

Université de Limoges
Faculté de Médecine

Année 2016

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'état de docteur en Médecine

présentée et soutenue publiquement
le 11 octobre 2016
par

Mélanie MARTIN

née le 2 octobre 1984, à Toulon

**Intérêt de la MLPA dans la stratégie de diagnostic génétique des
troubles du spectre autistique**

Examineurs de la thèse :

M^{me} le Professeur Catherine YARDIN

Président

M^{me} le Professeur Sylvie ROGEZ

Juge

M. le Professeur Thierry LAVABRE-BERTRAND

Juge

M^{me} le docteur Sylvie BOURTHOUMIEU

Juge

M^{me} le docteur Clothilde THUILLIER

Membre invité





Université de Limoges
Faculté de Médecine

Année 2016

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'état de docteur en Médecine

présentée et soutenue publiquement

le 11 octobre 2016

par

Mélanie MARTIN

né(e) le 2 octobre 1984, à Toulon

**Intérêt de la MLPA dans la stratégie de diagnostic génétique des
troubles du spectre autistique**

Examineurs de la thèse :

M^{me} le Professeur Catherine YARDIN

M^{me} le Professeur Sylvie ROGEZ

M. le Professeur Thierry LAVABRE-BERTRAND

M^{me} le docteur Sylvie BOURTHOUMIEU

M^{me} le docteur Clothilde THUILLIER

Président

Juge

Juge

Juge

Membre invité



Professeurs des Universités - praticiens hospitaliers

ABOYANS Victor	CARDIOLOGIE
ACHARD Jean-Michel	PHYSIOLOGIE
ALAIN Sophie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
ALDIGIER Jean-Claude	NEPHROLOGIE
ARCHAMBEAUD Françoise	MEDECINE INTERNE
ARNAUD Jean-Paul	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et TRAUMATOLOGIQUE
AUBARD Yves	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
AUBRY Karine	O.R.L.
BEDANE Christophe	DERMATO-VENEREOLOGIE
BERTIN Philippe	THERAPEUTIQUE
BESSEDE Jean-Pierre	O.R.L.
BORDESSOULE Dominique	HEMATOLOGIE
CAIRE François	NEUROCHIRURGIE
CHARISSOUX Jean-Louis	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et TRAUMATOLOGIQUE
CLAVERE Pierre	RADIOTHERAPIE
CLEMENT Jean-Pierre	PSYCHIATRIE d'ADULTES
COGNE Michel	IMMUNOLOGIE
CORNU Elisabeth	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
COURATIER Philippe	NEUROLOGIE
DANTOINE Thierry	GERIATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT
DARDE Marie-Laure	PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE
DAVIET Jean-Christophe	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
DESCAZEAUD Aurélien	UROLOGIE

DES GUETZ Gaëtan	CANCEROLOGIE
DESSPORT Jean-Claude	NUTRITION
DRUET-CABANAC Michel	MEDECINE et SANTE au TRAVAIL
DUMAS Jean-Philippe	UROLOGIE
DURAND-FONTANIER Sylvaine	ANATOMIE (CHIRURGIE DIGESTIVE)
ESSIG Marie	NEPHROLOGIE
FAUCHAIS Anne-Laure	MEDECINE INTERNE
FEUILLARD Jean	HEMATOLOGIE
FOURCADE Laurent	CHIRURGIE INFANTILE
GAINANT Alain	CHIRURGIE DIGESTIVE
GUIGONIS Vincent	PEDIATRIE
JACCARD Arnaud	HEMATOLOGIE
JAUBERTEAU-MARCHAN M. Odile	IMMUNOLOGIE
LABROUSSE François	ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
LACROIX Philippe	MEDECINE VASCULAIRE
LAROCHE Marie-Laure	PHARMACOLOGIE CLINIQUE
LIENHARDT-ROUSSIE Anne	PEDIATRIE
LOUSTAUD-RATTI Véronique	HEPATOLOGIE
MABIT Christian	ANATOMIE
MAGY Laurent	NEUROLOGIE
MARQUET Pierre	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE
MATHONNET Muriel	CHIRURGIE DIGESTIVE
MELLONI Boris	PNEUMOLOGIE
MOHTY Dania	CARDIOLOGIE
MONTEIL Jacques	BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE
MOREAU Jean-Jacques	NEUROCHIRURGIE

MOUNAYER Charbel	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
NATHAN-DENIZOT Nathalie	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
NUBUKPO Philippe	ADDICTOLOGIE
PARAF François	MEDECINE LEGALE et DROIT de la SANTE
PLOY Marie-Cécile	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
PREUX Pierre-Marie	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
ROBERT Pierre-Yves	OPHTALMOLOGIE
SALLE Jean-Yves	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
SAUTEREAU Denis	GASTRO-ENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE
STURTZ Franck	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
TEISSIER-CLEMENT Marie-Pierre	ENDOCRINOLOGIE, DIABETE et MALADIES METABOLIQUES
TREVES Richard	RHUMATOLOGIE
TUBIANA-MATHIEU Nicole	CANCEROLOGIE
VALLEIX Denis	ANATOMIE
VERGNENEGRE Alain	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
VERGNE-SALLE Pascale	THERAPEUTIQUE
VIGNON Philippe	REANIMATION
VINCENT François	PHYSIOLOGIE
VIROT Patrice	CARDIOLOGIE
WEINBRECK Pierre	MALADIES INFECTIEUSES
YARDIN Catherine	CYTOLOGIE et HISTOLOGIE

PROFESSEUR ASSOCIE DES UNIVERSITES A MI-TEMPS DES DISCIPLINES MEDICALES

BRIE Joël	CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE ET STOMATOLOGIE
------------------	---

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

AJZENBERG Daniel	PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE
BARRAUD Olivier	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
BOURTHOUMIEU Sylvie	CYTOLOGIE et HISTOLOGIE
BOUTEILLE Bernard	PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE
CHABLE Hélène	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
DURAND Karine	BIOLOGIE CELLULAIRE
ESCLAIRE Françoise	BIOLOGIE CELLULAIRE
HANTZ Sébastien	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
JESUS Pierre	NUTRITION
LE GUYADER Alexandre	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
LIA Anne-Sophie	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
MARIN Benoît	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
MURAT Jean-Benjamin	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE
QUELVEN-BERTIN Isabelle	BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE
RIZZO David	HEMATOLOGIE
TCHALLA Achille	GERIATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT
TERRO Faraj	BIOLOGIE CELLULAIRE
WOILLARD Jean-Baptiste	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE

P.R.A.G.

GAUTIER Sylvie	P.R.A.G. ANGLAIS
-----------------------	---------------------

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

BUCHON Daniel

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS DE MEDECINE GENERALE

DUMOITIER Nathalie MEDECINE GENERALE

PREVOST Martine MEDECINE GENERALE

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS

MENARD Dominique MEDECINE GENERALE

PAUTOUT-GUILLAUME Marie-Paule MEDECINE GENERALE

PROFESSEURS EMERITES

ADENIS Jean-Paul du 01.09.2015 au 31.08.2017

MERLE Louis du 01.09.2015 au 31.08.2017

MOULIES Dominique du 01.09.2015 au 31.08.2017

VALLAT Jean-Michel du 01.09.2014 au 31.08.2017

Le 1^{er} septembre 2015

Assistants Hospitaliers Universitaires – Chefs de Clinique

Le 1^{er} novembre 2015

ASSISTANTS HOSPITALIERS UNIVERSITAIRES

BLANC Philippe	BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE
CHUFFART Etienne	ANATOMIE
DONISANU Adriana	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
FAYE Piere-Antoine	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
FREDON Fabien	ANATOMIE
KASPAR Claire	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
MANCIA Claire	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
MATHIEU Pierre-Alain	ANATOMIE (Service d'Orthopédie-Traumatologie)
LOMBEL Guillaume	IMMUNOLOGIE
SERENA Claire	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION

CHEFS DE CLINIQUE - ASSISTANTS DES HOPITAUX

ARDOUIN Elodie	RHUMATOLOGIE
ASSIKAR Sfaë	DERMATO-VENEREOLOGIE
BIANCHI Laurent	GASTROENTEROLOGIE (A compter du 12 novembre 2015)
BORDES Jérémie	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
BOURMAULT Loïc	OPHTALMOLOGIE
BUISSON Géraldine	PEDOPSYCHIATRIE
CASSON-MASSELIN Mathilde	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
CAZAVET Alexandre	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
CHAPELLAS Catherine	REANIMATION
CHATAINIER Pauline	NEUROLOGIE
CHRISTOU Niki	CHIRURGIE DIGESTIVE

COSTE-MAZEAU Perrine	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE (Surnombre du 1er novembre 2015 au 20 février 2016)
CYPIERRE Anne	MEDECINE INTERNE A
DAIX Thomas	REANIMATION
DIJOUX Pierrick	CHIRURGIE INFANTILE
DOST Laura	OPHTALMOLOGIE
EVENO Claire	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
GANTOIS Clément	NEUROCHIRURGIE
GARDIC Solène	UROLOGIE
GONZALEZ Céline	REANIMATION
GSCHWIND Marion	MEDECINE INTERNE B
HOUMAÏDA Hassane	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE (A compter du 02 novembre 2015)
JACQUES Jérémie	GASTRO-ENTEROLOGIE
KENNEL Céline	HEMATOLOGIE
LACORRE Aymeline	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
LAFON Thomas	MEDECINE d'URGENCE
LAVIGNE Benjamin	PSYCHIATRIE d'ADULTES
LE BIVIC Louis	CARDIOLOGIE
LE COUSTUMIER Eve	MALADIES INFECTIEUSES
LEGROS Emilie	PSYCHIATRIE d'ADULTES
LERAT Justine	O.R.L.
MARTIN Sylvain	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
MATT Morgan	MALADIES INFECTIEUSES
MESNARD Chrystelle	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
MONTCUQUET Alexis	NEUROLOGIE

PAPON Arnaud	GERIATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT
PETITALOT Vincent	CARDIOLOGIE
PONTHIER Laure	PEDIATRIE
ROGER Thomas	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et TRAUMATOLOGIQUE
SAINT PAUL Aude	PNEUMOLOGIE
SCOMPARIN Aurélie	O.R.L.
TAÏBI Abdelkader	CANCEROLOGIE
TRIGOLET Marine	PEDIATRIE

CHEF DE CLINIQUE – MEDECINE GENERALE

RUDELLE Karen

CHEF DE CLINIQUE ASSOCIE – MEDECINE GENERALE

(du 1er novembre 2015 au 31 octobre 2016)

LAUCHET Nadège

PRATICIEN HOSPITALIER UNIVERSITAIRE

BALLOUHEY Quentin
CHIRURGIE INFANTILE
(du 1er mai 2015 au 30 avril 2019)

CROS Jérôme
ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
(du 1^{er} mai 2014 au 31 octobre 2018)

Remerciements

Madame le Professeur Catherine YARDIN,

Vous m'avez accueillie dans votre laboratoire pendant un an. Vous me faites aujourd'hui l'honneur de présider ce jury, veuillez trouver ici l'expression de ma profonde et respectueuse reconnaissance.

Madame le Docteur Sylvie BOURTHOUMIEU,

Vous m'avez fait l'honneur de diriger ce travail. Pour votre disponibilité, votre aide, vos conseils, veuillez trouver ici l'expression de ma plus sincère reconnaissance.

Madame le Professeur Sylvie ROGEZ,

Vous me faites l'honneur de juger ce travail, veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

Monsieur le Professeur Thierry LAVABRE-BERTRAND,

Vous m'avez accueillie dans votre laboratoire ce semestre. Vous me faites aujourd'hui l'honneur de juger ce travail, veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect et de ma reconnaissance.

Madame le Docteur Clothilde THUILLIER,

Vous avez accepté de juger ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de ma sincère gratitude.

A ma famille, mes amis, mes collègues

A tout ceux qui m'ont soutenue et ont participé à égayer mon parcours.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Introduction	19
I. L'autisme	19
II. Génétique des TSA.....	21
II.1. Les TSA syndromiques	21
II.2. Les TSA idiopathiques.....	23
II.2.1. Les anomalies chromosomiques	23
II.2.2. Les variations du nombre de copies (CNV)	24
II.2.3. Les mutations ponctuelles.....	26
II.2.4. Les formes oligogéniques ou polygéniques.....	27
III. Stratégie diagnostique	28
III.1. Etude d'un seul gène/une seule région pour les TSA syndromiques	28
III.2. Démarche pour les TSA idiopathiques.....	29
III.2.1. Recherche d'anomalies chromosomiques.....	29
III.2.2. Recherche de variations du nombre de copies (CNV).....	29
III.2.3. Analyse de panels de gènes ciblés	29
III.2.4. Séquençage de l'exome entier (<i>Whole Exome Sequencing</i> , WES).....	30
III.2.5. Séquençage du génome entier (<i>Whole Genome Sequencing</i> , WGS)	30
III.2.6. Synthèse des rendements diagnostiques des différents examens	31
IV. Objectif	31
Matériel et Méthodes	32
I. Cohorte de patients.....	32
I.1. Patients à analyser.....	32
I.2. Patients contrôles.....	32
II. La MLPA.....	32
II.1. Description de la technique de MLPA	32
II.2. Evaluation des performances de la MLPA	34
III. Techniques de confirmation	35
III.1. FISH.....	35
III.2. ACPA	35
Résultats	36
I. CNVs identifiés dans notre cohorte.....	36
II. Performances de la MLPA	41
Discussion.....	42
I. Corrélation génotype-phénotype	42
I.1. Région 15q11-q13.....	42
I.1.1. Prévalence et mécanisme de formation des CNVs	42
I.1.2. Duplications BP2-BP3 et BP2-BP4	43
I.1.3. Délétions BP3-BP4	45
I.1.4. Délétions et duplications BP4-BP5.....	46
I.2. Région 16p11.2.....	49
I.3. Gène <i>SHANK3</i> en 22q13.3.....	54
II. Intérêt et inconvénient de la MLPA : démarche diagnostique.....	56
Conclusion	58
Références bibliographiques	59

Annexes	63
Serment d'Hippocrate.....	70

Table des illustrations

Figure 1 : Les différents aspects du phénotype dans les troubles du spectre autistique [1] ..	19
Figure 2 : Architecture génétique des TSA, adapté d'après les travaux de Devlin et coll. [1]	20
Figure 3 : Modèle de stratégie d'évaluation génétique des TSA dans la pratique clinique [6]	28
Figure 4 : Principe de la réaction de MLPA.....	33
Figure 5 : Localisation des CNVs identifiés en 15q11-q13 chez les patients de notre cohorte.	42
Figure 6 : Localisation des CNVs identifiés en 16p11.2 chez les patients de notre cohorte. .	49

Table des tableaux

Tableau 1 : Les TSA syndromiques : prévalence des TSA dans les différents syndromes [6], gène(s) et chromosome(s) impliqué(s). Adapté d'après les travaux de Jiang et coll. et Schaefer et coll. [6] [7].....	22
Tableau 2 : CNVs « hot spots » dans les TSA [7].....	25
Tableau 3 : Fréquence des régions/gènes les plus souvent impliqués dans les TSA. Adapté d'après les travaux de Devlin et coll. [1]	26
Tableau 4 : Evaluation des performances d'un examen	34
Tableau 5 : Caractéristiques cliniques des patients présentant un TSA et chez qui un CNV a été identifié en MLPA, kit P343- <i>Autism1</i>	37
Tableau 6 : examens cytogénétiques réalisés chez les patients présentant un TSA et chez qui un CNV a été identifié en MLPA, kit P343- <i>Autism1</i>	39
Tableau 7 : Evaluation des performances de la MLPA, kit P343- <i>Autism1</i>	41

Liste des abréviations

ACPA : analyse chromosomique sur puce à ADN
ADI-R : guide d'entretien pour le diagnostic de l'autisme révisé
ADN : acide désoxyribonucléique
ADOS : échelle d'observation pour le diagnostic de l'autisme
ARN : acide ribonucléique
BAC : chromosome artificiel de bactérie
BP : *breakpoint*
CHRNA7 : *cholinergic receptor nicotinic alpha 7 subunit*
CIM-10 : classification internationale des maladies 10
CNV : variation du nombre de copies
DI : déficience intellectuelle
DSM : Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux
EEG : électro-encéphalogramme
KB : kilobases
FISH : hybridation *in situ* fluorescente
FMR1 : *fragile X mental retardation 1*
IRM : imagerie par résonance magnétique
LCR : *low copy repeats*, segments répétés présents en faible nombre de copies
MECP2 : methyl-CpG binding protein 2
NGS : séquençage de nouvelle génération
PCR : réaction de polymérisation en chaîne
PTEN : *phosphatase and tensin homolog*
PW/A : Prader-Willi/Angelman
SHANK3 : *SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3*
SNP : *single nucleotide polymorphism*
SNV : *single nucleotide variation*
TDAH : trouble déficitaire de l'attention avec ou sans hyperactivité
TSA : trouble du spectre autistique
UBE3A : ubiquitin protein ligase E3A
WES : Whole exome sequencing
WGS : Whole genome sequencing

Introduction

I. L'autisme

L'autisme est un trouble du développement caractérisé par des perturbations dans les domaines des interactions sociales réciproques, de la communication et par des comportements, intérêts et activités au caractère restreint, répétitif et stéréotypé [1].

Dans le Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (DSM-IV) et la classification internationale des maladies (CIM-10), l'autisme est classé dans les troubles envahissants du développement, insistant sur le début précoce de la triade : altération des interactions sociales, de la communication et activités et comportements restreints, répétitifs et stéréotypés [1]. Dans la dernière révision du DSM datant de 2013 (DSM-V), le terme de « troubles du spectre autistique » (TSA) a été adopté, sans définition de sous-groupes [1]. En effet, la distinction en sous-groupes établie auparavant (trouble autistique – ou autisme-, trouble désintégratif de l'enfance, troubles envahissants du développement non spécifiés et syndrome d'Asperger) n'a pas révélé de différences concernant l'étiologie ou l'évolution du développement [2].

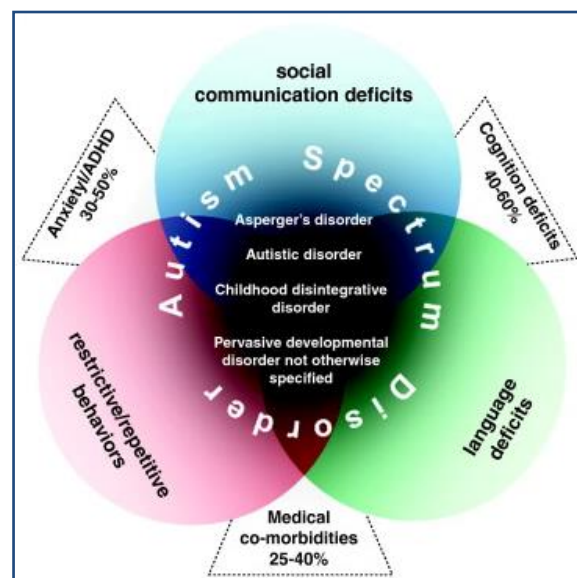


Figure 1 : Les différents aspects du phénotype dans les troubles du spectre autistique [1]

Aujourd'hui, la prévalence moyenne de l'autisme dans le monde entier est de 0,62 à 0,70 %, bien que la dernière étude à grande échelle l'ait estimée à 1-2 % [2]. Chez les adultes seuls, une prévalence similaire a été rapportée. Environ 45 % des individus avec autisme ont également une déficience intellectuelle (DI) et 32 % présentent une régression psychomotrice [2]. Les études de populations à grande échelle montrent que les hommes sont affectés 2 à 3 fois plus souvent que les femmes, et ce de façon probablement indépendante de la présence d'une déficience intellectuelle associée.

Le diagnostic de l'autisme est clinique. L'identification précoce du diagnostic permet une prise en charge précoce [2]. Le plus souvent, le diagnostic peut être établi à partir de l'âge de 2 ans, d'après le caractère atypique du développement chez ces enfants [2][3].

Les études de familles indiquent que la susceptibilité aux TSA a une base génétique importante, avec des facteurs génétiques complexes [1]. La présence d'une forte agrégation familiale dans les TSA pourrait être due à des facteurs génétiques prédominants, ou à la fois des facteurs génétiques et environnementaux, mais ne peut s'expliquer uniquement par des facteurs environnementaux [1]. Les études épidémiologiques de concordance de jumeaux (de même sexe) avec TSA sont en faveur d'une explication génétique prédominante, avec une héritabilité d'au moins 90 % selon un modèle multifactoriel à seuil [1]. Cette héritabilité intervient dans un contexte de facteurs de risque environnementaux et d'interactions gènes-environnement [2]. Les mécanismes épigénétiques et les interactions entre les facteurs génétiques et environnementaux sont importants mais encore peu étudiés [2].

L'architecture génétique de l'autisme est complexe et hétérogène (figure 2), comme l'ont démontré les études cytogénétiques, études de liaison, études d'association, et études pangénomiques de liaison ou d'association [2]. De nombreux variants génétiques liés à l'autisme sont hautement pléiotropes, c'est-à-dire que des variants au niveau d'un même gène sont responsables de plusieurs phénotypes différents [2]. Par ailleurs, une grande hétérogénéité de *loci* a été rapportée. Plus d'un millier de gènes pourraient être impliqués [4]. Le type de mutation impliqué est variable. Les mutations rares ayant un effet fort jouent un rôle ; mais aussi les variations communes avec un effet plus faible [2]. Les mutations rares (fréquence de l'allèle mineur < 5 % en population générale) sont fréquemment identifiées dans l'autisme [2]. Elles peuvent correspondre à des syndromes génétiques de transmission Mendélienne (ainsi appelés « autisme syndromique »), présents chez environ 5 à 10 % des individus autistes [2] [4] ; des anomalies chromosomiques chez environ 3 % des patients [2] ; des variations du nombre de copies (CNVs) rares (c'est-à-dire dont la fréquence est inférieure à 1 %) dans 5 à 10 % des cas, *de novo* ou héritées, en particulier affectant des gènes impliqués dans la fonction synaptique [1] ; des mutations ponctuelles héritées ou *de novo* (*single nucleotide variation*, SNV) identifiées grâce au séquençage de l'exome [1].

Les TSA peuvent également se retrouver dans des maladies mitochondriales et la phénylcétonurie, étiologies qui ne seront pas détaillées ici.

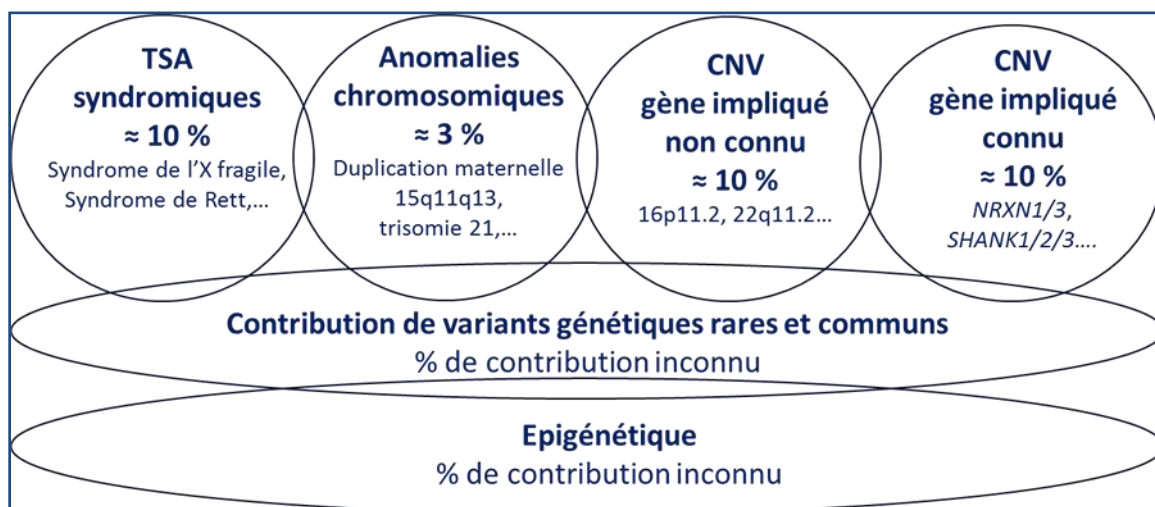


Figure 2 : Architecture génétique des TSA, adapté d'après les travaux de Devlin et coll. [1]

II. Génétique des TSA

II.1. Les TSA syndromiques

Les TSA sont appelés « syndromiques » lorsque le diagnostic autistique fait partie de la présentation clinique d'un syndrome génétique connu, ou « idiopathiques » si la cause n'est pas connue [5]. Environ 10 % des individus avec TSA présentent un TSA syndromique ou une pathologie Mendélienne identifiable (tableau 1) [1].

Ces formes d'autisme peuvent être causées par des mutations de l'ADN génomique, des expansions de répétitions de triplets, ou des anomalies cytogénétiques définies par le caryotype ou l'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) [5].

Le syndrome de l'X fragile (chez environ 1 à 2 % des individus avec TSA), la sclérose tubéreuse de Bourneville (environ 1 %), le syndrome de Rett (environ 0,5 %), et la neurofibromatose de type 1 (< 1 %) sont les causes de TSA syndromique les plus fréquemment citées [1].

D'autres syndromes microdélétionnels rares ou des pathologies monogéniques ont été associés avec les TSA, incluant les syndromes de Williams-Beuren, Sotos, Cowden, Moebius, Smith-Lemli-Opitz, et Timothy [1].

Tableau 1 : Les TSA syndromiques : prévalence des TSA dans les différents syndromes [6], gène(s) et chromosome(s) impliqué(s). Adapté d'après les travaux de Jiang et coll. et Schaefer et coll. [6] [7]

Syndromes	Prévalence des TSA	Gène(s) impliqué(s)	Chromosome(s)
Syndrome d'Angelman	34 %	<i>UBE3A</i>	15
Syndrome d'Angelman-like		<i>FOXG1</i>	14
Syndrome d'Angelman-like lié à l'X		<i>SLC9A6</i>	X
Pathologies liées à <i>ARX</i>		<i>ARX</i>	X
Syndrome CHARGE	30 %	<i>CHD7</i>	7
Syndrome de Cornelia de Lange	43 %	<i>NIPBL</i> <i>SMC1A</i> <i>SMC3</i>	5 X 10
Syndrome épilepsie focale et dysplasie corticale		<i>CNTNAP2</i>	7
Syndrome de Lesh-Nyhan		<i>HPRT1</i>	X
Pathologies associées à <i>MED12</i> (dont le syndrome de Lujan-Fryns)		<i>MED12</i>	X
Syndrome de Noonan	15 %	<i>SOS1</i>	2
		<i>RAF1</i>	7
		<i>BRAF</i>	7
		<i>KRAS</i>	12
		<i>MAP2K1</i>	15
Syndrome de Phelan-McDermid		<i>SHANK3</i>	22
Syndrome de Pitt-Hopkins		<i>TCF4</i>	18
Syndrome de Prader-Willi			15
Pathologies associées à <i>PTEN</i> (syndromes de Cowden, de Bannayan-Riley-Ruvalcaba)		<i>PTEN</i>	14
		<i>PTPN11</i>	12
Syndrome de Rett	Femmes : 61 %	<i>MECP2</i>	X
Syndrome Rett-like		<i>CDKL5</i>	5
Sclérose tubéreuse de Bourneville	36 %	<i>TSC1</i>	9
		<i>TSC2</i>	16
Syndrome de Smith-Lemli-Opitz		<i>DHCR7</i>	11
Syndrome de Smith-Magenis		<i>RAI</i>	17
Syndrome de Sotos		<i>NSD1</i>	5
Syndrome de Timothy		<i>CACNA1C</i>	12
Déficit en transporteur de la créatine lié à l'X		<i>SLC6A8</i>	X
Délétions 22q11.2 incluant le syndrome Vélo-cardio-facial (syndrome de Shprintzen)	11 %	<i>TBX1</i>	22
Syndrome de l'X fragile	≈ 20 %	<i>FMR1</i>	X
Syndrome de microdélétion 2q31		<i>MBD5</i>	2

Dans le cas des syndromes monogéniques, l'analyse du gène impliqué peut permettre d'établir plus rapidement le diagnostic étiologique, comme dans le syndrome de l'X fragile, les troubles du spectre de *MECP2* (*methyl-CpG binding protein 2*), et les troubles liés à *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*) [7].

Chez les garçons avec syndrome de l'X-fragile, un TSA est retrouvé chez environ 20 % d'entre eux lorsque des critères objectifs sont utilisés pour l'évaluation de la présence de TSA [7]. Des études récentes identifient le syndrome de l'X fragile chez 0,5 % des enfants avec TSA [7]. Aussi, chez tous les garçons avec TSA non expliqué, la recherche de mutation du gène *FMR1* doit être réalisée pour rechercher un syndrome de l'X fragile [7]. Dans la littérature, aucun patient de sexe féminin ne présentait de mutation du gène *FMR1* (*fragile X mental retardation 1*) parmi des cohortes non sélectionnées de patients avec TSA [7].

Les mutations dans le gène *MECP2* ont été identifiées initialement comme l'étiologie du syndrome de Rett [7]. D'autres phénotypes, comme les TSA idiopathiques, ont ensuite été décrits, élargissant le spectre des phénotypes secondaires aux mutations de *MECP2* [7]. Plusieurs études ont permis d'identifier des mutations de *MECP2* chez 4 % des filles avec TSA non syndromique [7]. Deux études ont mis en évidence la présence de TSA chez des garçons présentant une duplication de *MECP2*. Ces études s'appuient sur des échantillons de patients trop petits pour permettre d'établir la prévalence de ces anomalies chez les garçons [7]. Aussi, la recherche d'anomalie de *MECP2* n'est pas recommandée en routine chez les garçons, sauf en cas de signes cliniques caractéristiques de duplication de *MECP2* [7].

Les mutations de *PTEN* sont retrouvées chez 5 % des cohortes de patients avec TSA [7]. Dans la plupart de ces cohortes, les patients inclus n'étaient pas sélectionnés en fonction de la présence d'une macrocéphalie. Cependant, l'analyse rétrospective a montré qu'une macrocéphalie était présente chez tous les patients présentant des mutations dans ce gène [7]. L'analyse de *PTEN* est donc « réservée » pour les patients avec TSA et avec un périmètre crânien au-dessus du 98^{ème} percentile [7].

II.2. Les TSA idiopathiques

Les bases génétiques des TSA idiopathiques sont plus complexes, puisque dans la majorité des cas une cause génétique n'a pas été retrouvée, et chaque anomalie identifiée est responsable d'un petit pourcentage seulement de cas de TSA (3 % au maximum) [6].

II.2.1. Les anomalies chromosomiques

Le caryotype, à une résolution de 550 bandes par lot haploïde, permet de mettre en évidence des anomalies chromosomiques d'une taille au moins égale à 5 à 10 Mb [8]. Il permet d'identifier des réarrangements chromosomiques chez environ 5 % des individus avec TSA [1]. Les grands réarrangements chromosomiques déséquilibrés sont retrouvés plus fréquemment lorsque l'individu présente une dysmorphologie associée [1]. L'anomalie cytogénétique la plus fréquente, identifiée chez 1 à 3 % des individus avec TSA, est la duplication 15q11-q13 de la région des syndromes de Prader-Willi et Angelman (PW/A). Des aneuploïdies peuvent être retrouvées chez les individus avec TSA, comme la trisomie 21, le syndrome de Turner, le syndrome de Klinefelter et le syndrome 47, XYY [1].

II.2.2. Les variations du nombre de copies (CNV)

Le développement de l'analyse chromosomique sur puce à ADN (ACPA) il y a une dizaine d'années a permis d'identifier une nouvelle classe de variants génétiques. Ces variants impliquent des segments de plus petite taille que les anomalies chromosomiques identifiables par le caryotype, mais de plus grande taille que les variations nucléotidiques identifiables par le séquençage Sanger. Ces variants structuraux submicroscopiques correspondent à des régions génomiques d'au moins 50 kilobases (kb) présentes en nombre variable dans le génome (une, trois ou quatre copies) en comparaison à un génome de référence. Pour cette raison, ils ont été appelés « variations du nombre de copies » (CNV) [9].

Bien que le terme de CNV soit relativement nouveau, l'impact du dosage chromosomique, c'est à dire des duplications et délétions, dans les TSA et d'autres troubles neuro-développementaux est reconnu depuis longtemps [6].

Dans une revue de la littérature incluant plus de 20 000 patients, le consortium de l'ISCA (*International Standards For Cytogenomic Arrays*) montrait que l'ACPA permettait un rendement diagnostique de 15-20 %, contre 3 % pour l'analyse chromosomique chez les patients avec TSA idiopathique ou déficience intellectuelle (DI) [6]. Ces découvertes confirment l'intérêt de l'application clinique de l'analyse du nombre de copies chez les individus avec TSA, comme examen moléculaire de première intention dans l'évaluation génétique clinique des TSA [6]. Dans les études de TSA idiopathiques, le CNV récurrent le plus commun, retrouvé chez environ 0,8 % des patients, est localisé en 16p11.2 (environ 600 kb) [1]. Le tableau 2 liste les CNVs « *hot spots* » connus dans les TSA [7].

Les CNVs peuvent impliquer un seul gène et agir plutôt comme des mutations au niveau de la séquence nucléotidique, ou comprendre plusieurs gènes et agir comme un désordre génomique [1]. Il est probable que la pénétrance pour les TSA soit différente d'un CNV à l'autre, selon la fonction des gènes impliqués et leur sensibilité au dosage génique [1]. Certains CNVs impliquent des régions haploinsuffisantes, ou agissent de façon dominante, certains même avec une pénétrance complète ; ils seront typiquement *de novo*, entraîneront un phénotype de TSA plus sévère, et seront plus fréquents chez les individus avec TSA sporadique (par exemple la délétion récurrente BP4-BP5 en 16p11.2) [1][5]. D'autres CNVs ont des effets légers ou modérés, par exemple des CNVs hérités ; ils pourraient agir en augmentant le risque de TSA ou même suivre un mécanisme quasi-récessif, en association avec un polymorphisme rare sur l'autre allèle [5]. Certains CNVs nécessitent probablement d'autres facteurs génétiques ou non génétiques pour que le phénotype dépasse le seuil de TSA [1]. Ces CNVs peuvent être à l'origine d'une expression phénotypique variable, sont retrouvés dans d'autres pathologies, ou sont observés chez des apparentés sans TSA et chez certains individus de la population contrôle (par exemple les duplications de *CHRNA7*) [1]. Les mécanismes génétiques à l'origine des TSA semblent différents lorsqu'il s'agit de cas sporadiques ou familiaux de TSA. Les CNVs spécifiques d'une famille ont une pénétrance incomplète, et sont hérités d'un parent sans TSA apparent dans jusqu'à 40 % des cas [1].

Tableau 2 : CNVs « hot spots » dans les TSA [7]

Localisation chromosomique	Coordonnées génomiques	Délétion/duplication	Gène(s) candidat(s)
1p36.13	1 : 762 978 - 17 148 920	dup	non connu
1q21.1	1 : 145,0 - 146,4 Mb	dup	<i>HYDIN</i>
1q41	1 : 214 500 000 - 236 600 000	del	<i>MARK1</i>
2p16.3	2 : 50 145 642 - 51 259 673	del	<i>NRXN1</i>
2q31.1	2 : 93 300 000 - 243 199 373	del, dup	<i>SLC25A12</i>
2q37	2 : 231 972 946 - 231 989 823	del	<i>5-HTR2B</i>
3q24	3 : 142 984 063 - 143 567 372	del, dup	<i>SLC9A9</i>
5p15.1	5 : 9 623 122 - 9 624 122	del	non connu
7q11.23	7 : 72 200 000 (1,5 Mb)	dup	non connu
7q22.1	7 : 98 000 000 - 107 400 000	del	<i>RELN</i>
7q31.2	7 : 116 312 458 - 116 438 439	del, dup	<i>FOXP2, WNT2, MET</i>
7q35-q36	7 : 145 813 452 - 148 118 089	del	<i>EN2, CNTNAP2</i>
11q13.3-q13.4	11 : 70 313 960 - 70 935 807	del	<i>SHANK2</i>
13q14.2-q14.1	13 : 47 300 000 - 47 300 000	del	<i>5-HTR2A</i>
15q11-q13	15 : 20,7 - 26,7 (Mb)	dup	<i>UBE3A, SNRPN, CHRNA7</i>
15q13.3	15 : 28 736 917 - 30 686 830	del	<i>CHRNA7</i>
16p11.2	16 : 29,5 - 30,1 (Mb)	del, dup	non connu
16p13.11	16 : 15,5 - 16,5 (Mb)	del, dup	non connu
17p11.2	17 : 20 156 497 - 22 975 771	del, dup	non connu
17q11.2	17 : 24 000 000 - 31 800 000	del	<i>SLC6A4</i>
17q21.3	17 : 38 100 000 - 50 200 000	del, dup	<i>ITGB3</i>
18q21.1	18 : 47 793 251 - 47 808 143	del	<i>TCF4, MBD1</i>
22q11.2	22 : 19 744 225 (1,5 - 3 Mb)	del	<i>CRKL, FGF8, TBX1</i>
22q13.3	22 : 51 113 069 - 51 171 639	del	<i>SHANK3</i>
Xp22.31	X : 6 463 313 - 8 091 810	del, dup	<i>NLGN4</i>
Xq13.1	X : 70 364 680 - 70 391 050	del, dup	<i>NLGN3</i>
Xq28	X : 153 287 263 - 153 363 187	del	<i>MECP2</i>

II.2.3. Les mutations ponctuelles

La recherche de CNVs et le séquençage direct de gènes candidats permettent d'identifier rapidement des gènes candidats, qui feront l'objet d'une caractérisation plus précise de leur causalité dans les TSA. Ces approches ont impliqué les gènes *NLGN3*, *NLGN4*, *SHANK2*, *SHANK3*, *NRXN1* et *NRXN3*, *PTCHD1/PTCHD1AS*, *SHANK1*, *DPYD*, *ASTN2*, *DPP6*, *MBD5*, *CDH8* et *CNTNAP2* (parmi d'autres) comme des facteurs de risque de TSA. Certaines mutations rares, à pénétrance élevée, apparaissent suffisantes pour être des causes monogéniques de TSA [1]. Trois gènes sont concernés par des mutations non-sens récurrentes : *SCN2A*, *CHD8* et *KATNAL2* [1]. Les études récentes ont estimé qu'environ 3 à 10 % du risque de TSA est dû à des SNVs *de novo* après analyse de l'exome [10].

Tableau 3 : Fréquence des régions/gènes les plus souvent impliqués dans les TSA. Adapté d'après les travaux de Devlin et coll. [1]

Locus/gène	p-value (cas vs contrôles)	Fréquence chez 2120 TSA (hommes)
16p11.2	0,001	0,80 %
<i>PTCHD1/PTCHD1AS</i> en Xp22.11	0,038	0,5 % (0,6 %)
<i>NRXN1</i> en 2p16.3	0,011	0,40 %
7q11.23	0,06	0,20 %
22q11.2	0,214	0,20 %
1q21.1	0,723	0,20 %
15q13.3	0,03	0,20 %
15q11-q13	0,245	0,10 %
<i>SHANK2</i> en 11q13.3	0,245	0,10 %
<i>SHANK3</i> en 22q13.33	0,495	0,05 %
<i>NLGN3</i> en Xq13.1	1	0,05 % (0,06 %)
<i>NLGN4X</i> en Xp22.3	1	0,05 % (0,06 %)

II.2.4. Les formes oligogéniques ou polygéniques

Ces formes ne sont pas dues à une mutation d'un seul gène, mais plutôt à des variations de séquence nucléotidique dans plusieurs gènes. Chacun porterait un ou plusieurs polymorphismes fonctionnels largement distribués dans la population générale, conférant une protection ou une vulnérabilité à l'autisme [5]. La plupart de ces variants communs, présents à l'état isolé, n'auraient pas d'impact important sur le risque de développer un TSA (*odd ratio* < 1,2), mais confèreraient un petit pourcentage de variation phénotypique [1][5]. Jusqu'à 40 % des familles simplex et 60 % des familles multiplexes (chez lesquelles plusieurs individus sont autistes) pourraient présenter plusieurs polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP) qui, combinés, auraient un effet additif sur le risque d'autisme [2]. Ainsi, l'association variable de SNP communs pourrait contribuer à l'émergence de l'autisme, aux traits autistiques associés dans les familles (phénotype autistique dans un sens plus large), à l'incidence plus élevée d'autisme chez les enfants de parents ayant des traits autistiques plus importants, et à la présence des traits autistiques en population générale [2]. Un rôle important est joué ici par les interactions gène-gène et gène-environnement, de même que les effets possibles de l'épigénétique, potentialisant ou atténuant les effets de chaque variant dans le risque de TSA [5].

III. Stratégie diagnostique

Un diagnostic étiologique spécifique chez les personnes présentant un TSA est identifié dans 6 à 15 % des cas selon les études [7]. Ce taux est applicable pour l'évaluation des patients présentant un trouble envahissant du développement non spécifié, un autisme atypique, un syndrome d'Asperger, ou des caractéristiques autistiques qui n'entrent pas dans le cadre du diagnostic strict de troubles envahissants du développement selon les critères du DSM [7].

Les syndromes cliniquement identifiables, mais cependant subtils, représentent une catégorie de cause identifiable de TSA [7]. Aussi, une évaluation par un généticien clinique/dysmorphologiste est toujours une partie importante de l'évaluation pour déterminer si un individu avec TSA présente un TSA isolé ou syndromique/complexé [7].

Un modèle de stratégie d'évaluation génétique des patients avec TSA dans la pratique clinique est représenté dans la figure 3.

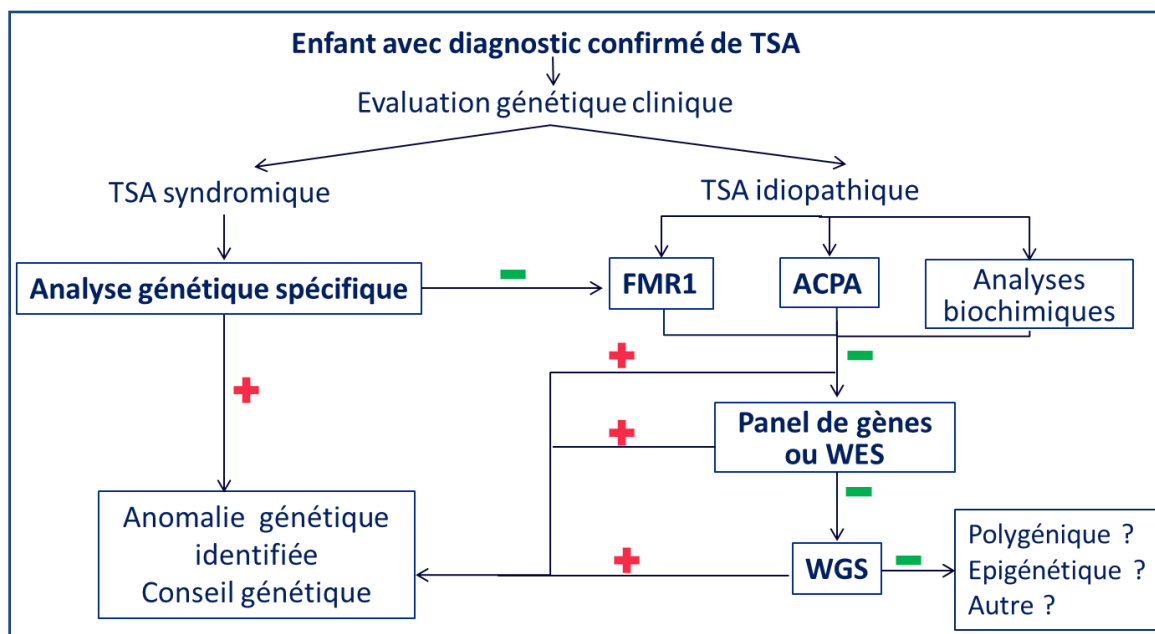


Figure 3 : Modèle de stratégie d'évaluation génétique des TSA dans la pratique clinique [6]
WES : *Whole Exome Sequencing* ; WGS : *Whole genome sequencing*

III.1. Etude d'un seul gène/une seule région pour les TSA syndromiques

Lorsque la présentation clinique d'un patient suggère fortement un TSA syndromique, l'approche la plus efficace est de rechercher l'anomalie dans le gène/la région responsable du syndrome suspecté [6]. De nombreux examens de diagnostic sont utilisés pour la recherche d'anomalie dans un(e) seul(e) gène/région, en fonction du type de mutation en cause habituellement retrouvé pour ce gène/cette région spécifique. Les méthodologies incluent le séquençage nucléotidique pour la recherche de mutations ponctuelles, la FISH ou la MLPA (amplification multiplexe dépendante de la ligation de sondes) pour la recherche de microdélétions/microduplications, le *Southern blot* pour l'identification d'expansions longues de répétitions, et la MLPA pour la recherche de petites délétions/duplications [6]. En

pratique, l'analyse par FISH a été progressivement remplacée par l'ACPA. Cependant, pour un syndrome microdélétionnel avec des caractéristiques cliniques bien définies, la FISH garde un intérêt grâce à son coût moins élevé en comparaison avec l'ACPA [6].

III.2. Démarche pour les TSA idiopathiques

III.2.1. Recherche d'anomalies chromosomiques

Les améliorations continues dans les approches cytogénétiques, incluant les études en haute résolution, ont augmenté le rendement diagnostique de la cytogénétique conventionnelle pour le diagnostic de TSA à approximativement 3 % [7]. L'avancée des modalités de diagnostic cytogénétique avec l'ACPA a augmenté la capacité diagnostique des évaluations génétiques [7]. Ces progrès ont été tellement importants que l'ACPA a largement remplacé la cytogénétique conventionnelle comme examen de 1^{ère} intention [7]. Pour cette raison, l'analyse chromosomique dans l'évaluation des patients avec TSA devrait maintenant être uniquement réservée à certaines exceptions, comme les aneuploïdies suspectées cliniquement (syndromes de Turner, Klinefelter, et Down), une histoire familiale ou un trouble de la reproduction faisant suspecter un réarrangement chromosomique [7].

III.2.2. Recherche de variations du nombre de copies (CNV)

La détection des CNVs est généralement réalisée grâce à l'ACPA, examen actuellement recommandé en 1^{ère} intention pour l'évaluation des TSA [5]. La fréquence estimée de CNVs cliniquement significatifs dans des populations non sélectionnées d'individus avec TSA est de 10 % [7]. Le rendement diagnostique de l'ACPA chez des patients avec TSA peut être amélioré grâce à l'utilisation de critères de sélection [7]. Ainsi, des taux plus élevés de CNVs sont identifiés chez des individus avec un TSA associé à une microcéphalie, une épilepsie, des anomalies congénitales, ou des caractéristiques dysmorphologiques (« TSA complexes ») [7]. La réalisation d'une ACPA chez des individus présentant un TSA complexe permet d'augmenter le taux de diagnostic à presque 30 % [7]. D'autre part, des taux plus élevés de CNVs sont aussi identifiés chez des individus avec TSA qui ont une histoire familiale de retard de développement ou de troubles psychiatriques [7].

III.2.3. Analyse de panels de gènes ciblés

Le *design* de panels de gènes ciblés consiste à sélectionner les gènes impliqués dans une pathologie avec une hétérogénéité génétique importante, ou ceux qui sont pertinents pour un phénotype clinique particulier [6]. Au niveau technique, l'analyse par séquençage de nouvelle génération (NGS) d'un nombre réduit de gènes ciblés, en comparaison au séquençage de l'exome entier, permet d'obtenir pour les gènes ciblés une plus grande profondeur de lecture, et ainsi une meilleure sensibilité et spécificité analytique. Cette approche est particulièrement intéressante pour les pathologies avec une hétérogénéité de *locus* importante, et dont le gène impliqué est difficile voire impossible à identifier d'après la seule présentation clinique. Dans le cas des TSA, l'hétérogénéité génétique extensive est bien reconnue, d'où l'intérêt de l'utilisation de panels de gènes [6]. Plusieurs panels de gènes liés à l'autisme sont proposés par les laboratoires de diagnostic moléculaire en

pratique clinique. Cette approche est une stratégie intéressante, jusqu'à ce que les techniques de séquençage de l'exome entier et du génome entier soient entièrement validées dans les TSA [6].

III.2.4. Séquençage de l'exome entier (*Whole Exome Sequencing, WES*)

L'application du séquençage de l'exome entier dans la pratique de génétique clinique a récemment pris de l'élan [6]. Actuellement, les indications pour l'utilisation du WES en tant qu'examen de diagnostic sont assez variables parmi les généticiens cliniques ou les médecins d'autres spécialités. Les patients présentant une déficience intellectuelle importante, une épilepsie, des anomalies congénitales multiples ou d'autres présentations cliniques inhabituelles sont typiquement de bons candidats pour le WES. Etant donné qu'un sous-groupe important d'individus avec TSA, en particulier des TSA sévères, présentent habituellement des comorbidités telles qu'une DI sévère, une épilepsie, et d'autres anomalies congénitales mineures, le WES en diagnostic clinique peut être indiqué dans ces cas, lorsque l'examen de première intention est négatif [6]. Il est difficile de déterminer la sensibilité exacte du WES en pratique clinique. Les résultats d'études de recherche récentes de WES/WGS dans les TSA ne peuvent pas être utilisés pour estimer la valeur prédictive du WES en pratique clinique, si les sujets de l'étude n'ont pas été sélectionnés de façon attentive, et si l'intérêt était l'identification de mutations *de novo* [6].

Le collège américain de génétique médicale (ACMG) a récemment publié un standard pour les laboratoires sur l'utilisation du WES en diagnostic clinique [6]. Plusieurs problèmes concernant le *design* expérimental et l'application clinique du WES dans les TSA nécessitent discussion. Le séquençage de trios (le cas index et ses 2 parents) est le *design* expérimental le plus courant dans la plupart des études de recherche en WES dans les TSA. Cependant, les laboratoires de diagnostic clinique ne sont pas tous d'accord concernant le séquençage systématique des parents d'emblée. Certains laboratoires séquent des trios alors que d'autres séquent uniquement le cas index, et poursuivent la validation chez les parents si nécessaire. L'avantage du séquençage du cas index seul est le coût moindre. Cependant, l'approche en trio permet d'obtenir une sensibilité plus élevée pour la détection des variants *de novo* [6]. Une des limites techniques du séquençage de l'exome entier est la difficulté technique de capture de certaines parties du génome. En conséquence, l'intégralité des exons codants ne peut pas être capturée. Différentes plateformes peuvent être utilisées pour l'étape d'enrichissement ou capture d'exons. Ces différences inhérentes entre les différents laboratoires peuvent ainsi contribuer aux différences observées dans la sensibilité ou le taux de réussite [6].

III.2.5. Séquençage du génome entier (*Whole Genome Sequencing, WGS*)

Des mutations qui apparaissent avoir une forte pénétrance ont aussi été identifiées dans des régions non géniques, de l'ARN non codant, suggérant l'utilité de la recherche de mutations au-delà de l'exome, c'est-à-dire au niveau du génome entier [11]. En comparaison au séquençage de l'exome entier, le séquençage du génome entier (WGS) offre de nombreux avantages, sauf en ce qui concerne le coût et la complexité de l'analyse des données [6]. Le WGS permet non seulement de couvrir les régions non codantes non couvertes par le séquençage de l'exome entier, mais également d'obtenir une meilleure couverture pour les

séquences codantes [6]. Le WGS permet ainsi d'augmenter le taux de détection des variants de séquence [11].

Seulement quelques études de WGS chez des individus avec TSA ont été rapportées jusqu'à maintenant [5]. A la différence des études de WES, la taille des échantillons évalués par WGS est relativement petite. Dans une étude, le WGS de 32 trios a permis de mettre en évidence des variants cliniquement pertinents chez 16 cas index [5]. Cette étude appuie la faisabilité de l'utilisation du WGS en tant qu'examen de diagnostic et valide l'amélioration de la sensibilité avec l'utilisation du WGS en comparaison au WES dans la détection des variants de séquence pathogènes [5].

Le WGS permet également la détection de CNVs à haute résolution, que les plateformes actuelles de puces d'hybridation génomique comparative ne sont actuellement pas capables de détecter [6]. Une étude montrait que 95,6 % des petits CNVs détectés par le WGS n'étaient pas détectés par l'ACPA sur micro-puces de haute résolution [11].

Ainsi, le WGS permet l'analyse la plus complète des variations génomiques : il peut détecter les SNVs, les petites insertions et délétions (indels), et les CNVs, et cela dans le génome entier (bien que la capacité à détecter les événements dans le génome ne soit pas uniforme mais basée sur la composition génomique locale) [11][12]. Le WGS devrait par conséquent être considéré comme la plateforme génomique de choix dans les études de TSA [11]. Son coût élevé et les difficultés d'interprétation des variants non géniques représentent des freins pour son application à grande échelle [11][12]. Dès que les coûts diminueront et que la gestion et l'analyse des données seront simplifiées, le WGS remplacera finalement le WES et l'ACPA pour l'évaluation génétique de routine [6].

III.2.6. Synthèse des rendements diagnostiques des différents examens

Concernant les examens utilisés dans l'évaluation génétique en routine des individus présentant un TSA, la littérature estime les rendements diagnostiques suivants [7] :

- Analyse chromosomique sur puce à ADN (ACPA) : 10 %
- Recherche de mutation de *PTEN* : 5 %
- Recherche de mutation de *MECP2* : 4 % des filles
- Caryotype : 3 %
- Recherche de syndrome de l' X-fragile : 0,5 %
- Autres : 10 % (causes génétiques mais aussi anomalies cérébrales identifiables, maladies métaboliques, et autres).

IV. Objectif

Les CNVs sont une cause importante de TSA, et ceux impliquant les régions 15q11-q13, 16p11.2 et 22q13.3 ont été rapportés comme les plus fréquents [13].

L'objectif de ce travail était, d'une part, d'étudier l'intérêt et le rendement diagnostique de la MLPA ciblant les régions 15q11-q13, 16p11.2 et 22q13.3 dans la stratégie de diagnostic génétique des troubles du spectre autistique ; d'autre part, de réaliser une corrélation génotype-phénotype des patients présentant un CNV au niveau des régions étudiées.

Matériel et Méthodes

I. Cohorte de patients

I.1. Patients à analyser

Les patients inclus à l'hôpital mère-enfant du CHU de Limoges entre le mois de janvier 2014 et le mois de février 2016 présentent un TSA défini selon les critères de la Classification Internationale des Maladies 10 (CIM-10) ou bien des caractéristiques autistiques sans diagnostic de TSA au sens strict. L'évaluation clinique des patients a été réalisée par deux pédiatres du CHU de Limoges, à l'aide du guide d'entretien pour le diagnostic de l'autisme révisé (ADI-R) et de l'échelle d'observation pour le diagnostic de l'autisme (ADOS). L'ADI-R et l'ADOS sont deux outils reconnus au niveau international pour l'évaluation du diagnostic de TSA. L'ADI-R permet de guider l'entretien avec les parents en ce qui concerne la description du développement précoce de l'enfant, afin de faciliter l'identification de signes caractéristiques de TSA. L'ADOS est une échelle permettant la standardisation de l'observation du comportement socio-communicatif de l'enfant, afin d'identifier la présence de perturbations de ce domaine.

Pour tous les patients prélevés, l'ADN a été extrait à partir des leucocytes sanguins grâce au kit ADN Flexigene (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. Les régions 15q11-q13, 16p11 et 22q13 ont été analysées grâce au kit de MLPA P343-*Autism-1* (MRC-Holland). En cas d'anomalie identifiée, les parents ont été demandés pour être analysés.

I.2. Patients contrôles

Trois patients chez qui un CNV au niveau des régions 15q13 et 16p11.2 avait été identifié préalablement en ACPA ou FISH ont servi de contrôles positifs. Il s'agit des patients 3, 6 (ou N), et 8 (ou Y), qui présentent respectivement une délétion de la région 15q13 (BP4-BP5), une délétion de la région 16p11.2, et une duplication de la région 16p11.2. Le patient B qui présente une délétion en 22q11.2, région non explorée par le kit de MLPA utilisé, a servi de contrôle négatif.

Au total, la MLPA avec le kit P343-*Autism1* a été réalisée chez 81 cas index, 14 apparentés et 4 patients qui ont servi de contrôles positif ou négatif.

II. La MLPA

II.1. Description de la technique de MLPA

La MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) est une technique moléculaire semi-quantitative permettant de détecter des variations du nombre de copies de *loci* génomiques ciblés en comparaison à un patient témoin. Elle repose sur une amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) multiplexe de paires de sondes hybridées au niveau de séquences cibles (figure 4).

Le kit de MLPA P343-*Autism1* (SALSA MLPA, MRC-Holland) permet d'étudier 40 *loci* répartis sur les régions 15q11-q13, 16p11.2 et 22q13.3 et 9 *loci* correspondant à des gènes de référence utilisés pour la normalisation.

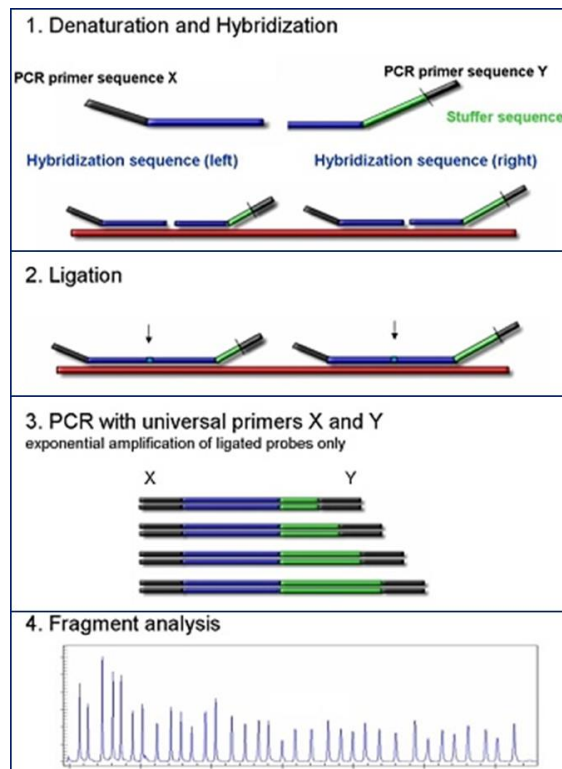


Figure 4 : Principe de la réaction de MLPA

Parmi les 40 paires de sondes amplifiées, 26 ciblent la région 15q11-q13, 11 ciblent la région 16p11.2 et 3 ciblent le gène *SHANK3* en 22q13.3.

La réaction de MLPA a été réalisée selon le protocole du fournisseur. Cent nanogrammes d'ADN génomique dilués dans 5 µl de tampon tris-EDTA (0,1 mM d'EDTA) ont été dénaturés à 98°C pendant 5 minutes. L'hybridation a été réalisée après ajout de 1,5 µl de mélange de sondes (SALSA MLPA kits P343-*Autism1*) et 1,5 µl de tampon d'hybridation (SALSA MLPA), puis incubation à 60°C pendant 16 à 20 heures. Pour chaque *locus* étudié, deux oligonucléotides s'hybrident de manière juxtaposée sur la séquence cible complémentaire. Ces sondes hybridées sont ensuite liguées. La ligation a été réalisée avec 1 µl de ligase (SALSA MLPA), 3 µl de tampon A (SALSA MLPA), 3 µl de tampon B (SALSA MLPA), 25 µl d'eau pour PCR, puis incubation à 54°C pendant 15 minutes, puis dénaturation et inactivation enzymatique à 98°C pendant 5 minutes. Les sondes liguées sont ensuite amplifiées par PCR en multiplexe en utilisant un seul couple d'amorces marqué en FAM (*carboxyfluorescein*). L'amplification a été réalisée en ajoutant 0,5 µl de polymérase (SALSA polymérase), 2 µl d'amorces de PCR (SALSA PCR *primer mix*) et 7,5 µl d'eau pour PCR, puis suivant 35 cycles de dénaturation - hybridation - élongation (95°C, 30 secondes - 60°C, 30 secondes - 72°C, 60 secondes) puis élongation finale à 72°C pendant 20 minutes. Chaque amplicon obtenu est caractérisé par une taille précise spécifique d'un *locus* donné. Les amplicons ont été séparés en fonction de leur taille par électrophorèse capillaire réalisée sur analyseur d'ADN ABI 3130XL (Applied Biosystems). Les données brutes ont été analysées grâce au logiciel GeneMapper (Applied Biosystems). Chaque pic de l'électrophorégramme obtenu représente l'intensité de l'amplification de chaque paire de sondes. A cause de la variabilité de l'efficacité de la réaction de PCR en fonction des sondes et des échantillons, une étape de normalisation est nécessaire avant de comparer l'intensité de l'amplification de chaque paire de sondes entre le patient et le(s) témoin(s), qui permettra de déterminer le nombre de copies du patient pour chaque *locus* étudié. Deux étapes

successives de normalisation des données sont réalisées avant de pouvoir déterminer le nombre de copies d'un patient pour chaque *locus* étudié. Une première étape de normalisation intra-échantillon : pour chaque patient, l'intensité (aire) de chaque pic d'intérêt est divisée par la somme de l'intensité (aire) des pics des sondes de référence. Une seconde étape de normalisation inter-échantillon : pour chaque pic d'intérêt, le ratio obtenu par normalisation intra-échantillon de chaque patient est divisé par la moyenne des ratios obtenus par normalisation intra-échantillon des échantillons de référence. En théorie, le résultat obtenu est égal à 1 lorsque le patient présente 2 copies du *locus* étudié. Il est égal à 0,5 lorsque le patient ne présente qu'une seule copie du *locus* étudié (délétion hétérozygote) et à 1,5 lorsque le patient présente trois copies du *locus* étudié (duplication hétérozygote). En pratique, un résultat compris entre 0,8 et 1,2 est interprété comme une absence de déséquilibre génomique pour le *locus* étudié. Une délétion hétérozygote est mise en évidence lorsque le résultat est compris entre 0,35 et 0,65 et une duplication hétérozygote lorsque le résultat est compris entre 1,35 et 1,55.

II.2. Evaluation des performances de la MLPA

Les performances d'un examen sont évaluées par comparaison des résultats de cet examen avec les résultats d'un examen de référence (*gold standard*). La sensibilité (se) est définie comme la proportion de patients positifs d'après l'examen évalué et réellement positifs d'après l'examen de référence, parmi l'ensemble des patients réellement positifs d'après l'examen de référence. La spécificité (sp) est définie comme la proportion de patients négatifs d'après l'examen évalué et réellement négatifs d'après l'examen de référence, parmi l'ensemble des patients réellement négatifs d'après l'examen de référence. La valeur prédictive positive (VPP) est la probabilité, lorsque l'examen évalué donne un résultat positif, que le résultat de l'examen de référence soit positif. La valeur prédictive négative (VPN) est la probabilité, lorsque l'examen évalué donne un résultat négatif, que le résultat de l'examen de référence soit négatif. Les formules sont mentionnées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Evaluation des performances d'un examen

	Positif d'après l'examen évalué	Négatif d'après l'examen évalué	
Positif d'après l'examen de référence	Vrai positif (VP)	Faux négatif (FN)	Se = $VP/(VP+FN)$
Négatif d'après l'examen de référence	Faux positif (FP)	Vrai négatif (VN)	Sp = $VN/(VN+FP)$
	VPP = $VP/(VP+FP)$	VPN = $VN/(FN+VN)$	

Quatre patients cités précédemment ont servi de contrôles positif et négatif. De plus, lorsque les patients à analyser en MLPA ont également été analysés en FISH ou ACPA, la comparaison des résultats obtenus par les différentes techniques a permis d'évaluer les performances de la MLPA. D'autre part, l'identification d'un CNV hérité permettait de valider l'identification du CNV chez un des deux parents (vrai positif) et l'absence de CNV chez l'autre parent (vrai négatif).

III. Techniques de confirmation

III.1. FISH

L'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) a été réalisée avec des sondes *locus* spécifique commerciales disponibles (Vysis) : *TBX1* et *TUPLE1* (22q11.2), *SHANK3* (22q13.3) et des BACs (BlueGnome) : RP11-106H13 (15q13.3) et RP11-504I2 (16p11.2). La FISH a été réalisée sur métaphases et sur noyaux interphasiques, à partir d'étalements de culots cellulaires fixés. Une co-dénaturation de l'ADN cible et des sondes a été réalisée à 73°C pendant 3 minutes, puis une hybridation des sondes à 37°C toute la nuit. Après hybridation, le marquage non spécifique a été éliminé par des lavages post-hybridation avec les solutions de lavage FISH (Agilent), et l'ADN a été contre-coloré avec 0,5 µg/ml de DAPI (4',6-Diamidino-2-Phénylindole Dihydrochloride). Les lames ont été observées au microscope à épifluorescence. En général, 20 métaphases ont été examinées, ainsi que 100 noyaux interphasiques pour déterminer le nombre de signaux présents pour chaque sonde.

III.2. ACPA

L'analyse chromosomique sur puce à ADN (ACPA) a été réalisée au CHU de Cochin, à Paris, sur des puces Agilent 8x60K (Agilent technologies) selon les recommandations du fournisseur. Ces puces contiennent 55 077 sondes d'intérêt réparties sur le génome et espacées en moyenne de 41 kb (33 kb pour les gènes de référence *Refseq*).

L'ADN génomique purifié du patient et de la référence sont fragmentés à 95°C pendant 10 minutes. Chaque ADN est ensuite marqué l'un en cyanine 5 et l'autre en cyanine 3. Ce marquage est réalisé par polymérisation et incorporation de désoxyuridine-tri-phosphate (dUTP) marquée en cyanine 5 ou 3, à partir d'amorces aléatoires. Les ADN marqués sont purifiés par précipitation avec du NaCl 5M et de l'isopropanol 100 %, puis co-hybridés avec de l'ADN humain cot-1 sur une lame de puce à ADN. Une étape d'hybridation à 65°C a lieu pendant 24 heures. Les lames sont ensuite lavées, puis scannées grâce à un scanner de puce à ADN Agilent (Agilent technologies). L'analyse des données et son interprétation est effectuée grâce aux logiciels Cytogenomics (Agilent technologies) et Cartagenia. L'algorithme utilisé pour la détection des CNV est la méthode 2 de détection globale des aberrations, avec un seuil minimal de 3 sondes consécutives déviées. La présence de CNV a été vérifiée par FISH ou PCR quantitative. Le caractère bénin, pathogène ou de signification inconnue des variants est établi grâce à la consultation des bases de données en ligne, de la littérature scientifique (PUBMED, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) et en fonction du caractère *de novo* ou hérité des variants. Les bases de données consultées sont les suivantes : la base de données des variants génomiques (DGV, <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>), la base de données des déséquilibres chromosomiques et phénotypes chez l'Homme utilisant les ressources Ensembl (DECIPHER, <https://decipher.sanger.ac.uk/>), la base de données d'hérité mendélienne chez l'Homme - gène humains et anomalies génétiques (OMIM, <http://www.omim.org/>).

Résultats

I. CNVs identifiés dans notre cohorte

L'analyse par MLPA avec le kit p343-*Autism1* a été réalisée chez 81 cas index, 14 apparentés et 4 patients qui ont servi de contrôles positif ou négatif.

Parmi les 81 patients présentant un TSA ou des caractéristiques autistiques, un CNV a été mis en évidence chez 7 patients (8,6 %), tous des garçons. L'âge au moment du premier examen génétique était compris entre 21 mois et 14 ans (moyenne : 8 ans et médiane : 6,5 ans).

Quatre CNVs (4,9 %) ont été identifiés au niveau de la région 15q11-q13 : une délétion BP3-BP4 héritée, d'origine maternelle (patient 2) ; trois duplications (parents non testés), une duplication BP2-BP4 (patient 1) et deux duplications du gène *CHRNA7* seul (patients 4 et 5).

Deux CNVs (2,5 %) ont été identifiés au niveau de la région 16p11.2 : deux duplications, dont une héritée, d'origine paternelle (patient 7) et une *de novo* (patient 9).

Un patient (1,2 %) présente une délétion au niveau de la région 22q13.3, sur un chromosome 22 en anneau (parents non testés) (patient 10).

Les caractéristiques cliniques et cytogénétiques des patients sont présentées dans les tableaux 5 et 6.

Des exemples de résultats de MLPA (patients 3 et 6), sont présentés en annexe 3.

Tableau 5 : Caractéristiques cliniques des patients présentant un TSA et chez qui un CNV a été identifié en MLPA, kit P343-Autism1

Patient	Sexe	Age	Antécédents personnels et familiaux	Périmètre crânien	Développement	Comportement	Langage	Signes dysmorphiques	Epilepsie	IRM cérébrale	Autres	CNV identifié
1	M	6a	Syndrome de Klinefelter en mosaïque (12 %)	Non connu	Difficultés neurocognitives globales				Généralisée	Normale		Duplication 15q11q13 BP2-BP4
2	M	14a½		Normal		Intérêts restreints. Isolement social	Altération qualitative de la communication	Rétrognatisme, palais creux, avancée du maxillaire supérieur, oreilles décollées.			ataxie modérée	Délétion 15q13 BP3-BP4 maternelle
3	M	1a	Syndrome de West à 7m	Normal	TED				Spasmes avec anomalies EEG	Normale		Délétion 15q13 paternelle BP4-BP5 en ACPA
4	M	5a	sœur : doute sur TSA	5a : +2,5 DS (macro-crânie familiale)	RD : marche acquise à 18 m		Retard de parole et de langage	Facies arrondi, racine du nez élargie, extrémité bulbeuse, oreilles décollées, grande bouche, rétrognatisme. Sourire facile.		Kyste temporo-polaire gauche, atrophie cortico sous corticale		Duplication <i>CHRNA7</i>
5	M	21m	mère : suivi pédo-psychiatrique et psychomoteur	Micro-céphalie, croissance régulière à -3 DS	RD	Traits autistiques. Trouble de l'interaction sociale.	Retard de langage insuffisamment compensé par la communication non verbale.	Grandes oreilles		Corps calleux un peu fin.		Duplication <i>CHRNA7</i>

RD : retard de développement ; RDPM : retard de développement psychomoteur ; RGDPM : retard global de développement psychomoteur ; TED : trouble envahissant du développement ; RCIU : retard de croissance intra-utérin ; IRM : imagerie par résonance magnétique ; EEG : électro-encéphalogramme.

Patient	Sexe	Age	Antécédents personnels et familiaux	Périmètre crânien	Développement	Comportement	Langage	Signes dysmorphiques	Epilepsie	Imagerie cérébrale	Autres	CNV identifié
6	F	6a½		Non connu	RGDPM marche à 16m ½ Déficience neurocognitive légère globale		Retard significatif de paroles et de langage oral (premiers mots acquis vers 2a)	Ptosis œil gauche, élargissement de la partie médiane du nez, tendance à l'hypertélorisme.		Normale à 1 an	6m : scoliose dorso-lombaire, tâche café au lait paroi abdominale, syndactylie 3 ^{ème} et 4 ^{ème} orteils bilatérale ; tendance aux pieds creux bilatéraux.	Délétion 16p11.2
7	M	6a½	Souffrance fœtale aiguë. Infection materno fœtale.	Normal	RDPM : tient assis à 12m, marche à 23m. Difficultés neurovisuelles.	Détournement du regard lors des questions et réponses inadaptées.	Retard de parole et de langage sévère.	Non		Normale	Hypersalivation	Duplication 16p11.2 paternelle
8	F	6a	½ frère maternel : trouble du comportement. Père : convulsions (hyperthermie) entre 1 et 10a	6a : -1,5 DS	Marche à 13m. Déficience neurocognitive globale.		Retard majeur d'acquisition de paroles et de langage oral	Hypertélorisme, épicanthus, lèvre supérieure éversée, implantation basse des cheveux en zone frontale.	Crises convulsives à 18m (hyperthermie) EEG : pointes ondes diffuses.	Normale	Tendance à l'hypersalivation	Duplication 16p11.2 paternelle
9	M	10a		Normal	RD : marche à 18m		Retard de parole et de langage.	Non			Ataxie	Duplication 16p11.2 de novo
10	M	2a½	RCIU. Mère : épilepsie	2a½ : micro-céphalie, -3,5 DS	RDPM. Difficultés neuromotrices. Tient assis à 11m. Marche à 21m		Retard majeur de paroles et de langage oral. (sons et dissyllabes)	Oreilles grandes, un peu décollées, prognathisme, palais ogival, hypersalivation. Très blond.		Mégaciterne de la fosse cérébrale postérieure	2a½: hypotrophie : poids à - 2DS	Délétion <i>SHANK3</i> (anneau du chromosome 22)

Tableau 6 : examens cytogénétiques réalisés chez les patients présentant un TSA et chez qui un CNV a été identifié en MLPA, kit P343-*Autism1*

Patient	Sexe	Caryotype	Recherche de syndrome spécifique en FISH ou MLPA	Exploration des régions sub-télomériques en FISH ou MLPA	MLPA kit P343- <i>Autism1</i>	ACPA	Au total	Hérité/ <i>de novo</i>	Taille de l'anomalie
1	M		.rsa 15q11q13 (ME028)x3		.rsa 15q11q13 (P343)x3		Duplication 15q11q13 BP2-BP4	parents non testés	≈ 4,9 Mb
2	M	46,XY	.ish 22q11.2 (TUPLE1,TBX1)x2	.ish subtle (41x2) .mlpa (P036)x2 .mlpa (P070)x2	.rsa 15q11q13 (NDNL2,APBA2,TJP1)x1		Délétion 15q13 BP3-BP4	hérité maternel	≈ 500 Kb
3	M		.ish del(15)(q13.3q13.3) (RP11-106H13-)		ACPA uniquement	arr[hg19] 15q13.2q13.3 (31,140,606-32,438,944)x1	Délétion 15q13 BP4-BP5	hérité paternel	≈ 1,3 Mb
4	M	46,XY	.rsa 15q11q13 (ME028)x2	.rsa (P070)x2	.rsa 15q13(CHRNA7)x3		Duplication CHRNA7	parents non testés	≈ 140 Kb - 1,3 Kb
5	M	46,XY		.rsa (P036)x2 .rsa (P070)x2	.rsa 15q13(CHRNA7)x3		Duplication CHRNA7	parents non testés	≈ 140 Kb - 1,3 Kb
6	F	46,XX	.ish 16p11.2 (RP11-504I2x1)	.ish subtel (41x2)	.rsa 16p11.2(P343)x1	arr 16p11.2 (29,673,954-22,509,254)x1	Délétion 16p11.2	Père non testé. Mère non transmettrice	≈ 7 Mb
7	M	46,XY.nuc ish (TBX1,TUPLE1)x3 [48/152]	.rsa 22q11.2 (P250)x3		.rsa 16p11.2(P343)x3		Duplication 16p11.2	hérité paternel	≈ 460 Kb

Patient	Sexe	Caryotype	Recherche de syndrome spécifique en FISH ou MLPA	Régions sub-télomériques en FISH ou MLPA	MLPA kit P343- <i>Autism1</i>	ACPA	Au total	Hérité/ <i>de novo</i>	Taille de l'anomalie
8	F	46,XX	.ish 7q11.2(ELN)x2 .ish 22q11.2(N25x2)	.rsa 3p26(P036)x3 .rsa 3p26(P070)x3	.rsa 16p11.2(P343)x3	arr[hg19] 16p11.2(29,657,192-30,188,269)x3 pat	Duplication 16p11.2	hérité paternel	≈ 531 Kb
9	M	46,XY			.rsa 16p11.2(P343)x3		Duplication 16p11.2	<i>de novo</i>	≈ 460 Kb
10	M	46,XY,r(22)(p10q13) .ish r(22)(NOR, D22Z1+,TUPLE1+, TBX1+, <i>SHANK3</i> -)			.rsa 22q13(<i>SHANK3</i>)x1		Délétion SHANK3	parents non testés	

II. Performances de la MLPA

Les CNVs présents chez les patients qui ont servi de contrôles positifs, délétion 15q13 (BP4-BP5), délétion et duplication 16p11.2, ont bien été retrouvés en MLPA (vrais positifs). Chez le patient qui a servi de contrôle négatif, aucun CNV n'a été identifié en MLPA (vrai négatif). Chez les 15 patients chez qui aucun CNV n'avait été identifié en MLPA et chez qui une ACPA a été réalisée, l'absence d'anomalie en ACPA a permis de confirmer l'absence d'anomalie identifiée en MLPA (vrais négatifs). L'analyse en FISH a permis de confirmer la présence d'un CNV identifié en MLPA chez 3 patients (E,Q,X) (vrais positifs). L'analyse familiale chez les patients présentant des CNVs hérités a permis de confirmer la présence ou l'absence de CNVs chez 4 patients supplémentaires (F,U,V,W).

Au total, l'analyse de 25 patients a permis d'évaluer la sensibilité (se) et la spécificité (sp) de la MLPA pour la détection des CNVs des régions 15q11-q13, 16p11.2 et 22q13.3 à **100 %**. Les valeurs prédictives positives (VPP) et négatives (VPN) étaient également de 100 %.

Tableau 7 : Evaluation des performances de la MLPA avec le kit P343-*Autism 1*

	Positif en MLPA	Négatif en MLPA	
Positif d'après une autre méthode	7	0	Se = 7/7 = 100 %
Négatif d'après une autre méthode	0	18	Sp = 18/18 = 100 %
	VPP = 7/7 = 100 %	VPN = 18/18 = 100 %	

Discussion

I. Corrélation génotype-phénotype

L'étude de la corrélation génotype-phénotype a été réalisée en incluant les patients qui ont servi de contrôles positifs. Les caractéristiques cliniques et cytogénétiques des patients ont été présentées dans les tableaux 5 et 6.

I.1. Région 15q11-q13

Au total, cinq patients présentent un CNV au niveau de la région 15q11-q13 : deux patients présentent une délétion héritée, BP3-BP4 d'origine maternelle (patient 2), et BP4-BP5 d'origine paternelle (patient 3) ; trois patients présentent une duplication (parents non testés) : une duplication BP2-BP4 (patient 1) et deux duplications du gène *CHRNA7* seul (patients 4 et 5).

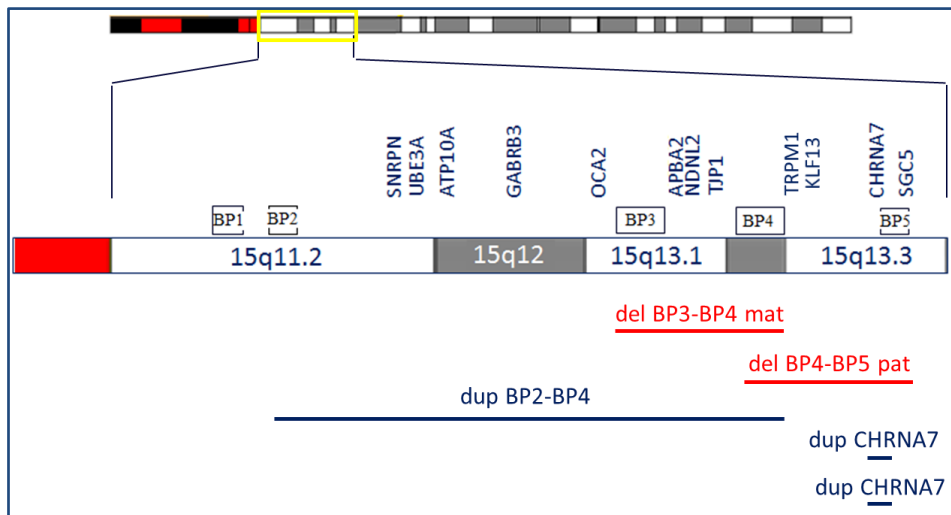


Figure 5 : Localisation des CNVs identifiés en 15q11-q13 chez les patients de notre cohorte. Les gènes représentés sont ceux ciblés par le kit de MLPA P343-Autism 1

I.1.1. Prévalence et mécanisme de formation des CNVs

Parmi la cohorte de 81 patients (cas index) présentant un TSA, 4 patients (4,9 %) présentaient un CNV au niveau de la région 15q11-q13 (incluant 15q13.3). Ce pourcentage est un peu supérieur à celui décrit dans plusieurs études qui estiment qu'au moins 1 à 3 % de tous les cas de TSA pourraient être dus à une duplication de la région 15q11.2-q13 [14][15]. Dans notre cohorte, parmi les 3 régions étudiées : 15q11-q13, 16p11.2, 22q13.3, la région 15q11-q13 était la plus fréquemment remaniée.

La région 15q11.2-q13 est un site fréquent de réarrangements génomiques. Cette région présente des segments répétés présents en faible nombre de copies (LCR : *low copy repeats*) hautement homologues, expliquant la fréquence des réarrangements [14]. En effet, la similitude de séquence entre ces LCR rend possible, au cours de la méiose, un éventuel mésappariement, puis *crossing-over* entre 2 LCRs homologues non alléliques présents sur

des chromosomes homologues. Cette recombinaison homologue non-allélique entraîne une délétion ou une duplication de la région flanquée par ces deux LCRs [15]. Ces LCRs à l'origine de duplications et délétions récurrentes définissent dans la région 15q11-q13 des points de cassures récurrents : les points de cassure (BP : *breakpoint*) BP1 à BP5 [15].

La plupart des duplications interstitielles peuvent être classées parmi 3 groupes de duplications, en fonction des points de cassure récurrents impliqués :

- les duplications proximales, qui s'étendent entre BP1 et BP2 et ne contiennent pas la région critique des syndromes de PWS ;
- les duplications classiques, de BP2 à BP3, qui contiennent la région critique responsables des syndromes de PWS [15]. Dans la majorité des cas, ces duplications surviennent *de novo* et le chromosome dupliqué est d'origine maternelle [15].
- Les duplications distales (duplications 15q13.3), qui s'étendent entre BP4 et BP5 et impliquent *CHRNA7* [15].

Les duplications impliquant d'autres couples de LCR sont beaucoup plus rares [15].

I.1.2. Duplications BP2-BP3 et BP2-BP4

Le patient 1 de notre cohorte présente une **duplication BP2-BP4**, de 4,9 Mégabases (Mb). Cette duplication comprend la région BP2-BP3, comme la plupart des duplications interstitielles de la région 15q11-q13 décrites (n = 24/29, 83 %) [14][15]. Cependant, les duplications BP2-BP4 sont rares. Dans la littérature, la taille de la duplication n'apparaît pas être corrélée à la sévérité du phénotype [14].

Au moins 26 patients présentant une duplication interstitielle 15q11-q13 incluant BP2-BP3 sont décrits dans la littérature [14][15][16]. La plupart des duplications (n = 22/26, 85 %) surviennent *de novo* [14][15]. Lorsque l'origine parentale du chromosome dupliqué a été recherchée, le chromosome dupliqué était dans la majorité des cas le chromosome maternel (n = 20/26, 77 %) [14][15][16].

La duplication de la région BP2-BP3 maternelle est suffisante pour entraîner un TSA [14]. La duplication de la région BP2-BP3 paternelle, moins fréquente, peut également entraîner un TSA, mais aussi d'autres phénotypes plus modérés avec des traits autistiques et/ou un léger retard de développement et de langage, voire un phénotype normal [14][15]. Cela indique qu'un ou plusieurs gènes spécifiques exprimés par l'allèle maternel contribuent au phénotype de TSA [14]. Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'autisme est plus fréquent chez les individus atteints de syndrome de PWS avec disomie uniparentale d'origine maternelle que lorsque ce syndrome est dû à une délétion 15q11.2q13 d'origine paternelle [14]. Le gène candidat le plus important est *UBE3A* (*ubiquitin protein ligase E3A*), qui est exprimé uniquement à partir de l'allèle maternel dans la plupart des neurones du système nerveux central (SNC) des mammifères. Une surexpression de l'allèle maternel *UBE3A* entraînée par une duplication de la région entre BP2 et BP3 pourrait être responsable du phénotype de TSA [14]. Récemment, deux autres gènes exprimés par l'allèle paternel, *MAGEL2* (*MAGE family member L2*) et *NDN* (*necdin, MAGE family member*), localisés entre BP2 et BP3, ont été décrits comme associés au retard de développement et à l'autisme [15]. Ces gènes sont exprimés dans le cerveau et codent pour des protéines importantes dans le développement neuronal [15].

Notre patient présente au niveau clinique des difficultés neurocognitives globales, avec une épilepsie généralisée, sans malformation cérébrale mise en évidence à l'IRM.

Parmi les 26 patients présentant une duplication BP2-BP3, 69 % (n = 18) présentaient un TSA ; 50 % (n = 13) présentaient un autre un trouble du comportement. Le retard de développement était le symptôme le plus fréquent, présent chez 81 % (n = 21) des patients ; 62 % (n = 16) des patients présentaient un retard de langage. Enfin, des crises épileptiques étaient présentes chez 19 % (n = 5) des patients. Chez 4 patients sur 5, les crises épileptiques étaient généralisées comme chez notre patient. De plus, lorsque l'activité électrique cérébrale était explorée de façon systématique chez 24 patients [14][15], elle était très fréquemment perturbée : 71 % (n = 17) des patients présentaient des anomalies électro-encéphalographiques, qui se caractérisaient par un excès diffus de pointes *bêta*. Le variant *bêta* apparaît spécifique de la présence de la duplication BP2-BP3, indépendamment de l'origine parentale de la duplication [14].

La fréquence des crises épileptiques et du variant *bêta* pourrait être due à la présence de copies supplémentaires d'un groupe de gènes codant pour les récepteurs du GABA, incluant *GABRB3* (*gamma-aminobutyric acid type A receptor beta3 subunit*), *GABRA5* (*gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha5 subunit*), *GABRG3* (*gamma-aminobutyric acid type A receptor gamma3 subunit*), situés à l'intérieur de la région commune dupliquée BP2-BP3 [14]. L'expression de ces gènes dans le cerveau n'étant pas soumise à l'empreinte parentale, l'augmentation de leur expression ne devrait pas être dépendante de l'origine maternelle ou paternelle de la duplication [14].

L'imagerie cérébrale par IRM chez notre patient ne retrouvait pas d'anomalie, comme chez 45 % (n = 5/11) des patients de la littérature chez qui cet examen a été réalisé. Les anomalies retrouvées chez les autres patients n'étaient pas spécifiques et comprenaient : une hyperintensité de la substance blanche sous-corticale ou péri-ventriculaire, un corps calleux épais, un kyste arachnoïdien temporal, une dilatation ventriculaire [15].

Notre patient ne présentait pas de dysmorphie faciale évidente. Certains auteurs ont tenté d'identifier la présence de petits signes caractéristiques et ont retrouvé un philtrum long, un nez court, un nez bulbeux, des joues pleines chez respectivement 92 % (n = 12/13), 85 % (n = 11/13), 69 % (n = 9/13), et 69 % (n = 9/13) des patients [14]. Ces discrètes anomalies faciales présentent une expressivité variable à la fois intra-familiale et inter familiale [14]. Elles sont indépendantes de l'origine paternelle ou maternelle de la duplication, et pourraient être dues à une surexpression du gène *UBE3A* dans des tissus où son expression n'est pas soumise à l'empreinte parentale (tissus non neuronaux), et/ou à la surexpression d'autres gènes de la région non soumis à l'empreinte parentale (comme les gènes *OCA2* (*OCA2 melanosomal transmembrane protein*), *GABRB3*, *GABRA5*, *GABRG3*, *HERC2* (*HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2*)) [14].

D'autres auteurs, bien qu'ayant également identifié des traits dysmorphiques chez les patients avec duplication 15q11-q13 (un nez court avec narines antevernées également le plus fréquemment), considèrent qu'il est difficile d'affirmer que ces traits dysmorphiques sont des anomalies développementales représentatives de la pathologie [15]. Malgré ces hypothèses divergentes, les auteurs s'accordent sur le fait que ces traits dysmorphiques identifiés ne sont pas pathognomoniques et ne permettent pas la reconnaissance d'un syndrome [15].

I.1.3. Délétions BP3-BP4

Le patient 2 de notre cohorte présente une **délétion BP3-BP4** héritée, d'origine maternelle. Peu de délétions dans la région 15q13.1-q13.3 impliquant le point de cassure proximal BP3 ont été rapportées dans la littérature [17]. Dans cette région, les délétions concernent le plus souvent la région 15q13.3 (BP4-BP5), avec 92 % (n = 238) d'individus présentant une délétion BP4-BP5, contre seulement 0,05 % (n = 14) d'individus avec délétion BP3-BP4, sur un total de 260 individus avec délétion en 15q13.1-q13.3 [18].

Cela peut être en partie expliqué par l'architecture génomique de la région [17]. On estime qu'environ 45 % des chromosomes 15, par rapport au génome de référence humain, présentent une duplication segmentale dans BP4 (environ 300 kb) dans une orientation directe avec une duplication segmentale homologue dans BP5, susceptible d'entraîner par recombinaison homologue non allélique une délétion BP4-BP5. Au contraire, BP3 contient des segments de forte homologie avec BP4 et BP5 qui sont beaucoup plus petits (environ 30 kb), et de nombreux segments de BP3 ont une homologie moindre avec BP4 et BP5 que les segments homologues entre BP4 et BP5 [17].

Par ailleurs, les délétions BP3-BP4 semblaient n'avoir qu'un effet phénotypique minime, et à cause de cela ont peut-être été moins décrites. En effet, ces délétions sont souvent héritées et la sévérité du phénotype entre les individus avec délétions BP3-BP5 et ceux avec une délétion limitée à l'intervalle BP4-BP5 semblait similaire [17].

Dans la littérature 7 patients présentant une délétion BP3-BP4 ont été décrits. Cette délétion était héritée chez 5 patients (d'origine maternelle chez 3 patients et d'origine paternelle chez 2 patients). Elle survenait *de novo* chez un patient, et chez un patient les parents n'ont pas été testés [17]. Lorsque la délétion était héritée, le parent porteur de la délétion était sain [17].

Notre patient présente au niveau clinique une altération qualitative de la communication, des intérêts restreints, un isolement social. Dans la littérature, un phénotype spécifique de la délétion BP3-BP4 n'a pas été mis en évidence. Certaines similitudes phénotypiques peuvent être définies, mais il existe toujours une variabilité parmi les individus [17]. Certaines caractéristiques phénotypiques sont retrouvées plus fréquemment chez les patients avec délétion BP3-BP4 que chez les patients avec la délétion BP4-BP5, comme un retard de croissance (n = 4/6 vs n = 4/38), une petite taille (n = 4/7 vs n = 4/42), une microcéphalie (n = 4/7 vs n = 4/44), une hypotonie (n = 5/6 vs n = 13/27), des anomalies rénales (n = 1/7 vs n = 1/38), une puberté précoce ou anomalie de développement de la poitrine (n = 1/7 vs n = 1/38) [17]. Aucun de ces éléments n'était retrouvé chez notre patient. Notre patient ne présente pas non plus de surdité, un signe qui était spécifique des patients présentant une délétion BP3-BP4 en comparaison aux patients présentant une délétion de BP4-BP5 et BP3-BP5 (n = 2/7 vs n = 0/38 et n = 0/5 respectivement) [17].

Notre patient présentait quelques signes dysmorphiques : un rétrognatisme, un palais creux, des oreilles décollées. Des signes dysmorphiques non spécifiques ont été également décrits chez la plupart des patients avec délétion BP3-BP4 (n = 6/7), avec un palais creux retrouvé chez deux patients [17] [18].

Au niveau neurologique, un patient présentait une ataxie comme chez notre patient [17].

L'haplo-insuffisance de 4 gènes situés dans l'intervalle d'environ 1,1 Mb entre BP3 et BP4 en 15q13.1 pourrait expliquer les phénotypes anormaux observés chez les individus avec

délétion BP3-BP4. Le gène *APBA2* (*amyloid beta precursor protein binding family A member 2*) est exprimé uniquement dans le tissu neuronal. Il code pour la protéine liant le précurseur de la protéine Bêta amyloïde, famille A, membre 2. Cette protéine interagit avec les protéines des vésicules synaptiques, régule la croissance des neurites, et joue ainsi un rôle dans le développement du SNC [17]. Le gène *TJP1* (*tight junction protein 1*) a une expression ubiquitaire pendant le développement, avec une spécialisation plus tardive dans le SNC, les yeux et le cœur. Il code pour la *zonula occludens 1*, une protéine impliquée dans la stabilisation des jonctions serrées, la connexion au cytosquelette et la régulation de la croissance cellulaire [17]. Le gène *NDNL2* (*Necdin-like gene 2*), est un gène exprimé de façon ubiquitaire, et code une partie du complexe protéique SMC5-6 (*structural maintenance of chromosomes, 5-6*). Ce complexe a un rôle important dans la réparation de l'ADN [17] [19]. Le 4^{ème} gène de la région, *FAM189A1* (*family with sequence similarity 189 member A1*), est moins connu [17].

Des gènes situés à l'intérieur des points de cassure BP3 et BP4 peuvent également être interrompus ou délétés chez ces individus ; cela pourrait expliquer d'autres éléments du phénotype observé [17].

I.1.4. Délétions et duplications BP4-BP5

Trois patients de notre cohorte présentent un CNV au niveau de la région BP4-BP5 en 15q13.3 : un patient avec une délétion de BP4-BP5 et deux patients avec une duplication de *CHRNA7*.

Des CNVs de la région BP4-BP5 en 15q13.3 ont été observés dans un large champ de phénotypes neuropsychiatriques, incluant les TSA, la DI, l'épilepsie, les retards de développement et le retard de langage, les troubles neuropsychiatriques (schizophrénie, trouble de l'humeur), et les troubles du comportement (trouble déficitaire de l'attention avec ou sans hyperactivité, TDAH) [18] [20]. Ces CNVs présentent une pénétrance incomplète, avec des délétions communes BP4-BP5 d'environ 1,6 Mb entraînant des phénotypes neuropsychiatriques dans environ 80 % des cas, et des duplications avec une pénétrance bien moindre [18] [20].

Parmi les gènes contenus dans cet intervalle, *CHRNA7* (*cholinergic receptor nicotinic alpha 7 subunit*), codant pour la sous unité *alpha* du récepteur nicotinique neuronal de l'acétylcholine, semble jouer un rôle majeur dans les phénotypes neuropsychiatriques observés chez les patients [20]. Le dosage anormal de *CHRNA7* pourrait être à l'origine de variations de la quantité de protéine *alpha 7*, entraînant une modification dans la signalisation médiée par le calcium dans les domaines concernés du SNC [20]. Cependant, alors que la perte de *CHRNA7* a été décrite comme ayant une forte pénétrance, la pathogénicité des gains de *CHRNA7* a été plus difficile à démontrer [20]. Le gène *FAN1* (*FANCD2/FANCI-associated nuclease 1*), codant une nucléase impliquée dans la réparation de l'ADN, pourrait aussi contribuer potentiellement au phénotype neuropsychiatrique des patients présentant une délétion 15q13.3. En effet, des CNVs au niveau de ce gène ont été identifiés de façon significativement plus fréquente chez les patients présentant une schizophrénie ou un TSA que chez des contrôles [18].

Les individus avec des CNVs impliquant *CHRNA7* présentent des phénotypes variés, principalement neuropsychiatriques ou neuro-comportementaux, mais la pénétrance est

incomplète, et parmi les individus atteints, il existe une grande variabilité dans l'expressivité et la sévérité [20]. Les facteurs génétiques et/ ou environnementaux qui viennent modifier le phénotype lié aux CNVs impliquants *CHRNA7* doivent encore être identifiés. Plusieurs hypothèses ont été proposées : CNVs ou SNPs additionnels sur l'autre allèle, modifications épigénétiques, gènes modificateurs comme le gène de fusion *CHRFAM7A* (*CHRNA7* (exons 5-10) and *FAM7A* (exons A-E) fusion), éléments régulateurs comme les micro-ARNs [18][20].

La pénétrance incomplète et l'expressivité variable des phénotypes associés aux CNVs impliquant *CHRNA7*, même au sein d'une même famille, représente une difficulté conséquente pour le conseil génétique des familles atteintes, à la fois en postnatal et en prénatal, et cela d'autant plus pour les gains de *CHRNA7* que pour les pertes de *CHRNA7*.

Le patient 3 de notre cohorte présente une **délétion BP4-BP5** d'origine paternelle. La délétion BP4-BP5 est le type de délétion le plus fréquent au niveau de la région 15q13.3, avec une taille comprise entre 1,5 et 2 Mb [20]. Une revue de la littérature décrit 208 patients présentant une délétion BP4-BP5 [20]. Cette délétion est le plus souvent héritée (79,3 % des patients, n = 69), comme chez notre patient. Elle est d'origine maternelle dans 74 % (n = 51) des cas et paternelle dans 26 % (n = 18) des cas. Nous n'avons pas de renseignements sur le phénotype du père de notre patient. Dans la littérature, chez les patients avec délétions BP4-BP5 d'origine paternelle (n = 18), 39 % (n = 7) des pères étaient symptomatiques [20].

Notre patient présente un TSA, qui est décrit chez seulement 11,5 % des patients avec délétion BP4-BP5. Notre patient a présenté un syndrome de West à l'âge de 4 mois. Des antécédents de crises épileptiques, une épilepsie, et/ ou des anomalies EEG sont également décrites chez environ un tiers (37 %) des patients avec délétion BP4-BP5. Le phénotype associé aux délétions BP4-BP5 présente une grande variabilité. Ainsi, d'autres caractéristiques phénotypiques sont décrites dans la littérature, non décrites chez notre patient : trouble du langage (28,1 %), DI (54,7 %), TDAH ou déficit de l'attention (9,4 %), comportement anormal (agression, inhibition, impulsivité) chez environ un quart des patients (24 %), signes dysmorphiques (24,5 %), cependant modérés et non spécifiques. Des troubles de l'humeur sont également décrits (13 %), ainsi que d'autres caractéristiques neurologiques (moins de 10 % des cas) [20].

Une **duplication de *CHRNA7*** a été identifiée chez 2 patients (patients 4 et 5), ce qui représente une prévalence de 2,5 % (n = 2). Ce pourcentage est supérieur à celui décrit dans une autre cohorte de 135 patients avec TSA, où seulement 1 patient (0,7 %) présentait une duplication de *CHRNA7* [21]. Cette duplication est également retrouvée chez des cohortes de patients non atteints de TSA. Elle est retrouvée chez 1,25 % des patients d'une cohorte présentant un TDAH, et chez 1 % des patients présentant une épilepsie généralisée « idiopathique ». De façon moins spécifique, parmi les patients chez qui une analyse chromosomique sur puce à ADN est réalisée en diagnostic, 0,57 % présentent une duplication impliquant *CHRNA7*. Par ailleurs, ces duplications sont également présentes chez des individus contrôles (jusqu'à 1 individu sur 180) [20].

Les duplications impliquant *CHRNA7* peuvent s'étendre à la région BP3-BP5, BP4-BP5, ou bien, cas le plus fréquent, n'impliquer que le gène *CHRNA7* avec ou sans le 1^{er} exon du gène *OTUD7A* (*OTU deubiquitinase 7A*) [19]. C'est ce dernier type de duplication, limité au

gène *CHRNA7*, qui est retrouvé chez nos patients. (Le nombre de copies du gène *OTUD7A* n'est pas évalué avec le kit de MLPA P343-*Autism* 1 utilisé.)

Chez nos patients, le mode de survenue de la duplication de *CHRNA7*, hérité ou *de novo*, n'était pas connu. Dans la littérature, 67 patients avec duplication de *CHRNA7* ont été décrits [20]. Chez 79,1 % des patients (n = 53), le mode de survenue hérité ou *de novo* n'était pas non plus connu. Il était hérité chez tous les autres patients. Huit duplications étaient héritées d'un parent non atteint (5 d'origine maternelle et 3 d'origine paternelle), montrant une pénétrance incomplète pour ce CNV. Deux duplications étaient héritées d'un père atteint et 4 d'une mère atteinte [20].

Les deux patients de notre cohorte avec duplication de *CHRNA7* (patients 4 et 5) présentent un retard de développement et un retard de langage. Le patient 4 présente une probable macrocrairie familiale, le patient 5, une microcéphalie. Le patient 4 présente des signes dysmorphiques : facies arrondi, racine du nez élargie, extrémité bulbeuse, oreilles décollées, grande bouche, rétrognatisme, un sourire facile ; le patient 5 présente seulement de grandes oreilles. L'imagerie cérébrale (IRM) met en évidence un kyste temporo-polaire gauche avec atrophie cortico-souscorticale chez le patient 4 et un corps calleux un peu fin chez le patient 5.

Dans la littérature, 89,6 % des individus avec duplication de *CHRNA7* sont atteints. Les caractéristiques cliniques présentes chez ces individus sont multiples, et aucune caractéristique phénotypique n'est présente chez plus d'un tiers des patients [20]. La DI et la schizophrénie sont les phénotypes les plus souvent retrouvés (28,7 %). D'autres phénotypes neuropsychiatriques peuvent être présents, comme le TDAH (18,3 %), les troubles de l'humeur (18,3 %), les TSA (15 %), un trouble du langage (8,3 %). Une hypotonie, des troubles du comportement, des caractéristiques dysmorphiques sont retrouvés chez respectivement 11,6 %, 11,6 % et 5 % des patients [20].

I.2. Région 16p11.2

Quatre patients présentent un CNV au niveau de la région 16p11.2 (figure 7) : trois patients présentent une duplication 16p11.2, deux héritées, d'origine paternelle (patients 7 et 8) et une *de novo* (patient 9) ; un patient présente une délétion 16p11.2 (parents non testés) (patient 6).

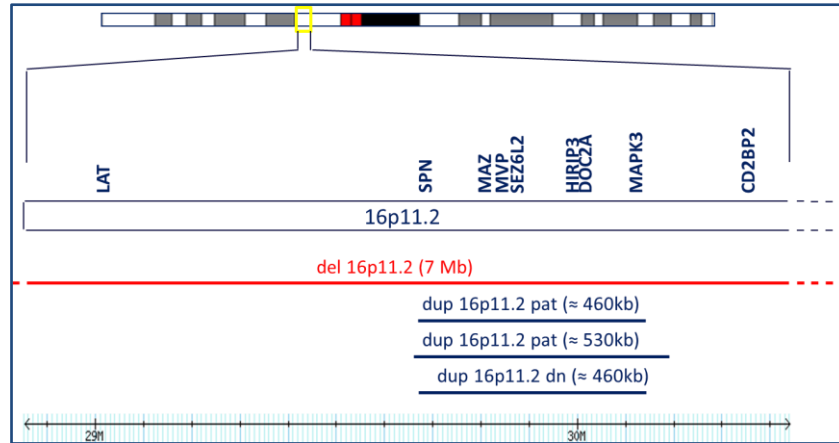


Figure 6 : Localisation des CNVs identifiés en 16p11.2 chez les patients de notre cohorte. Les gènes représentés sont ceux ciblés par le kit de MLPA P343-Autism 1

Parmi la cohorte de 81 patients (cas index) présentant un TSA, une duplication de la région 16p11.2 a été identifiée chez 2 patients (2,5 %) (patients 7 et 8).

Dans la littérature, les duplications et délétions en 16p11.2, d'une taille approximative de 600 kb (délétion BP4-BP5), sont identifiées dans environ 1 % des cas de TSA, et représentent une des causes les plus fréquentes de TSA [22] [23]. Les délétions en 16p11.2 ont une pénétrance plus forte (presque 100 % pour les TSA ou le retard de développement) que les duplications (environ 50 % de pénétrance) [1]. Ce CNV est associé à une grande variabilité phénotypique, et des phénotypes en miroirs sont parfois associés à la délétion 16p11.2 et la duplication 16p11.2 [23]. Par exemple, la délétion a été associée à des crises épileptiques, une obésité, une macrocéphalie, alors que la duplication a été associée à une schizophrénie, un indice de masse corporelle faible, et une microcéphalie [23]. Une DI est présente chez les individus avec délétion ou duplication en 16p11.2, avec une diminution du quotient intellectuel (Full scale intelligence quotient, FSIQ) respective de 22 points et 18 points, en comparaison aux apparentés sans CNV en 16p11.2 [24]. Chez les individus avec duplication en 16p11.2, la diminution du QI est plus importante chez les cas index que chez les apparentés [24]. Cette diminution du QI est indépendante de la présence de TSA, ou d'épilepsie [24]. Bien que la diminution moyenne du QI soit similaire chez les individus avec délétion ou duplication en 16p11.2, la variation du QI est beaucoup plus grande chez les individus présentant une duplication que chez ceux présentant une délétion [24]. Les individus avec duplication présentent 20 fois plus souvent un QI très faible (≤ 40) et 2 fois plus souvent un QI supérieur à la normale (> 100). Ceci peut être expliqué par la présence de CNVs délétères supplémentaires, qui est 2,5 fois plus importante chez les individus évalués pour des troubles neuro-développementaux et porteurs de duplication en 16p11.2 que chez les porteurs de délétion en 16p11.2 [24].

Il est bien établi qu'un CNV en 16p11.2 confère un fort risque de trouble neuro-développemental [23]. Le gène *KCTD13* (*potassium channel tetramerization domain containing 13*) a été identifié comme le gène candidat principal responsable du phénotype neurodéveloppemental présent chez les patients avec la délétion ou duplication récurrente en 16p11.2 d'après des études chez le *zebrafish* [22]. La surexpression de *KCTD13* entraîne une microcéphalie chez ces modèles animaux, associée à une diminution de la prolifération neuronale et une augmentation de l'apoptose des cellules. Au contraire, une diminution de l'expression de *KCTD13* entraîne une augmentation de la prolifération neuronale qui s'accompagne d'une macrocéphalie [22].

D'autres facteurs, parmi lesquels le terrain génétique, jouent probablement un rôle clé dans la détermination de la sévérité de l'évolution [23].

Certains auteurs se sont intéressés à une autre approche concernant le mécanisme de la pathogenèse du CNV récurrent en 16p11.2, en étudiant les interactions chromatiniques à longue distance de cette région avec d'autres régions du génome [25]. Grâce à des modèles cellulaires, il ont démontré, par exemple, que les promoteurs des gènes *MVP* (*major vault protein*) et *MAPK3* (mitogen-activated protein kinase 3), situés dans l'intervalle du CNV récurrent en 16p11.2, avaient des interactions à longue distance avec les gènes respectifs *PTEN* et *CHL1* (*cell adhesion molecule L1 like*). Ces gènes sont eux-même impliqués dans les TSA avec macrocéphalie pour *PTEN* et dans la présence d'une micro ou macrocéphalie pour les délétions et duplications impliquant *CHL1*. Il a aussi été démontré que l'expression de *PTEN* est modulée par la présence des CNVs récurrents en 16p11.2. De la même façon, l'expression de 12 gènes candidats décrits dans la base de données SFARI (Simons Foundation Autism Research Initiative) varie en fonction de la présence de CNVs récurrents en 16p11.2 [25]. Un des mécanismes d'action des CNVs au niveau de la région 16p11.2 sur les phénotypes observés pourrait ainsi résulter de la modification des interactions chromatiniques avec d'autres gènes impliqués dans les TSA [25].

Une patiente de notre cohorte (patient 6) présente une **délétion en 16p11.2**. Le mode de survenue hérité ou *de novo* de la délétion présente chez notre patiente n'a pas été déterminé (père non testé, mère non transmettrice). Dans une étude chez 72 individus avec TSA et délétion 16p11.2, chez 90 % (n = 65) des patients cette délétion était *de novo*, ou existait en mosaïque germinale chez un des parents [23].

L'ACPA a permis de délimiter les bornes de cette délétion, et ainsi mettre en évidence une délétion de 7 Mb, qui est beaucoup plus grande que la délétion récurrente de 16p11.2 (600 kb environ) [26]. Une délétion atypique, de 2 Mb, a été décrite dans la littérature, chez un patient avec un phénotype plus sévère que celui décrit avec la délétion classique, et une DI plus sévère [23].

Notre patiente présente un retard global de développement psychomoteur, une déficience neurocognitive légère globale, un retard significatif de paroles et de langage oral. Elle présente de petits signes dysmorphiques comme un ptosis de l'œil gauche, un élargissement de la partie médiane du nez, une tendance à l'hypertélorisme. Elle présente également une scoliose dorso-lombaire, une tâche café au lait au niveau de la paroi abdominale, une syndactylie des 3^{ème} et 4^{ème} orteils droits et gauches, une tendance aux pieds creux bilatéraux. L'imagerie cérébrale (IRM) n'a pas mis en évidence de malformation.

Il est difficile de comparer le phénotype de notre patiente avec celui des patients présentant une délétion 16p11.2 décrits dans la littérature, la taille de la délétion chez notre patiente étant beaucoup plus importante (7 Mb contre environ 600 kb pour la délétion récurrente).

La délétion récurrente 16p11.2 a été associée avec un grand nombre de phénotypes neuro-développementaux, avec une prévalence approximative de 0,6 % (0,3 à 1 % selon les études) de patients avec TSA, et 0,4 % dans des grandes séries de patients avec DI ou anomalies congénitales [26]. Dans une étude de 85 individus avec délétion 16p11.2 vs 153 individus contrôles (membres de la famille), les individus avec délétion 16p11.2 présentaient de multiples comorbidités psychiatriques : 93 % présentaient au moins 1 diagnostic contre 21 % chez les contrôles [26]. Les troubles de la coordination, les troubles du traitement phonologique, les troubles du langage, et les TSA étaient les diagnostics les plus fréquents [26]. Les troubles du langage et de la parole étaient particulièrement fréquents, puisque ils étaient présents chez 71 % des individus avec délétion en 16p11.2 [26]. D'autres caractéristiques neurologiques ont été mises en évidence dans une étude incluant 136 individus présentant la délétion récurrente en 16p11.2 : une hypotonie symétrique des membres (49 % des patients), une hyporéflexie (48 %), des habiletés anormales (47 %), des fossettes sacrées (34 %, multiples et atypiques) des tâches café-au-lait (30 %), et une hypotonie du tronc (20 %) [22].

La délétion 16p11.2 n'est pas associée à un diagnostic standard de TSA : seulement 24 % (n = 20) des patients avaient un diagnostic clinique de TSA, et seulement 18 % (n = 15) avaient un diagnostic strict basé sur l'échelle d'observation pour le diagnostic de l'autisme (ADOS) et l'entretien pour le diagnostic de l'autisme (ADI) [27]. Cependant la plupart des individus avec la délétion avaient un taux significativement plus élevé de caractéristiques liées à l'autisme, comme des difficultés comportementales et sociales, et des comportements répétitifs et intérêts restreints, en comparaison avec les membres de la famille non atteints [26]. Certains aspects du phénotype de délétion 16p11.2 sont ainsi cohérents avec un « type d'autisme » non encore reconnu par le DSM [27].

En comparaison avec d'autres CNVs délétères, seule la délétion 16p11.2 entraîne une altération de l'articulation, du langage et de la coordination motrice [26]. Ces altérations sont communes dans les TSA, soulevant la pertinence de cette région spécifiquement pour les TSA [26]. Les troubles de la coordination motrice (maladresse marquée, retard moteur, troubles de la coordination motrice fine et grossière) étaient présents chez plus de 50 % des individus avec délétion 16p11.2, mais ne sont pas systématiquement rapportés dans la littérature [26].

Trois patients de notre cohorte présentent une **duplication en 16p11.2** : deux héritées, d'origine paternelle (patients 7 et 8), et une *de novo* (patient 9).

Dans une étude chez 37 individus avec TSA et duplication en 16p11.2, chez seulement 24 % des patients (n = 9) cette duplication était *de novo* [23]. Parmi nos 3 duplications identifiées, aucune n'est d'origine maternelle. Cependant, sur un plus grand échantillon étudié (n = 29), aucun biais de transmission parentale n'a été mis en évidence [23]. La DI présente chez les individus avec duplication en 16p11.2 ne dépend pas du caractère hérité ou *de novo* de la duplication, le QI (FSIQ) moyen ne diffère pas significativement entre les 2 groupes [24].

Un TSA, une épilepsie (focale le plus souvent) sont présent chacun chez 20 % des cas index présentant une duplication en 16p11.2 [24]. Parmi les 3 patients de notre cohorte, un patient

(patient 8) a un antécédent de crises convulsives liées à une hyperthermie, sans notion sur le développement ultérieur d'une épilepsie. Les deux autres ne présentaient pas d'épilepsie. D'autre part, concernant l'indice de masse corporelle (IMC) et le périmètre crânien des individus avec duplication en 16p11.2, ils sont plus faibles respectivement de 0,6 points et 1,1 point en moyenne en comparaison aux contrôles apparentés [24].

Deux patients avec duplication en 16p11.2 présentaient également un autre CNV : une duplication en 3p26 (patient 8) et une duplication en 22q11.2 (patient 7).

La présence d'un autre CNV rare chez les patients présentant un CNV en 16p11.2 est fréquente et pourrait modifier la sévérité du phénotype des patients [23]. L'étude de 126 cas index avec un CNV en 16p11.2 a permis de montrer que 70 % des patients présentaient au moins un CNV supplémentaire, et 35 % étaient porteurs d'au moins 2 CNVs supplémentaires [23]. Par ailleurs, la présence de CNV supplémentaire était identifiée à la fois chez les patients présentant une duplication ou une délétion de 16p11.2, dans une même proportion [23]. D'autre part, la présence de CNV supplémentaire n'était pas significativement différente entre les filles et les garçons [23]. La plupart des CNVs supplémentaires identifiés interrompaient l'exon d'un gène annoté. Plusieurs de ces gènes étaient des gènes au niveau desquels des CNVs ont été identifiés comme des variants à risque d'autisme, ce qui est cohérent avec leur contribution potentielle à l'étiologie de la maladie [23]. Un biais de transmission parentale des délétions secondaires (petits CNVs et SNVs) a été mis en évidence : les mères transmettent significativement plus de délétions secondaires que les pères. Ce déséquilibre de transmission pourrait résulter d'une tolérance plus importante chez les femmes envers les mutations supplémentaires [23].

Chez les individus présentant un CNV supplémentaire, notamment lorsqu'il s'agit d'une délétion, le QI est plus faible. Ceci est cohérent avec les études sur l'impact de l'ensemble des CNVs (lorsqu'il s'agit de délétions) sur la réduction du QI [23]. Par ailleurs, les individus avec CNV secondaire présentaient un phénotype plus sévère, avec des anomalies cranio-faciales, une clinodactylie, une scoliose, une hypopigmentation [23].

Le patient 7 présentait une duplication en 22q11.2 en plus de la duplication en 16p11.2. Une étude récente a montré que parmi les patients présentant une duplication en 22q11.2, 38 % présentaient des caractéristiques de TSA [28]. Le plus souvent il s'agissait d'un comportement et d'activités répétitifs et restreints. De plus, chez 14 % à 25 % des patients (respectivement, $n = 5/37$ et $n = 5/20$), un diagnostic de TSA selon les critères du DSM V était établi [28].

Chez ce patient, les 2 duplications identifiées pourraient contribuer au diagnostic de TSA.

Le patient 8 présentait une duplication en 3p26 en plus de la duplication en 16p11.2. La duplication 3p26 a été mise en évidence grâce aux kits de MLPA P070 et P036, ciblant les régions subtélomériques de l'ensemble des chromosomes. Dans la région subtélomérique 3p, seul le gène *CHL1* est ciblé par cette technique. Aussi, nous ne connaissons pas les bornes exactes de cette duplication, ni l'implication possible d'autres gènes situés autour de *CHL1*.

Des duplications en 3p26.3 incluant seulement le gène *CHL1* ont été décrites chez 3 familles à ce jour : une patiente avec DI et épilepsie, un patient avec retard de développement,

hyperactivité, capacité d'attention limitée, et retard de langage, et un patient avec TSA et retard de développement. Les duplications identifiées avaient une taille respective de 1,07 Mb, 850 kb et 690 kb. Le premier et le dernier patient avaient hérité la duplication d'un parent sain, alors que la duplication survenait *de novo* pour le deuxième, suggérant une pénétrance incomplète [29].

Le gène *CHL1* code pour une protéine d'adhésion des neurones appartenant à la superfamille des immunoglobulines, exprimée de façon importante dans le système nerveux central et périphérique. La protéine a un rôle dans la régulation de la croissance des neurites et de la migration neuronale dans le cerveau en développement [29]. Des CNVs (délétion ou duplication) du gène *CHL1* ont été décrits chez au moins 7 patients présentant un retard de développement. Aussi, l'implication du gène *CHL1* dans les CNVs décrits apparaît responsable de l'altération des fonctions cognitives chez ces patients [29].

Chez ce patient encore, les 2 duplications identifiées pourraient contribuer au diagnostic de TSA.

I.3. Gène *SHANK3* en 22q13.3

Le patient 10 (1,2 %) de notre cohorte présentait une délétion du gène *SHANK3* (*SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3*), associée à un chromosome 22 en anneau.

Dans une méta-analyse de la littérature, la prévalence de la délétion de *SHANK3* chez des patients avec TSA était de 0,18 % (n = 10/5 657) [30].

Une délétion du gène *SHANK3* a été identifiée chez plus de 900 patients présentant un syndrome de délétion 22q13.3, aussi appelé syndrome de Phelan-McDermid [30]. Dans ce syndrome, la taille de la délétion est variable : de 100 kb à plus de 9 Mb [31]. Le gène *SHANK3* a été identifié comme le gène critique de la région 22q13.3 [32].

Plusieurs types de réarrangements génomiques sont à l'origine de la délétion 22q13.3 : délétion terminale 22q13.3 (72 %), anneau du chromosome 22 (14 %), translocations déséquilibrées (7 %), délétions interstitielles (9 %), toutes entraînant une haplo-insuffisance du gène *SHANK3* [30]. La formation d'un chromosome en anneau est habituellement secondaire à des cassures dans les 2 bras, puis une fusion des 2 bras [31]. Ainsi, des délétions subtélomériques sont souvent associées avec les chromosomes en anneaux. En général, le phénotype des patients présentant un chromosome en anneau et celui des syndromes causés par la délétion de la partie terminale du même chromosome se recoupent [31].

Un chromosome 22 en anneau a été décrit chez plus de 60 patients [31]. Les caractéristiques cliniques sont similaires chez les patients avec simple délétion 22q13 et les patients avec anneau du chromosome 22 lorsque la taille de la délétion est similaire et pour la même tranche d'âge [32] [33].

Les caractéristiques communes aux patients avec un anneau du chromosome 22 ou avec délétion terminale de 22q13 sont l'hypotonie, le retard global de développement avec DI globale et retard sévère de langage, des caractéristiques autistiques (chez presque 50 % des patients [32], un trouble du comportement, de petits signes dysmorphiques comme une macrotie, un épicanthus interne, et des ongles des orteils hypoplasiques [31] [32] [33]. Cependant, les patients avec délétion terminale en 22q13 présentent une tendance générale à une croissance excessive (37,5 %) alors que les patients avec anneaux du 22 présentent plutôt un retard de croissance (23,5 %) [33]. Ces caractéristiques cliniques sont cependant plutôt non-spécifiques [33].

La sévérité de l'hypotonie et du retard de développement global, en particulier dans le domaine moteur, semble être corrélée à la taille de la délétion [33]. Au contraire, le retard de langage (expression), toujours sévère et signe le plus caractéristique, peut être sévère même lorsque la délétion est de petite taille [33]. D'autre part, les troubles du comportement (hyperactivité, troubles du sommeil, confusion, agressivité), constants après 1 an, étaient plus sévères lorsque la délétion était de plus petite taille, et s'aggravaient avec l'âge [33]. Le degré d'autonomie réduit chez les patients avec une délétion de taille plus grande pourrait expliquer qu'ils soient moins sévèrement affectés par les troubles du comportement [33]. La présence de comportements répétitifs, stéréotypés et intérêts restreints était également en rapport avec une délétion de petite taille [34]. Enfin, la présence de crises d'épilepsie, chez environ un quart des patients, n'est pas corrélée à la taille de la délétion [33].

Notre patient présentait un RCIU, une hypotrophie, une microcéphalie, un retard de développement psychomoteur, des difficultés neuro-motrices, un retard majeur de paroles et

de langage oral, une hypersalivation, des petits signes dysmorphiques comme des oreilles grandes, un peu décollées, un prognatisme, un palais ogival, des cheveux très blonds. L'imagerie cérébrale (IRM) retrouvait une mégaciterne de la fosse cérébrale postérieure.

Chez les patients avec un chromosome 22 en anneau, un phénotype caractéristique distinct n'a pas été délimité jusqu'à présent. Cependant, les patients présentent fréquemment un retard de croissance intra utérin et postnatal, une hypotonie, une microcéphalie, une DI, un retard de langage, un retard de développement moteur, des crises d'épilepsie, des troubles du comportement. Ils présentent aussi de petits signes dysmorphiques comme des oreilles larges et de morphologie anormale, un léger hypertélorisme, un strabisme, un épicanthus, un ptosis, des sourcils épais avec synophrys, une ensellure nasale large et déprimée, une mal occlusion et position irrégulière des dents, un palais creux, une clinodactylie, et une syndactylie partielle entre les 2^{ème} et 3^{ème} orteils [31]. Les troubles de l'humeur et les comportements agressifs, de même que les TSA et l'hyperactivité, sont relativement fréquents [31].

L'hétérogénéité de présentation clinique des patients avec anneau du chromosome 22 a été attribuée à plusieurs facteurs. La présence de points de cassure variables entraîne une différence de taille du segment délété. De plus, les facteurs épigénétiques secondaires à la configuration de l'anneau peuvent modifier l'expression génique. Enfin, la présence d'une mosaïque dynamique (secondaire à l'instabilité de l'anneau) ou d'un vrai mosaïcisme, entraînent une variabilité du phénotype en fonction du pourcentage et du type de cellules porteuses de l'anneau [31]. Concernant ce dernier facteur, le degré de mosaïcisme été évalué comme très faible dans une étude de 17 patients avec anneau du chromosome 22 [33]. L'anneau était présent dans la plus grande majorité des métaphases analysées (98 à 100 %, sur 50 métaphases) chez presque tous les patients [33]. Une monosomie 22 complète et des anneaux dicentriques ou pulvérisés étaient extrêmement rares (0 à 2 %), suggérant que les anneaux du chromosome 22 sont remarquablement stables [33].

L'haplo-insuffisance du gène *SHANK3* a été décrite comme étant à l'origine des principaux symptômes neurologiques du syndrome de délétion 22q13.3 [32]. Cette haplo-insuffisance est non seulement retrouvée dans les délétions 22q13.3, mais aussi chez des patients présentant une mutation ponctuelle du gène *SHANK3* à l'origine d'une protéine tronquée. Ce type de mutation a été retrouvé chez 0,51 % des patients avec TSA (n = 11/2147) [30].

Le gène *SHANK3* est exprimé de façon prédominante dans le cortex cérébral et le cervelet [31]. La protéine SHANK3 interagit avec de nombreuses molécules synaptiques, parmi lesquelles le récepteur NMDA (*N-methyl-D-Aspartate*), les récepteurs métabotropes du glutamate de type I (mGluRs), et les récepteurs AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozol-4-propionate). Par ailleurs, des gènes proximaux à *SHANK3* non encore caractérisés, d'autres variants à l'intérieur des séquences régulatrices de ce gène, ou des gènes modificateurs non liés à *SHANK3*, pourraient affecter quantitativement ou qualitativement son expression [31]. Si le point de cassure de la délétion est situé dans ces gènes régulateurs, l'expression de *SHANK3* pourrait être altérée, entraînant un phénotype clinique [31].

II. Intérêt et inconvénient de la MLPA : démarche diagnostique

La recherche de CNVs est généralement réalisée grâce à l'ACPA, examen actuellement recommandé en première intention pour l'évaluation génétique des patients présentant un TSA.

En comparaison à l'ACPA, la MLPA est une technique qui présente un coût faible et une réalisation technique simple. Le coût par patient est de 110 € HT pour l'ACPA versus 15 € HT pour la MLPA. Les seuls équipements nécessaires à la réalisation de cette technique sont un thermocycleur et un analyseur de fragments d'ADN par électrophorèse capillaire, équipements déjà utilisés en routine pour plusieurs techniques de génétique moléculaire. Pour ces raisons, la technique de MLPA peut être facilement mise en place dans de nombreux laboratoires de génétique et cytogénétique.

L'intérêt de la MLPA dans le diagnostic génétique clinique des patients avec TSA a déjà été décrit dans plusieurs études [13] [33] [36].

Bien que la MLPA ne soit pas une technique permettant l'analyse du génome entier, elle peut potentiellement représenter une alternative à l'ACPA pour de nombreuses applications en routine.

L'évaluation des performances de la MLPA avec le kit P343-*Autism1* a montré que cette technique a une excellente validité intrinsèque, puisque la sensibilité et la spécificité sont égales à 100 %. Les valeurs prédictives positives et négatives étaient également de 100 %. Cependant, le nombre de patients relativement faible sur lequel se base cette évaluation peut faire discuter les valeurs obtenues. Une source de faux positif peut être par exemple la présence de modification de la séquence ADN (SNPs, mutation ponctuelle) au niveau de la cible des sondes. Cela peut déstabiliser l'hybridation des sondes à l'échantillon d'ADN ou gêner la ligation des sondes, entraînant une diminution du signal mimant une délétion. Afin d'éviter ce risque de faux positif, le kit P343 - *Autism1* utilise de nombreuses sondes pour chaque région d'intérêt : 26 pour la région 15q11-q13, 16 pour la région 16p11.2, et 3 pour le gène *SHANK3* en 22q13.3. De plus, dans la région 15q11-q13, plusieurs sondes ciblent les gènes d'intérêt principaux : *UBE3A*, *GABRB3*. Cela permet de définir au sein des régions 15q11-q13 et 16p11.2 les points de cassure des réarrangements chromosomiques, mais aussi d'éviter le risque de faux positif (diminution du signal pour une sonde isolée).

Par ailleurs, le kit P343-*Autism1* permet d'explorer le gène *SHANK3*, contrairement à l'ACPA telle qu'elle est actuellement réalisée par la majorité des plateformes françaises de génétique constitutionnelle. En effet, les puces généralement utilisées sont des puces pangénomiques 8x60K Agilent, qui ne contiennent qu'une sonde oligonucléotidique voire aucune pour certaines puces au niveau du gène *SHANK3*. Le seuil pour la détection de CNV étant d'au moins 3 sondes déviées, des CNVs à l'intérieur de ce gène ne sont pas détectés, à l'origine de faux négatifs. Aussi, lors de l'utilisation de l'ACPA dans le diagnostic génétique des TSA, il est nécessaire de vérifier la densité des sondes oligonucléotidiques au niveau des régions impliquées dans les TSA des puces utilisées.

Le kit P343-*Autism1* a permis d'identifier un CNV causal chez 8,6 % des patients de notre cohorte. Chez 15 patients sans CNVs détecté en MLPA et analysés en ACPA, un seul patient (patient J) présentait un CNVs en dehors des régions explorées par la MLPA (0,07 %). Nous n'avons pas encore pu réaliser une ACPA chez l'ensemble des 74 patients sans CNV détecté en MLPA. Cela nous aurait permis de comparer les rendements diagnostiques de la MLPA et de l'ACPA dans notre cohorte. La littérature estime un rendement

diagnostique de l'ACPA de 10 % dans l'évaluation génétique des TSA [7]. En se basant sur ce pourcentage, la plupart des CNVs pathogènes ont été identifiés chez nos patients. Cependant, le rendement diagnostique réel des examens génétiques en pratique clinique est difficile à évaluer à cause du manque de données de bonne qualité ou non biaisées [6]. Les pratiques cliniques variables entre les services et les différentes plateformes de diagnostic utilisées par les laboratoires de diagnostic moléculaire compliquent l'évaluation de ce rendement diagnostique [6]. La comparaison entre notre rendement diagnostique de la MLPA et celui de l'ACPA défini dans la littérature est peut être biaisée, à cause d'un recrutement différent des patients.

Lorsque la MLPA a permis d'identifier un CNV causal, l'exploration génétique n'est pas toujours pour autant terminée. Chez ces patients, l'ACPA peut permettre d'identifier la présence de CNVs pathogènes supplémentaires, présents en dehors des régions ciblées par la MLPA. Ceci est pertinent notamment chez les patients présentant un CNV en 16p11.2 : 70 % d'entre eux présentent un CNV supplémentaire, pouvant modifier la sévérité du phénotype des patients [23].

Une des difficultés importantes dans l'utilisation d'une approche génome entier pour une application clinique, comme c'est le cas avec l'ACPA, réside dans la détermination de la causalité des variants génétiques identifiés par ces examens dans le phénotype du patient [6]. Le collège américain de génétique médicale a récemment mis à jour des recommandations et standards pour l'interprétation des CNVs constitutionnels identifiés en post-natal [6]. En général, une attention particulière est portée sur la taille des CNVs, leur position génomique, les gènes impliqués et le phénotype du patient. Si les gènes impliqués ont des fonctions compatibles avec les descriptions cliniques anormales, ou ont été précédemment décrits chez des patients avec un déséquilibre génétique et un phénotype similaire, le CNV doit être considéré comme probablement pathogène. Si l'impact clinique n'est pas clair, l'examen des parents et d'autres membres de la famille par des techniques de FISH et/ou de PCR quantitative peut être nécessaire pour interpréter et clarifier les résultats. Bien que la présence d'un CNV chez des membres de la famille en bonne santé suggère qu'il soit bénin, la faible pénétrance et l'expressivité variable du phénotype compliquent l'interprétation. Un CNV de taille plus grande, rare, et survenant *de novo*, est plus susceptible d'être pathogène. La survenue *de novo* d'un CNV n'est pas cependant une preuve absolue de sa pathogénicité, et une attention particulière devra se porter sur une éventuelle non paternité. Même lorsque le CNV est connu pour entraîner un risque significatif de TSA, il est toujours difficile de préciser le ou les gènes en cause (un CNV contient souvent plus de 10 gènes). Dans la plupart des cas, les gènes à l'intérieur d'un CNV sont nouveaux et leur fonction n'est pas connue. Par ailleurs, dans certains cas, des gènes adjacents ou en dehors de l'intervalle dupliqué ou délété peuvent également être affectés à cause d'un effet de position ou d'interruption d'un élément régulateur [6].

Pour ces raisons la MLPA peut présenter un avantage dans l'interprétation moins délicate de la causalité des CNVs dans les TSA, les régions étudiées : 15q11-q13, 16p11.2 étant les plus fréquemment en cause dans les TSA, et les mieux connues.

Conclusion

Les CNV au niveau des régions 15q11-q13, 16p11.2 étant les CNVs les plus fréquemment impliqués dans les TSA, la MLPA ciblant ces régions a un bon rendement diagnostique en comparaison à l'ACPA. Elle permet de plus d'étudier le gène *SHANK3*, contrairement à l'ACPA telle qu'elle est actuellement réalisée par la majorité des plateformes françaises de génétique constitutionnelle. Cependant, à cause du caractère uniquement ciblé de la MLPA, il n'est pas possible à l'heure actuelle de se passer de l'ACPA, analyse globale du génome, à la fois en cas de négativité de la MLPA, mais aussi pour l'identification de CNV pathogène supplémentaire.

Les rapides avancées technologiques dans le domaine du séquençage haut débit et la diminution des coûts des séquenceurs feront discuter bientôt l'intérêt du séquençage du génome entier en diagnostic clinique. Cette technique, actuellement utilisée dans le domaine de la recherche, a le potentiel d'explorer à la fois la recherche des SNVs et CNVs, au niveau de l'ensemble du génome. Elle prendra ainsi progressivement la place de l'ACPA et du séquençage haut débit en panels de gènes ou exome entier en diagnostic clinique.

Références bibliographiques

- [1] B. Devlin et S. W. Scherer, « Genetic architecture in autism spectrum disorder », *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 22, n° 3, p. 229-237, juin 2012.
- [2] M.-C. Lai, M. V. Lombardo, et S. Baron-Cohen, « Autism », *The Lancet*, vol. 383, n° 9920, p. 896-910, mars 2014.
- [3] Fédération française de psychiatrie, « Haute Autorité de Santé - Recommandations pour la pratique professionnelle du diagnostic de l'autisme ». [En ligne]. Disponible sur: http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_468812/fr/recommandations-pour-la-pratique-professionnelle-du-diagnostic-de-l-autisme. [Consulté le: 04-juill-2016].
- [4] D. H. Geschwind, « Genetics of autism spectrum disorders », *Trends Cogn. Sci. (Regul. Ed.)*, vol. 15, n° 9, p. 409-416, sept. 2011.
- [5] R. Sacco, C. Lintas, et A. M. Persico, « Autism genetics: Methodological issues and experimental design », *Science China Life Sciences*, vol. 58, n° 10, p. 946-957, oct. 2015.
- [6] Y.-H. Jiang, Y. Wang, X. Xiu, K. W. Choy, A. N. Pursley, et S. W. Cheung, « Genetic diagnosis of autism spectrum disorders: the opportunity and challenge in the genomics era », *Crit Rev Clin Lab Sci*, vol. 51, n° 5, p. 249-262, oct. 2014.
- [7] G. B. Schaefer, N. J. Mendelsohn, et for the P. P. and G. Committee, « Clinical genetics evaluation in identifying the etiology of autism spectrum disorders: 2013 guideline revisions », *Genet Med*, vol. 15, n° 5, p. 399-407, mai 2013.
- [8] J. Andrieux, « [Array-CGH for routine diagnosis of cryptic chromosomal imbalances] », *Pathol. Biol.*, vol. 56, n° 6, p. 368-374, sept. 2008.
- [9] L. Feuk, A. R. Carson, et S. W. Scherer, « Structural variation in the human genome », *Nat. Rev. Genet.*, vol. 7, n° 2, p. 85-97, févr. 2006.
- [10] E. B. Robinson, B. M. Neale, et S. E. Hyman, « Genetic research in autism spectrum disorders », *Curr. Opin. Pediatr.*, vol. 27, n° 6, p. 685-691, déc. 2015.
- [11] R. K. C. Yuen, B. Thiruvahindrapuram, D. Merico, S. Walker, K. Tammimies, N. Hoang, C. Chrysler, T. Nalpathamkalam, G. Pellecchia, Y. Liu, M. J. Gazzellone, L. D'Abate, E. Deneault, J. L. Howe, R. S. C. Liu, A. Thompson, M. Zarrei, M. Uddin, C. R. Marshall, R. H. Ring, L. Zwaigenbaum, P. N. Ray, R. Weksberg, M. T. Carter, B. A. Fernandez, W. Roberts, P. Szatmari, et S. W. Scherer, « Whole-genome sequencing of quartet families with autism spectrum disorder », *Nat. Med.*, vol. 21, n° 2, p. 185-191, févr. 2015.
- [12] N. Krumm, B. J. O'Roak, J. Shendure, et E. E. Eichler, « A de novo convergence of autism genetics and molecular neuroscience », *Trends Neurosci*, vol. 37, n° 2, p. 95-105, févr. 2014.
- [13] D. P. Moreira, K. Griesi-Oliveira, A. L. Bossolani-Martins, N. C. V. Lourenço, V. N. O. Takahashi, K. M. da Rocha, E. S. Moreira, E. Vadasz, J. G. C. Meira, D. Bertola, E. O'Halloran, T. R. Magalhães, A. C. Fett-Conte, et M. R. Passos-Bueno, « Investigation of

- 15q11-q13, 16p11.2 and 22q13 CNVs in autism spectrum disorder Brazilian individuals with and without epilepsy », *PLoS ONE*, vol. 9, n° 9, p. e107705, 2014.
- [14]N. Urraca, J. Cleary, V. Brewer, E. K. Pivnick, K. McVicar, R. L. Thibert, N. C. Schanen, C. Esmer, D. Lamport, et L. T. Reiter, « The interstitial duplication 15q11.2-q13 syndrome includes autism, mild facial anomalies and a characteristic EEG signature », *Autism Res*, vol. 6, n° 4, p. 268-279, août 2013.
- [15]E. Al Ageeli, S. Drunat, C. Delanoë, L. Perrin, C. Baumann, Y. Capri, J. Fabre-Teste, A. Aboura, C. Dupont, S. Auvin, L. El Khattabi, D. Chantereau, A. Moncla, A.-C. Tabet, et A. Verloes, « Duplication of the 15q11-q13 region: clinical and genetic study of 30 new cases », *Eur J Med Genet*, vol. 57, n° 1, p. 5-14, janv. 2014.
- [16]C. Depienne, D. Moreno-De-Luca, D. Heron, D. Bouteiller, A. Gennetier, R. Delorme, P. Chaste, J.-P. Siffroi, S. Chantot-Bastarud, B. Benyahia, O. Trouillard, G. Nygren, S. Kopp, M. Johansson, M. Rastam, L. Burglen, E. Leguern, A. Verloes, M. Leboyer, A. Brice, C. Gillberg, et C. Betancur, « Screening for genomic rearrangements and methylation abnormalities of the 15q11-q13 region in autism spectrum disorders », *Biol. Psychiatry*, vol. 66, n° 4, p. 349-359, août 2009.
- [17]J. A. Rosenfeld, L. E. Stephens, J. Coppinger, B. C. Ballif, J. J. Hoo, B. N. French, V. C. Banks, W. E. Smith, D. Manchester, A. C.-H. Tsai, K. Merrion, R. Mendoza-Londono, L. Dupuis, R. Schultz, B. Torchia, T. Sahoo, B. Bejjani, D. D. Weaver, et L. G. Shaffer, « Deletions flanked by breakpoints 3 and 4 on 15q13 may contribute to abnormal phenotypes », *Eur. J. Hum. Genet.*, vol. 19, n° 5, p. 547-554, mai 2011.
- [18]C. Lowther, G. Costain, D. J. Stavropoulos, R. Melvin, C. K. Silversides, D. M. Andrade, J. So, H. Faghfoury, A. C. Lionel, C. R. Marshall, S. W. Scherer, et A. S. Bassett, « Delineating the 15q13.3 microdeletion phenotype: a case series and comprehensive review of the literature », *Genet. Med.*, vol. 17, n° 2, p. 149-157, févr. 2015.
- [19]F. Uhlmann, « SMC complexes: from DNA to chromosomes », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 17, n° 7, p. 399-412, juill. 2016.
- [20]M. A. Gillentine et C. P. Schaaf, « The human clinical phenotypes of altered CHRNA7 copy number », *Biochem. Pharmacol.*, vol. 97, n° 4, p. 352-362, oct. 2015.
- [21]E. Bacchelli, A. Battaglia, C. Cameli, S. Lomartire, R. Tancredi, S. Thomson, J. S. Sutcliffe, et E. Maestrini, « Analysis of CHRNA7 rare variants in autism spectrum disorder susceptibility », *Am. J. Med. Genet. A*, vol. 167A, n° 4, p. 715-723, avr. 2015.
- [22]K. J. Steinman, S. J. Spence, M. B. Ramocki, M. B. Proud, S. K. Kessler, E. J. Marco, L. Green Snyder, D. D'Angelo, Q. Chen, W. K. Chung, E. H. Sherr, et Simons VIP Consortium, « 16p11.2 deletion and duplication: Characterizing neurologic phenotypes in a large clinically ascertained cohort », *Am. J. Med. Genet. A*, juill. 2016.
- [23]M. H. Duyzend, X. Nettle, B. P. Coe, C. Baker, D. A. Nickerson, R. Bernier, et E. E. Eichler, « Maternal Modifiers and Parent-of-Origin Bias of the Autism-Associated 16p11.2 CNV », *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 98, n° 1, p. 45-57, janv. 2016.
- [24]D. D'Angelo, S. Lebon, Q. Chen, S. Martin-Brevet, L. G. Snyder, L. Hippolyte, E. Hanson, A. M. Maillard, W. A. Faucett, A. Macé, A. Pain, R. Bernier, S. J. R. A. Chawner, A. David, J. Andrieux, E. Aylward, G. Baujat, I. Caldeira, P. Conus, C. Ferrari, F. Forzano,

- M. Gérard, R. P. Goin-Kochel, E. Grant, J. V. Hunter, B. Isidor, A. Jacquette, A. E. Jønch, B. Keren, D. Lacombe, C. Le Caignec, C. L. Martin, K. Männik, A. Metspalu, C. Mignot, P. Mukherjee, M. J. Owen, M. Passeggeri, C. Rooryck-Thambo, J. A. Rosenfeld, S. J. Spence, K. J. Steinman, J. Tjernagel, M. Van Haelst, Y. Shen, B. Draganski, E. H. Sherr, D. H. Ledbetter, M. B. M. van den Bree, J. S. Beckmann, J. E. Spiro, A. Reymond, S. Jacquemont, W. K. Chung, Cardiff University Experiences of Children With Copy Number Variants (ECHO) Study, 16p11.2 European Consortium, et Simons Variation in Individuals Project (VIP) Consortium, « Defining the Effect of the 16p11.2 Duplication on Cognition, Behavior, and Medical Comorbidities », *JAMA Psychiatry*, vol. 73, n° 1, p. 20-30, janv. 2016.
- [25] M. N. Loviglio, M. Leleu, K. Männik, M. Passeggeri, G. Giannuzzi, I. van der Werf, S. M. Waszak, M. Zazhytska, I. Roberts-Caldeira, N. Gheldof, E. Migliavacca, A. A. Alfaiz, L. Hippolyte, A. M. Maillard, 2p15 Consortium, 16p11.2 Consortium, A. Van Dijck, R. F. Kooy, D. Sanlaville, J. A. Rosenfeld, L. G. Shaffer, J. Andrieux, C. Marshall, S. W. Scherer, Y. Shen, J. F. Gusella, U. Thorsteinsdottir, G. Thorleifsson, E. T. Dermitzakis, B. Deplancke, J. S. Beckmann, J. Rougemont, S. Jacquemont, et A. Reymond, « Chromosomal contacts connect loci associated with autism, BMI and head circumference phenotypes », *Mol. Psychiatry*, mai 2016.
- [26] E. Hanson, R. Bernier, K. Porche, F. I. Jackson, R. P. Goin-Kochel, L. G. Snyder, A. V. Snow, A. S. Wallace, K. L. Campe, Y. Zhang, Q. Chen, D. D'Angelo, A. Moreno-DeLuca, P. T. Orr, K. B. Boomer, D. W. Evans, S. Kanne, L. Berry, F. K. Miller, J. Olson, E. Sherr, C. L. Martin, D. H. Ledbetter, J. E. Spiro, W. K. Chung, et Simons Variation in Individuals Project Consortium, « The cognitive and behavioral phenotype of the 16p11.2 deletion in a clinically ascertained population », *Biol. Psychiatry*, vol. 77, n° 9, p. 785-793, mai 2015.
- [27] M. H. Duyzend et E. E. Eichler, « Genotype-first analysis of the 16p11.2 deletion defines a new type of "autism" », *Biol. Psychiatry*, vol. 77, n° 9, p. 769-771, mai 2015.
- [28] T. L. Wenger, J. S. Miller, L. M. DePolo, A. B. de Marchena, C. C. Clements, B. S. Emanuel, E. H. Zackai, D. M. McDonald-McGinn, et R. T. Schultz, « 22q11.2 duplication syndrome: elevated rate of autism spectrum disorder and need for medical screening », *Mol Autism*, vol. 7, p. 27, 2016.
- [29] C. Li, C. Liu, B. Zhou, C. Hu, et X. Xu, « Novel microduplication of CHL1 gene in a patient with autism spectrum disorder: a case report and a brief literature review », *Mol Cytogenet*, vol. 9, p. 51, 2016.
- [30] C. S. Leblond, C. Nava, A. Polge, J. Gauthier, G. Huguet, S. Lumbroso, F. Giuliano, C. Stordeur, C. Depienne, K. Mouzat, D. Pinto, J. Howe, N. Lemièrre, C. M. Durand, J. Guibert, E. Ey, R. Toro, H. Peyre, A. Mathieu, F. Amsellem, M. Rastam, I. C. Gillberg, G. A. Rappold, R. Holt, A. P. Monaco, E. Maestrini, P. Galan, D. Heron, A. Jacquette, A. Afenjar, A. Rastetter, A. Brice, F. Devillard, B. Assouline, F. Laffargue, J. Lespinasse, J. Chiesa, F. Rivier, D. Bonneau, B. Regnault, D. Zelenika, M. Delepine, M. Lathrop, D. Sanlaville, C. Schluth-Bolard, P. Edery, L. Perrin, A. C. Tabet, M. J. Schmeisser, T. M. Boeckers, M. Coleman, D. Sato, P. Szatmari, S. W. Scherer, G. A. Rouleau, C. Betancur, M. Leboyer, C. Gillberg, R. Delorme, et T. Bourgeron, « Meta-analysis of SHANK Mutations in Autism Spectrum Disorders: a gradient of severity in cognitive impairments », *PLoS Genet.*, vol. 10, n° 9, p. e1004580, sept. 2014.

- [31]R. S. Guilherme, K. C. Soares, M. Simioni, T. P. Vieira, V. L. Gil-da-Silva-Lopes, C. A. Kim, D. Brunoni, N. B. Spinner, L. K. Conlin, D. M. Christofolini, L. D. Kulikowski, C. E. Steiner, et M. I. Melaragno, « Clinical, cytogenetic, and molecular characterization of six patients with ring chromosomes 22, including one with concomitant 22q11.2 deletion », *Am. J. Med. Genet. A*, vol. 164A, n° 7, p. 1659-1665, juill. 2014.
- [32]S. U. Dhar, D. del Gaudio, J. R. German, S. U. Peters, Z. Ou, P. I. Bader, J. S. Berg, M. Blazo, C. W. Brown, B. H. Graham, T. A. Grebe, S. Lalani, M. Irons, S. Sparagana, M. Williams, J. A. Phillips, A. L. Beaudet, P. Stankiewicz, A. Patel, S. W. Cheung, et T. Sahoo, « 22q13.3 deletion syndrome: clinical and molecular analysis using array CGH », *Am. J. Med. Genet. A*, vol. 152A, n° 3, p. 573-581, mars 2010.
- [33]J. J. Luciani, P. de Mas, D. Depetris, C. Mignon-Ravix, A. Bottani, M. Prieur, P. Jonveaux, A. Philippe, G. Bourrouillou, B. de Martinville, B. Delobel, L. Vallee, M.-F. Croquette, et M.-G. Mattei, « Telomeric 22q13 deletions resulting from rings, simple deletions, and translocations: cytogenetic, molecular, and clinical analyses of 32 new observations », *J. Med. Genet.*, vol. 40, n° 9, p. 690-696, sept. 2003.
- [34]L. M. Oberman, L. Boccutto, L. Cascio, S. Sarasua, et W. E. Kaufmann, « Autism spectrum disorder in Phelan-McDermid syndrome: initial characterization and genotype-phenotype correlations », *Orphanet J Rare Dis*, vol. 10, p. 105, 2015.
- [35]G. Cai, L. Edelmann, J. E. Goldsmith, N. Cohen, A. Nakamine, J. G. Reichert, E. J. Hoffman, D. M. Zurawiecki, J. M. Silverman, E. Hollander, L. Soorya, E. Anagnostou, C. Betancur, et J. D. Buxbaum, « Multiplex ligation-dependent probe amplification for genetic screening in autism spectrum disorders: Efficient identification of known microduplications and identification of a novel microduplication in ASMT », *BMC Med Genomics*, vol. 1, p. 50, oct. 2008.
- [36]A. Bremer, M. Giacobini, M. Nordenskjöld, K. Brøndum-Nielsen, M. Mansouri, N. Dahl, B. Anderlid, et J. Schoumans, « Screening for copy number alterations in loci associated with autism spectrum disorders by two-color multiplex ligation-dependent probe amplification », *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.*, vol. 153B, n° 1, p. 280-285, janv. 2010.

Annexes

Annexe 1. Localisation des sondes du kit de MLPA P343- <i>Autism1</i> en fonction des régions chromosomiques ciblées	64
Annexe 2. Détermination des Vrais et faux positifs et négatifs pour l'évaluation des performances de la MLPA, kit P343- <i>Autism 1</i>	66
Annexe 3. Exemples de résultats de MLPA pour deux patients, électrophorégramme et nombre de copies pour chaque locus.	68

Annexe 1. Localisation des sondes du kit de MLPA P343-*Autism1* en fonction des régions chromosomiques ciblées

Région 15q11-q13

Nom des paires de sondes	Position génomique* [Hg19]	taille	position chromosomique	gène	exon
12718-L13906	chr15:25297201	214	15q11.2	SNRPN-HB2-85	SNO
12720-L13795	chr15:25307380	475	15q11.2	SNRPN-HB2-85	SNO
10880-L11550	chr15:25620826	197	15q11.2	UBE3A	6
04620-L14668	chr15:25616647	160	15q11.2	UBE3A	7
10883-L11553	chr15:25601842	142	15q11.2	UBE3A	9
10886-L14677	<i>chr15:25599462</i>	244	15q11.2	UBE3A	12
01317-L00864	chr15:25585302	256	15q11.2	UBE3A	13
12964-L14669	chr15:26107943	136	15q12	ATP10A	1
11165-L12883	chr15:25932907	270	15q12	ATP10A	16
10867-L11537	chr15:27017562	355	15q12	GABRB3	4
10868-L11538	chr15:26866572	184	15q12	GABRB3	7
10870-L11540	chr15:26828547	319	15q12	GABRB3	8
10872-L11542	chr15:26825417	148	15q12	GABRB3	9
10874-L11544	chr15:26812788	382	15q12	GABRB3	10
10875-L11545	chr15:26806287	292	15q12	GABRB3	11
01315-L09339	chr15:26793149	220	15q12	GABRB3	12
02041-L03725	chr15:28344344	445	15q13.1	OCA2	1
02040-L01553	chr15:28096521	436	15q12	OCA2	22
01314-L00867	chr15:29409457	202	15q13.1	APBA2	14
08377-L08231	chr15:29561447	178	15q13.1	NDNL2	1
08389-L14671	chr15:30113652	300	15q13.1	TJP1	Intron 1
08397-L14672	chr15:31294123	373	15q13.3	TRPM1	27
08376-L08230	chr15:31664721	166	15q13.3	KLF13	2
12956-L08237	chr15:32404027	286	15q13.3	CHRNA7	4
12954-L14464	chr15:32972019	492	15q13.3	SCG5	3
12951-L14742	chr15:32988841	427	15q13.3	SCG5	6

Région 16p11.2

Nom des paires de sondes	Position génomique* [Hg19]	taille	position chromosomique	gène	exon
11677-L12448	chr16:28997152	481	16p11.2	LAT	4
11672-L12443	chr16:29675327	364	16p11.2	SPN	3
11669-L12440	chr16:29820855	238	16p11.2	MAZ	5
11673-L12444	chr16:29821665	418	16p11.2	MAZ	6
00550-L22423	chr16:29845274	344	16p11.2	MVP	5
11668-L12439	chr16:29910344	208	16p11.2	SEZ6L2	1
11667-L14670	chr16:30006474	172	16p11.2	HIRIP3	3
11674-L12445	chr16:30006017	454	16p11.2	HIRIP3	4
13162-L12447	chr16:30020503	226	16p11.2	DOC2A	4
11675-L12446	chr16:30128973	465	16p11.2	MAPK3	5
11671-L12442	chr16:30365260	337	16p11.2	CD2BP2	4

Gène SHANK3 en 22q13.3

Nom des paires de sondes	Position génomique* [Hg19]	taille	position chromosomique	gène	exon
06784-L06376	chr22:51115045	309	22q13.33	SHANK3	3
14190-L15800	chr22:51142628	391	22q13.33	SHANK3	15
06787-L07383	chr22:51160715	232	22q13.33	SHANK3	22

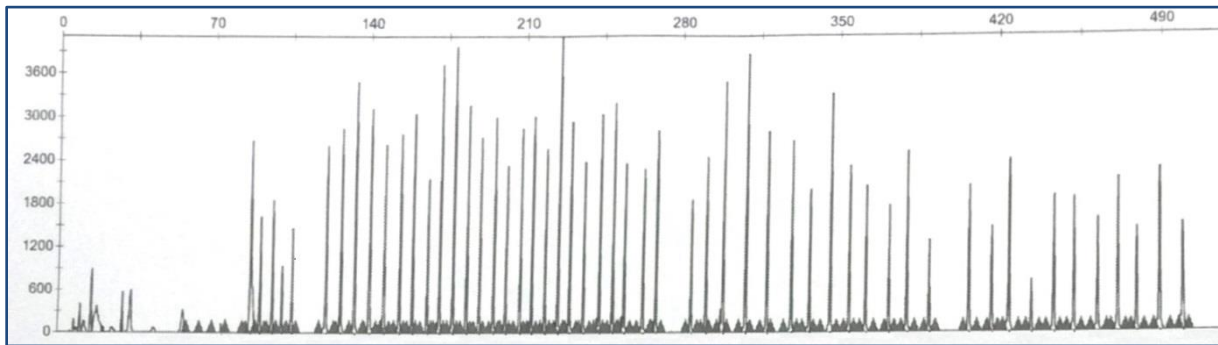
*La position génomique donnée est celle de la 1^{ère} base de la sonde en partant de l'extrémité télomérique du bras court du chromosome.

Annexe 2. Détermination des vrais et faux positifs et négatifs pour l'évaluation des performances de la MLPA avec le kit P343-Autism 1

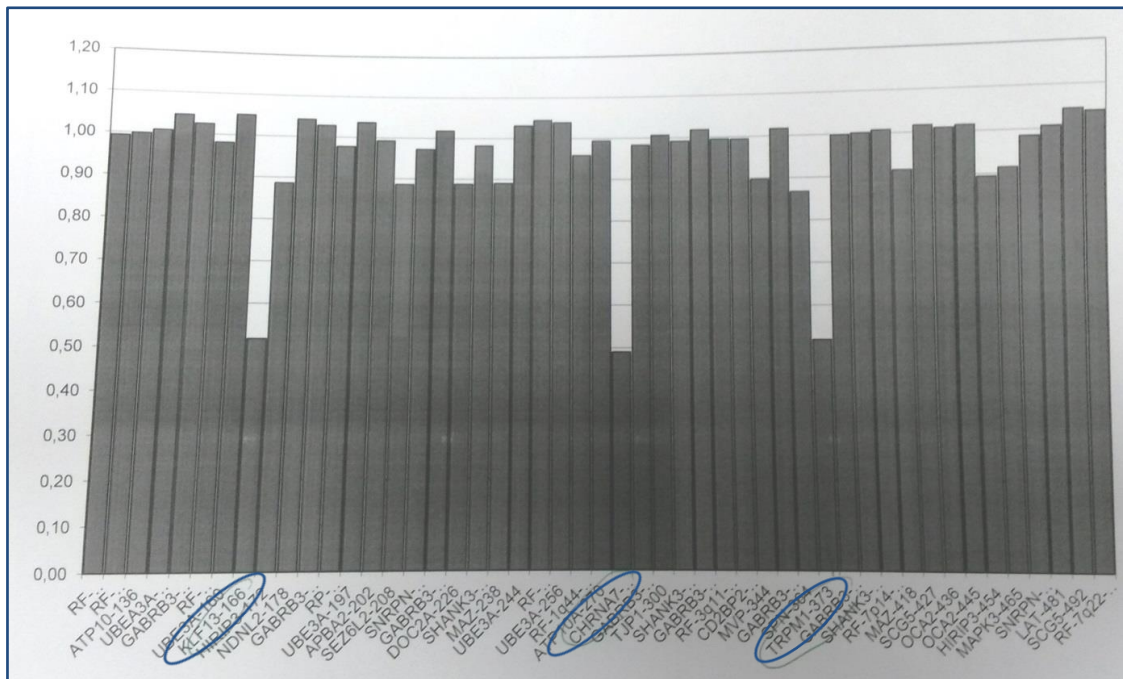
Patient	MLPA P343-Autism 1	Résultat de la méthode de confirmation	Conclusion
A	.rsa 15q11q13(P343)x2, 16p11.2(P343)x2, 22q13.33(P343)x2	arr(1-22)x2,(XY)x1	VN : confirmation par ACPA
B	.rsa 15q11q13(P343)x2, 16p11.2(P343)x2, 22q13.33(P343)x2	arr[hg19] 22q11.21(18,894,835- 21,505,417)X1	VN : confirmation par ACPA
C	.rsa 15q11q13(P343)x2, 16p11.2(P343)x2, 22q13.33(P343)x2	.arr(1-22)x2,(XY)x1	VN : confirmation par ACPA
D	.rsa 15q11q13(P343)x2, 16p11.2(P343)x2, 22q13.33(P343)x2	.arr(1-22)x2,(XY)x1	VN : confirmation par ACPA
E	.rsa15q13 (NDNL2,APBA2,TJP1)x1	.ish del(15)(q13q13)(RP11-408F10-)	VP : confirmation par FISH
F	.rsa 15q11q13(P343)x2, 16p11.2(P343)x2, 22q13.33(P343)x2	ségrégation familiale : anomalie chez le fils de transmission maternelle	VN : père non transmetteur
G	.rsa 15q11q13(P343)x2, 16p11.2(P343)x2, 22q13.33(P343)x2	arr(1-22,X)x2	VN : confirmation par ACPA
H	.rsa 15q11q13(P343)x2, 16p11.2(P343)x2, 22q13.33(P343)x2	arr(1-22,X)x2	VN : confirmation par ACPA
I	.rsa 15q11q13(P343)x2, 16p11.2(P343)x2, 22q13.33(P343)x2	arr(1-22)x2,(XY)x1	VN : confirmation par ACPA
J	.rsa 15q11q13(P343)x2, 16p11.2(P343)x2, 22q13.33(P343)x2	arr 1p13.2(114,037,681-114,551,183)x3, 3q29(196,405,567-197,258,691)x3	VN : confirmation par ACPA
K	.rsa 15q11q13(P343)x2, 16p11.2(P343)x2, 22q13.33(P343)x2	.arr(1-22)x2,(XY)x1	VN : confirmation par ACPA
L	.rsa	arr(1-22)x2,(XY)x1	VN : confirmation

	15q11q13(P343)x2, 16p11.2(P343)x2, 22q13.33(P343)x2		par ACPA
M	.rsa 15q11q13(P343)x2, 16p11.2(P343)x2, 22q13.33(P343)x2	arr(1-22)x2,(XY)x1	VN : confirmation par ACPA
N	.rsa16p11.2(P343)x1	arr16p11.2(29,673,954-22,509,254)x1	VP : confirmation par ACPA
O	.rsa 15q11q13(P343)x2, 16p11.2(P343)x2, 22q13.33(P343)x2	arr(1-22)x2,(XY)x1	VN : confirmation par ACPA
P	.rsa 15q11q13(P343)x2, 16p11.2(P343)x2, 22q13.33(P343)x2	arr(1-22)x2,(XY)x1	VN : confirmation par ACPA
Q	.rsa15q13 (TRPM1,KLF13,CHRNA7)x1	46,XY.ish del(15)(q13.3q13.3) (RP11-106H13-)	VP : confirmation par FISH
R	.rsa 15q11q13(P343)x2, 16p11.2(P343)x2, 22q13.33(P343)x2	arr(1-22)x2,(XY)x1	VN : confirmation par ACPA
S	.rsa 15q11q13(P343)x2, 16p11.2(P343)x2, 22q13.33(P343)x2	arr(1-22)x2,(XY)x1	VN : confirmation par ACPA
T	.rsa 15q11q13(P343)x2, 16p11.2(P343)x2, 22q13.33(P343)x2	arr(1-22)x2,(XY)x1	VN : confirmation par ACPA
U	.rsa16p11.2(P343)x3	ségrégation familiale : anomalie héritée maternelle	VP : transmission familiale
V	.rsa16p11.2(P343)x3	ségrégation familiale : anomalie transmise chez le fils	VP : grand-mère transmettrice
W	.rsa 15q11q13(P343)x2, 16p11.2(P343)x2, 22q13.33(P343)x2	ségrégation familiale : anomalie chez le fils de transmission paternelle	VN : mère non transmettrice
X	.rsa22q13(SHANK3)x1	46,XY,r(22)(p10q13) .ish r(22)(NOR-,D22Z1+,TUPLE1+, TBX1+,SHANK3-)	VP : confirmation en FISH
Y	.rsa16p11.2(P343)x3	arr[hg19] 16p11.2 (29,657,192-30,188,269)x3 pat	VP : confirmation par ACPA

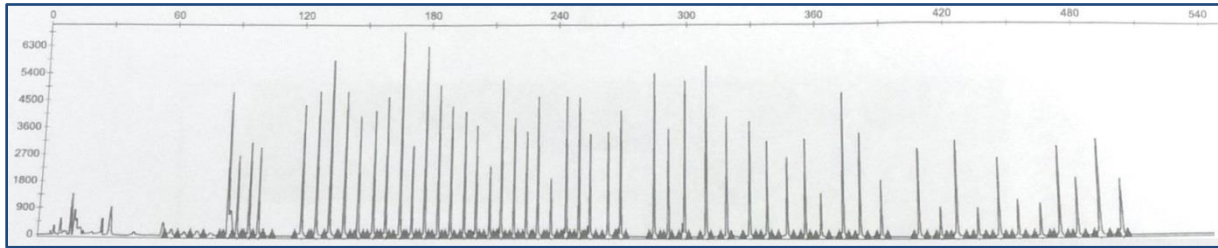
Annexe 3. Exemples de résultats obtenus en MLPA, kit P343-*Autism1* pour deux patients : électrophorégramme et nombre de copies pour chaque *locus*.



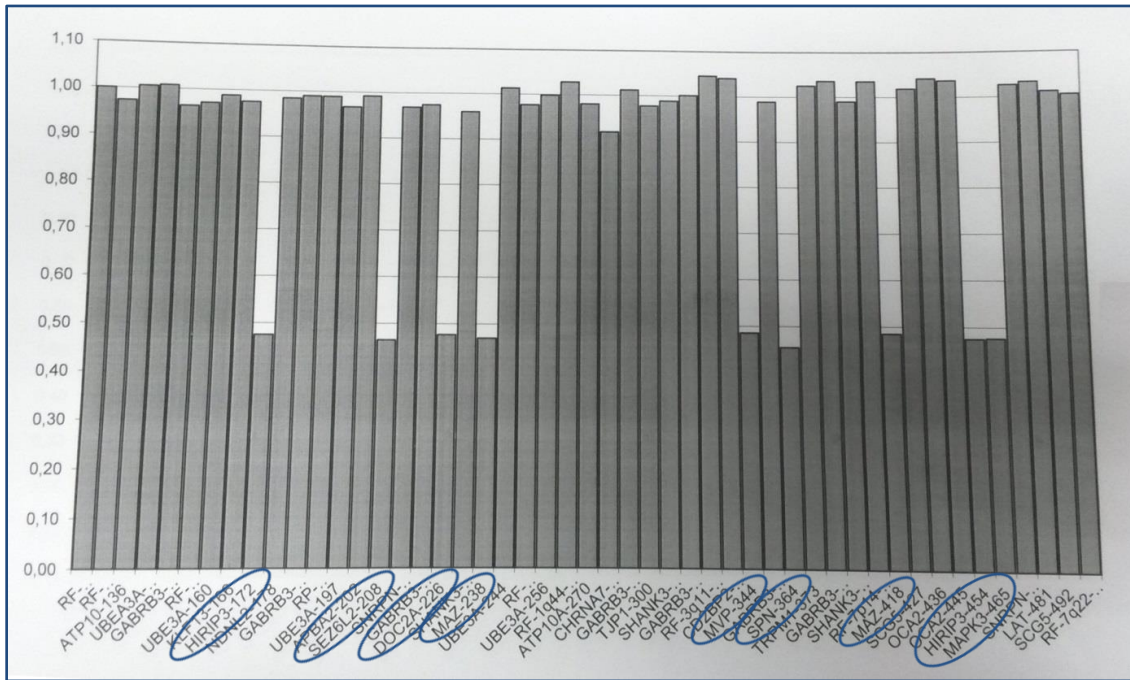
Electrophorégramme du patient 3



Valeur du nombre de copies de chaque *locus* pour le patient 3
 On observe des valeurs d'environ 0,5 pour les loci *TRPM1*, *KLF13*, *CHRNA7* : une délétion BP4-BP5 en 15q13 impliquant ces 3 gènes est mise en évidence.



Electrophorogramme du patient 6



Valeur du nombre de copies de chaque *locus* pour le patient 6.

On observe des valeurs comprises entre 0,45 et 0,5 pour les gènes *SPN*, *MAZ*, *MVP*, *SEZ6L2*, *HIRIP3*, *DOC2A*, *MAPK3* : une délétion en 16p11.2 impliquant ces gènes est mise en évidence.

Serment d'Hippocrate

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Je serai reconnaissant envers mes maîtres, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.





Intérêt de la MLPA ciblant les régions 15q11-q13, 16p11.2 et 22q13.3 dans la stratégie de diagnostic génétique des troubles du spectre autistique

Introduction : Les variations du nombre de copies (CNVs) sont une étiologie importante des troubles du spectre autistique (TSA). Ces CNVs sont identifiés grâce à l'analyse chromosomique sur puce à ADN (ACPA), actuellement l'examen de 1^{ère} intention dans les TSA, chez environ 10 % des patients. Une technique alternative, mais ciblée sur des *loci* particuliers, est l'amplification multiplexe de sondes dépendant d'une ligation (MLPA), de réalisation technique plus simple et moins coûteuse que l'ACPA.

L'objectif était d'étudier l'intérêt et le rendement diagnostique de la MLPA ciblant les régions 15q11-q13, 16p11.2 et 22q13.3 dans la stratégie de diagnostic génétique des TSA.

Méthodes : une analyse par MLPA, kit p343-*Autism1* (MRC Holland), a été réalisée chez 81 patients présentant un TSA ou des caractéristiques autistiques, adressés à l'hôpital mère enfant de Limoges entre le mois de janvier 2014 et le mois de février 2016.

Résultats : un CNV a été mis en évidence chez 7 patients (8,6 %) : 4 au niveau de la région 15q11-q13 : une délétion BP3-BP4 maternelle, une duplication BP2-BP4 et deux duplications du gène *CHRNA7* seul ; deux duplications au niveau de la région 16p11.2, une paternelle et une de novo ; une délétion au niveau de la région 22q13.3, sur un chromosome 22 en anneau.

Discussion : La MLPA est une technique performante, qui a un bon rendement diagnostique en comparaison à l'ACPA. A cause du caractère uniquement ciblé de la MLPA, l'ACPA reste l'examen diagnostique à privilégier en 1^{ère} intention, mais nécessite de vérifier que les puces utilisées aient une densité suffisante de sondes oligonucléotidiques au niveau de toutes les régions connues impliquées dans les TSA.

Mots-clés : troubles du spectre autistique, diagnostic génétique, CNV, MLPA

Interest of MLPA targeting the *loci* 15q11-q13, 16p11.2 and 22q13.3 in the diagnostic strategy of autism spectrum disorders

Background: Copy number variations (CNVs) are an important cause of autism spectrum disorders. Array-genomic comparative hybridization (aCGH), currently the first-tier genetic test in ASD, allows to identify CNVs in around 10% of patients. As compared to aCGH, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification MLPA is a low cost and technically uncomplicated, but targeted method.

The aim was to study the interest and the diagnostic yield of MLPA targeting the *loci* 15q11-q13, 16p11.2 and 22q13.3 in the diagnostic strategy of ASD.

Methods: We studied 81 patients with an ASD or some autistic features, at the "mother-children" hospital of Limoges. Blood samples were analyzed with the p343-*Autism1* MLPA kit (MRC Holland).

Results: we identified a CNV in 7 (8,6%) patients : 4 at 15q11-q13 : a BP3-BP4 maternal deletion, a BP2-BP4 duplication, and 2 *CHRNA7* duplications ; a paternal duplication and one *de novo* at 16p11.2 ; a 22q13.3 deletion on a ring 22 chromosome.

Discussion: The MLPA test has a good performance and a good diagnostic yield, as compared to aCGH. Because MLPA is only a targeted test, aCGH remain the first-tier genetic test. However, we recommend to check the array used: the oligonucleotide probe density must be sufficient to detect CNVs at all known loci in ASD.

Keywords: autism spectrum disorders, genetic diagnosis, CNV, MLPA

