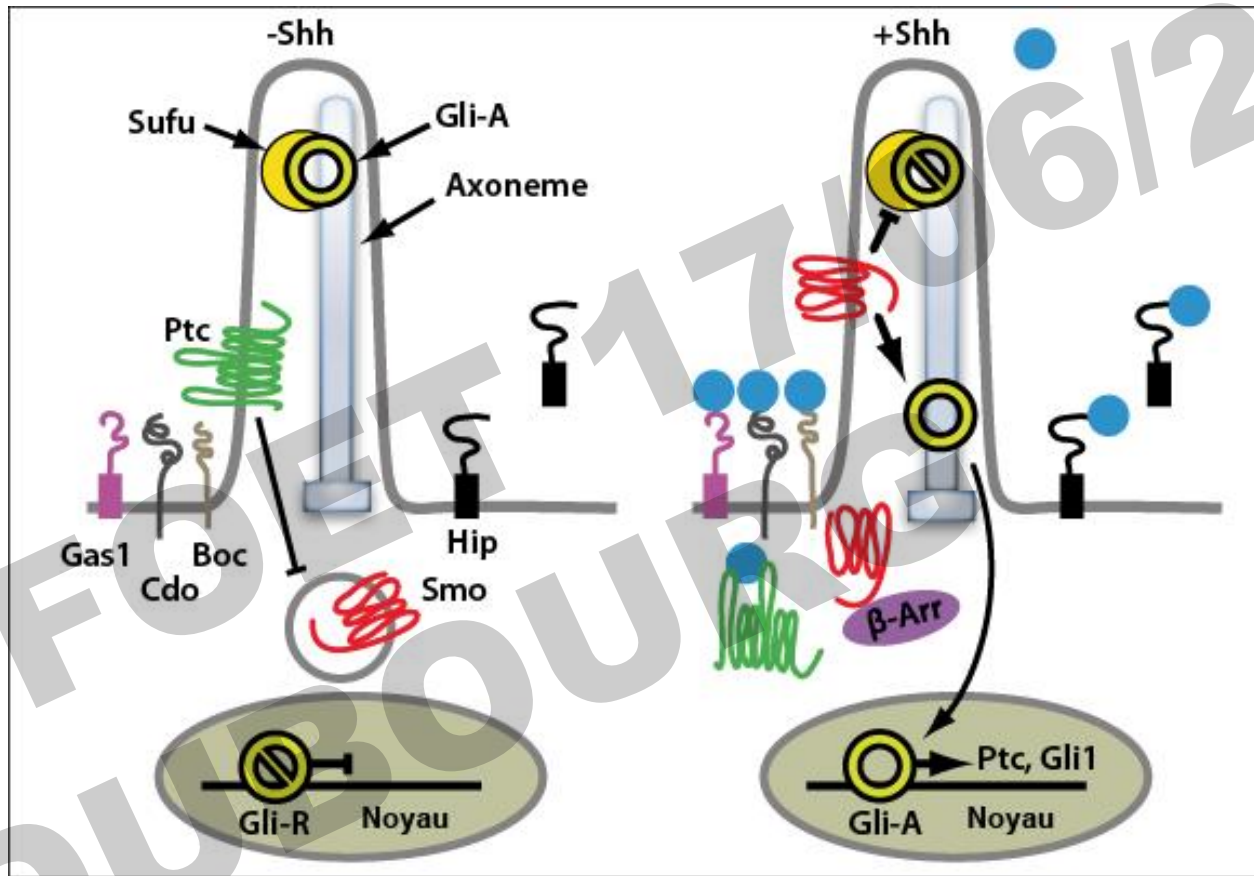
Test cellulaire (Shh-Light2)

8 X Gli Responding Elements in an enhancer region (pGL3 Luciferase)

(pRL-SV40-Renilla)



	Alobar	Semilobar	Lobar	MIHV*	Microform
Interhemispheric separation	Complete or near-complete nonseparation, with absent falx cerebri	No anterior separation, some posterior separation	Nonseparation of only the most rostral/ventral frontal neocortex, with hypoplastic falx cerebri	Nonseparation of posterior frontal and parietal lobes	No interhemispheric fusion
Corpus callosal characteristics	Absent corpus callosum	Absent anterior corpus callosum	Absent corpus callosum in affected region	Absent body of the corpus callosum	May have subtle defects
Additional findings	Absent olfactory bulbs, fused deep gray nuclei, and single midline monoventricle	Absent or hypoplastic olfactory bulbs, fused deep gray nuclei, and absent anterior horns of lateral ventricles and septum pellucidum	Hypoplastic olfactory bulbs, hypoplastic falx cerebri, and azygous anterior cerebral artery	Frequent fusion of thalami and caudate nuclei, Gray matter heterotopias, cortical dysplasia, and Azygous anterior cerebral artery	May have subtle midline brain defects



Ruat et al, M/S n°11, vol. 27, nov 2011

Mutations *FGFR1*

