

**Faculté de médecine et médecine dentaire**

**PHENOTYPE DES PATIENTS ATTEINTS DE  
SCLEROSE TUBEREUSE DE BOURNEVILLE  
AVEC GENOTYPAGE NEGATIF**

Auteur : Justin Jullien  
Promotrice : Dr. Valentine Gillion  
Lectrices : Pr. Marie-Cécille Nassogne et Dr. Nathalie Godefroid  
Année académique 2019-2020  
Master en Médecine

# ABSTRACT

---

*Tuberous Sclerosis Complex* is a neurocutaneous disease characterized by the development of many benign tumors called Hamartomas. Mutations in TSC1 and TSC2 genes are responsible for most cases of Tuberous Sclerosis, in 20% and 60% of cases respectively. Nevertheless, 15-20% clinically diagnosed patients stay non-genotyped. This may result from limitation of Sanger sequencing and the few cells presenting mosaicism. The objectives of our study were to (i) analyze the patients in whom a mutation has been detected by a New Generation Sequencing (NGS) and to (ii) compare the occurrence rate of their diverse manifestations with the ones found in other groups of our study and in different studies.

We reviewed all cases of the CUSL tuberous Sclerosis patient cohort (103 patients). We formed six different groups to be analyzed : TSC1 genotyped patients, TSC2 genotyped patients, TSC1 by Sanger's method (individually or via a related party) genotyped patients, TSC2 by Sanger's method genotyped patients, TSC1 by NGS method genotyped patients and TSC2 by NGS method genotyped patients. Among the 81 patients who have realized a Sanger sequencing, 18 are TSC1 (28%), 39 are TSC2 (48%) and 25 have no mutation identified (NMI). For each group, we analyzed the occurrence rate of neuropsychological disorders, epilepsy, NSE, cortical tubers, SEGA, hypomelanotic macules, facial angiofibroma, shagreen patches, renal lesions and renal angiomyolipoma.

Among the 25 NMI patients, 19 underwent NGS genetic analysis. The NGS sequencing revealed the presence of a mutation in 16 patients, 6 of which in the TSC1 and 10 in the TSC2. The 3 non-genotyped patients show a low phenotype and the diagnostic could be reviewed. Among the 16 genotyped patients, we found a low-level mosaicism in 2 patients.

Our study is limited to the restricted number of NGS genotyped patient in our cohort, the incomplete genotyping of the TSC cohort and the collection of retrospective data.

Finally, NGS genotyped patient show less frequently neuropsychological disorders, epilepsy, hypomelanotic macules and AML than Sanger genotyped patients. The rest of the manifestations seem to be similar in terms of frequency. It also seems that the NGS diagnosed patients have more manifestations than NMI patients. None of the lesions analyzed seem to be characteristic of NGS diagnosed patients.

# RESUME

---

*La Sclérose tubéreuse de Bourneville (STB)* est une maladie neuro-cutanée caractérisée par le développement de nombreuses tumeurs bénignes appelées hamartomes. Les mutations des gènes *TSC1* et *TSC2* sont respectivement retrouvées chez approximativement 20% et 60% des patients. Cependant 15-20% des patients diagnostiqués cliniquement restent non génotypés. Ceci résulte de la limite du séquençage par Sanger et de la présence de mosaïcisme intéressant un nombre faible de cellules. Notre travail a consisté en l'analyse des patients chez qui une mutation a été détectée après un séquençage nouvelle génération (NGS) en comparant les fréquences d'apparition des diverses manifestations avec celles des autres groupes de patients de notre cohorte et celles retrouvées dans d'autres études.

Nous avons d'abord revu tous les dossiers des patients de la cohorte STB des CUSL (103 patients) et nous avons formé différents groupes que nous avons étudiés : les patients génotypés *TSC1*, les patients génotypés *TSC2*, les patients génotypés *TSC1* par la méthode de Sanger (individuellement ou via un apparenté), les patients génotypés *TSC2* par la méthode de Sanger, les patients génotypés *TSC1* par méthode NGS, les patients génotypés *TSC2* par méthode NGS. Parmi les 81 patients ayant effectué un séquençage par Sanger, 18 ont été diagnostiqués *TSC1* (28%), 39 ont été diagnostiqués *TSC2* (48%) et 25 n'ont pas eu de mutation identifiée (31%). Pour chaque groupe, nous avons étudié la fréquence d'apparition des troubles neuropsychologiques, d'épilepsie, des NSE, des tubers corticaux, des SEGA, des macules hypomélaniques, des angiofibromes de la face, des « peau de chagrin », des lésions rénales et des AML.

Parmi les 25 patients NMI, 19 ont réalisé une analyse génétique par méthode NGS. La technique de séquençage par NGS a révélé chez 16 patients la présence d'une mutation avec 6 mutations dans le gène *TSC1* et 10 dans le gène *TSC2*. Les 3 patients non génotypés présentent un phénotype faible pour lequel le diagnostic pourrait être à revoir. Parmi les 16 patients, on a retrouvé dans 2 cas un mosaïcisme à faible taux de mosaïcisme.

Les limites de notre étude comprennent le nombre restreint de patients génotypés par NGS, le génotypage incomplet de la cohorte STB et le recueil rétrospectif des données.

Au final, les patients génotypés par la NGS présentent moins fréquemment des troubles neuropsychologiques, des crises d'épilepsie, des macules hypomélaniques et des AML que chez les patients génotypés par Sanger. Le reste des manifestations semble être similaire en terme de fréquence. Il semble également que les patients diagnostiqués par NGS présentent plus de manifestations que les patients NMI. Aucune lésion étudiée ne semble être caractéristique des patients diagnostiqués par NGS.

# REMERCIEMENTS

---

Par ces quelques lignes, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont soutenu et aidé de près ou de loin dans la réalisation de ce mémoire de recherche clinique.

Pour commencer, je remercie le Dr. Valentine Gillion qui m'a accompagné et aiguillé durant ces trois dernières années dans ce qui restera une de mes expériences les plus constructives, le Pr. Yves Sznajer pour sa mise à disposition des données génétiques, le Dr. Marie Ravoet pour son expertise en génétique, ainsi que tout l'ensemble du service de néphrologie des CUSL pour leur bon accueil et leur disponibilité.

Je remercie également le Pr. Marie-Cécille Nassogne et le Dr. Nathalie Godefroid pour la lecture de ce travail.

Pour finir, je ne pourrai jamais suffisamment remercier l'ensemble de ma famille pour son soutien inconditionnel, et sans qui relever l'ensemble des défis que constituent les études n'aurait pas pu être possible. Un tout grand merci à chacun et plus particulièrement à maman pour sa relecture approfondie, à mon frère Lou pour son aide quant à la rédaction de mon abstract, à ma sœur Adèle pour tous ses précieux conseils durant ce master de médecine et à Chloé pour m'avoir accompagné durant cette dernière année d'étude par sa présence de chaque instant et sa bonne humeur communicative.

# TABLE DES MATIÈRES

---

<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>RESUME</b> .....	<b>3</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>4</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>5</b>
<b>NOMENCLATURE</b> .....	<b>6</b>
<b>1. REVUE DE LA LITTÉRATURE</b> .....	<b>7</b>
1.1 INTRODUCTION.....	7
1.2 GÉNÉTIQUE ET PHYSIOPATHOLOGIE .....	7
1.3 MANIFESTATIONS CLINIQUES :.....	10
a. <i>Neurologiques/psychiatriques</i> .....	10
b. <i>Rénales</i> :.....	11
c. <i>Cardiaques</i> :.....	12
d. <i>Cutanées</i> :.....	13
e. <i>Oculaires</i> :.....	14
f. <i>Pulmonaires</i> :.....	14
1.4 DIAGNOSTIC (SELON LE CONSENSUS 2012 INTERNATIONAL) <sup>(3) (4)</sup> .....	15
1.5 ANALYSES GENÉTIQUES.....	16
1.5.1 METHODE SANGER.....	16
1.5.2 METHODE NGS UTILISEE : ILLUMINA.....	17
1.5.3 PATIENT NMI.....	19
1.5.4 MOSAICISME.....	20
1.6 TRAITEMENT :.....	21
<b>2. METHODE</b> .....	<b>23</b>
2.2 POPULATION & METHODE.....	24
<b>3. RÉSULTATS : REVUE DE LA COHORTE</b> .....	<b>25</b>
3.2 RÉSULTATS.....	27
3.2.1. <i>ATTEINTES NEUROLOGIQUES</i> .....	27
3.2.2. <i>ATTEINTES CUTANÉES</i> .....	29
3.2.3 <i>ATTEINTES RENALES</i> .....	30
3.3 SYNTHÈSE DES RÉSULTATS.....	31
3.4 MUTATIONS CHEZ LES PATIENTS DIAGNOSTIQUES PAR NGS.....	32
<b>4. DISCUSSION</b> .....	<b>33</b>
<b>5. CONCLUSION</b> .....	<b>38</b>
<b>6. RÉFÉRENCES</b> .....	<b>39</b>

# NOMENCLATURE

---

AML	Angiomyolipome
CT	Computerized tomography
CUSL	Clinique Universitaire de St-Luc
ECG	Electrocardiogramme
EEG	Electroencéphalogramme
IEC	Inhibiteur de l'enzyme de conversion
IRM	Imagerie par résonance magnétique
LAM	Lymphangioliomyomatose
LOH	Loss of heterozygotie
mTOR	Mammalian target of Rapamycine
NGS	Next generation sequencing
NMI	No mutation identified
NSE	Nodules sous-épendymaires
PCR	Polymerase chain reaction
SEGA	Subependymal giant cell astrocytome
STB	Sclérose Tubéreuse de Bourneville
TC	Tubers corticaux
US	Ultrasound

# 1. REVUE DE LA LITTÉRATURE

---

## 1.1 INTRODUCTION

La Sclérose tubéreuse de Bourneville (STB) est une affection autosomique dominante, décrite pour la première fois en 1880 par le Docteur DM. Bourneville dans le cadre de ses recherches sur des patients présentant de la sclérose sur certaines circonvolutions du cortex cérébral provoquant de l'épilepsie, et des manifestations dermatologiques. Sa prévalence est estimée entre 1/6000<sup>(1),(2)</sup> et 1/10000<sup>(3)</sup>, mais elle serait cependant sous-estimée, car certains patients sont asymptomatiques ou paucisymptomatiques.

Cette maladie multisystémique est caractérisée par un développement de nombreuses tumeurs bénignes appelées hamartomes dans divers organes : cerveau, peau, rein, et de façon moins fréquente : yeux, cœur, poumons. Les hamartomes sont des tumeurs bénignes constituées d'un mélange anormal d'éléments tissulaires normaux<sup>(2)</sup>.

Ces dernières années, les recherches concernant la maladie ont avancé grâce aux études sur les drosophiles, la compréhension de voies métaboliques exploitables pour traiter la maladie et par l'utilisation des techniques de séquençage nouvelle génération de l'ADN (NGS).



Figure 1 : Docteur DM. Bourneville

## 1.2 Génétique et physiopathologie

Le premier gène à avoir été identifié est le gène TSC2 en 1987 suivi en 1993 par l'identification du gène TSC1. La compréhension de la physiopathologie et des voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la maladie a permis de trouver les traitements efficaces et ciblés pour la prise en charge de la maladie.

TSC1 code pour l'«hamartine», une protéine de 140-kD. Le gène TSC1 est localisé sur le chromosome 9q34, codant un transcrit de 8.6 kb contenant 23 exons et englobant 55 kb d'ADN génomique.<sup>(5)</sup>

TSC2 code pour la «tubérine», une protéine de 200-kD possédant un domaine GAP en carboxy-terminal. La tubérine n'a aucune homologie avec l'hamartine. Le gène TSC2 est localisé sur le chromosome 16p13, codant un transcrit de 5.5kb contenant 41 exons et englobant 40 kb d'ADN génomique.<sup>(5)</sup> Actuellement, plus de 1500 mutations différentes ont été identifiées, incluant des faux-sens, non-sens, décalage du cadre de lecture, délétion ect, ... Les mutations sont habituellement retrouvées en région 3'UTR pour le gène TSC1 et au niveau des introns 40 et 41 pour le gène TSC2.<sup>(6\*)</sup>

TSC1 et TSC2 interagissent ensemble pour former un hétérodimère ayant le rôle d'être un suppresseur de tumeurs, exprimé dans de multiples organes tels que : rein, foie, cerveau, peau, poumon, pancréas, rétine... TSC1 est localisé dans les centrosomes alors que TSC2 est exprimé dans l'appareil de Golgi ainsi que dans le noyau.<sup>(5)</sup>

Le rôle physiologique de l'hétérodimère est d'inhiber la cascade mTOR (mammalian target of rapamycine). En situation physiologique normale, la phosphorylation par la protéine kinase B (AKT) de TSC2 mène à son inactivation et conduit à l'activation de la cascade. mTOR est une sérine-thréonine kinase possédant un rôle central dans la croissance et la prolifération cellulaire par la régulation de la biosynthèse des ribosomes et la traduction de l'ARNm en protéines, en réponse aux facteurs de croissance, acides aminés, nutriments, hypoxie. mTOR contrôle la phosphorylation de 2 molécules effectrices : p70S6 kinase (phosphorylating ribosomal protein S6), kinase qui augmente la biogenèse des ribosomes et 4E-BP1 (4E-binding protein 1) qui permet la traduction.

Le lien entre l'hétérodimère TSC1 et TSC2 et la cascade mTOR est rempli par Rheb (RAS-homologue expressed in brain) ; Rheb est une GTPase en aval de TSC2, et possède 2 formes, la forme active Rheb-GTP et la forme inactive, stimulée par TSC2, Rheb-GDP. Une perte de fonction de TSC2 mène à une augmentation de la forme GTP et une activation de la cascade mTOR. La perte d'interaction est causée par une mutation dans le GAP domaine de TSC2, suggérant que son activité est essentielle pour le contrôle de Rheb. Chez les patients atteints d'une mutation TSC1, on retrouve néanmoins le même phénotype qu'une mutation TSC2, suggérant que TSC1 joue un rôle encore inconnu dans l'activité GAP de TSC2. <sup>(5)</sup>

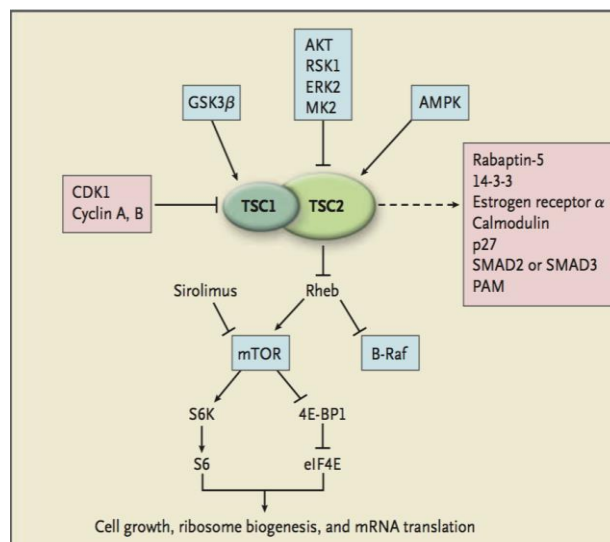


Figure 1 : voie cellulaire impliquant le complexe TSC1 et TSC2 <sup>(5)</sup>

Selon la théorie du double hit de Knudson, pour qu'une maladie apparaisse, il est nécessaire qu'un des deux allèles présente une mutation somatique ou germinale. Plus tard, durant la vie du patient, une seconde mutation (second hit) sur le deuxième allèle va apparaître, il n'y aura plus que les 2 allèles mutés, permettant à la maladie de se manifester. En ce qui concerne les gènes suppresseurs de tumeurs, il faut que les 2 allèles TSC1 ou TSC2 soient mutés pour qu'il y ait apparition des lésions de la STB. La majorité des secondes mutations implique une large délétion causant la perte des loci environnants. On appelle ces mutations : perte d'hétérozygotie (LOH) ; elles sont retrouvées en grand nombre dans les différentes manifestations de la maladie, mais principalement au niveau rénal et moins au niveau cérébral. <sup>(5)</sup>

Le diagnostic repose sur l'identification d'une des 2 mutations pathogènes responsables de la maladie, au niveau des gènes TSC1 ou TSC2. Ces deux mutations suffisent pour établir le diagnostic de la maladie dans environ 85 à 90% des cas<sup>(3)</sup>, mais un résultat négatif n'exclut pas pour autant la maladie. La mutation TSC2 est rapportée plus fréquemment que la mutation TSC1 avec respectivement 63,3% et 19,7% ; les 17% restant ne présentent aucune mutation identifiable (NMI)<sup>(5)</sup>. La fréquence moins importante de la mutation TSC1 est généralement attribuée au fait que le locus du gène TSC1 est plus petit et moins complexe réduisant le risque de large réarrangement de l'ADN<sup>(6)</sup>. Il y a encore quelques années, le gold standard était le séquençage Sanger (voir figure), mais grâce à la technique par NGS (Next-Generation Sequencing), on a découvert qu'une partie de ces patients NMI (No Mutation Identified) présentait soit un mosaïcisme, soit une mutation intronique, soit une mutation dans une région promotrice du gène (ces régions peuvent être très éloignées de la séquence codante), soit une mutation inconnue auparavant dans des exons du gène.

## 1.3 Manifestations cliniques :

Les symptômes apparaissent généralement précocement, mais l'âge d'apparition dépend principalement du type de système atteint.

Les manifestations chez les patients atteints de la mutation TSC2 sont souvent plus sévères que celles TSC1, avec des retards mentaux plus importants et des anomalies cérébrales et rénales plus nombreuses <sup>(6\*)</sup>. Les mutations en mosaïque et les NMI ont un phénotype moins marqué également, ce qui explique la difficulté de diagnostic.

Une évaluation clinique est conseillée pour les membres de la famille au premier degré d'un patient <sup>(2)</sup>.

### a. Neurologiques/psychiatriques

Il existe 3 lésions principales : les hamartomes glioneuronaux (tubers corticaux), les nodules sous-épendymaires (NSE) et les astrocytomes à cellules géantes (subependymal giant cell astrocytome ou SEGA). Tubers coticaux et NSE sont les principales manifestations neurologiques (respectivement 82.2%<sup>(7)</sup> et 78.2%<sup>(7)</sup>), suivies par les SEGA (5-15%<sup>(4)</sup>). Chaque patient suspect d'être atteint de la STB devrait réaliser une IRM avec et sans gadolinium pour découvrir des lésions cérébrales. Si ce n'est pas possible, on réalise un scanner ou une échographie cérébrale en néonatal et chez les enfants lorsque la fontanelle est encore ouverte. Un EEG peut être réalisé également durant l'enfance lorsqu'il y a suspicion d'activité épileptiforme<sup>(2)</sup>. Les NSE sont des amas de cellules situés sur les bords des ventricules, formant des tumeurs cérébrales bénignes pouvant croître et devenir des SEGA. Ceux-ci, s'ils se situent autour du trou de Monro, peuvent donner une hypertension intracrânienne <sup>(3)</sup>.

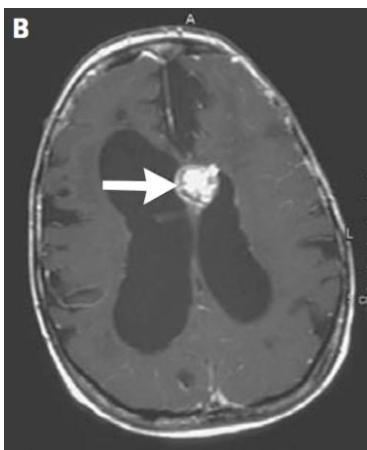


Figure 3: SEGA visible à l'IRM<sup>(5)</sup>

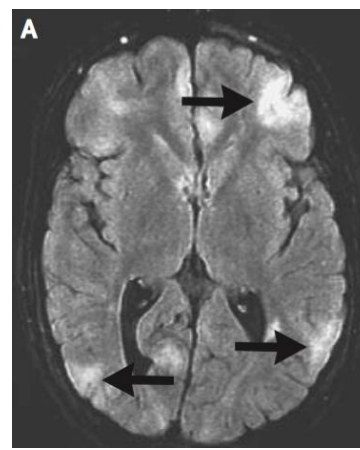


Figure 4: Tubes corticaux visibles à l'IRM <sup>(5)</sup>

Les SEGA peuvent apparaître à l'enfance ou à l'adolescence (l'âge moyen est de 8 ans) et peuvent continuer de croître à l'âge adulte, c'est pourquoi il est important de suivre ces patients par IRM et éventuellement pratiquer dans de très rares cas une opération pour réduire ou enlever la lésion si besoin ainsi qu'une dérivation du liquide céphalorachidien. Une autre voie thérapeutique consiste en l'administration d'un inhibiteur de la voie des mTOR. Ces inhibiteurs sont indiqués pour les SEGA qui mesurent plus d'1 cm, qui augmentent de volume de plus de 25% entre deux imageries consécutives, qui ne causent pas d'hypertension intracrânienne et qui ne sont pas traitables par chirurgie après consultation multidisciplinaire<sup>(3)</sup>. Ils sont diagnostiqués dans plus de 80% des cas avant 18 ans. Les SEGA sont plus nombreux en cas de mutations TSC2 et davantage bilatéraux (34%) par rapport à la mutation TSC1<sup>(7)</sup>.

La majorité des patients atteints de SEGA seront asymptomatiques (70.9%). Dans les cas symptomatiques, les manifestations seront : épilepsies, céphalées, diminution et perte des capacités cognitives<sup>(7)</sup> .

Le principal symptôme des affections neurologiques est l'épilepsie, présente chez 83.5% des patients et arrivera à être contrôlés chez 58.7% des cas. Le second symptôme principal est le spasme infantile (38.8%)<sup>(7)</sup>.

Des troubles neuropsychiatriques sont notés dans 57.8% des cas, avec notamment des déficits intellectuels, autisme, anxiété importante, dépression, hyperactivité, troubles comportementaux,...<sup>(7)</sup>.

## b. Rénales :

2/3 des patients présenteront une atteinte rénale à l'adolescence et 80% en auront à l'âge adulte<sup>(4)</sup>. Ce seront principalement des kystes et des angiomyolipomes. L'IRM est le moyen principal de diagnostic des angiomyolipomes, elle permet également de mettre en évidence les lésions hépatiques et aortiques. Contrairement au scanner ou à l'échographie, l'IRM permet de mettre en évidence les lésions pauvres en graisse. <sup>(2)</sup> Les angiomyolipomes ne sont pas spécifiques aux reins et peuvent se retrouver dans d'autres organes comme le foie. <sup>(4)</sup>

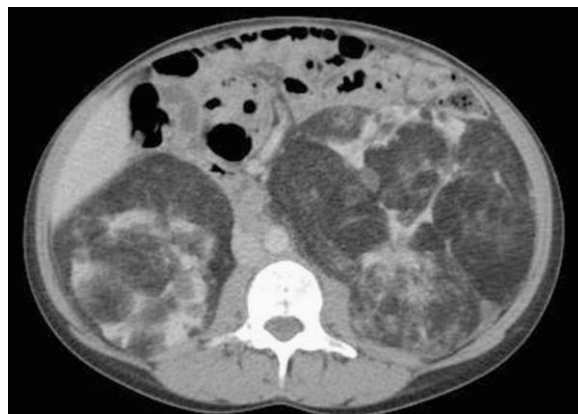


Figure 5: Angiomyolipomes visibles au scanner <sup>(4)</sup>

Chez 2 à 3% des patients, on met en évidence une large délétion touchant à la fois le gène TSC2 et le gène PKD1 (16p13) responsable du phénotype de la polykystose rénale au sein d'un même chromosome, on appelle cela le « Syndrome des gènes contigus ». Cette maladie est diagnostiquée dès l'enfance et peut mener à des insuffisances rénales vers l'âge de 20 ans <sup>(5)</sup>.

Les angiomyolipomes (AML) sont composés de vaisseaux anormaux, de cellules musculaires lisses immatures, et d'adipocytes<sup>(4)</sup> ; ces 3 types cellulaires sont généralement touchés par la même mutation LOH (perte d'hétérozygotie, c'est-à-dire la perte de l'expression d'un des deux allèles sains au sein de ces cellules) suggérant que la mutation provient d'une cellule commune (elle serait d'origine mésenchymateuse : elle pourrait provenir des cellules des crêtes neurales <sup>(8)</sup> ) et que le complexe TSC1-TSC2 joue un rôle prépondérant dans la différenciation des 3 types de cellules. Il fut démontré cependant que les second-hit provoquant la croissance tumorale peuvent très bien être différents d'une lésion à l'autre <sup>(8)</sup>. Il a été mis en évidence que pour un même patient, les second-hit retrouvés au sein d'AML différents peuvent être dissemblables, le taux d'apparition de ces second-hit étant très lent, l'on peut conclure que les lésions rénales type AML peuvent déjà débuter sur base d'un simple hit commun présent au sein des cellules impliquées (musculaires lisses, endothéliales, adipocytes). Les AML sont la cause principale de mortalité et morbidité. Ils sont présents chez 47.2% des patients, respectivement chez les hommes, 42.5% et chez les femmes 57.5%<sup>(7)</sup>. Ils sont diagnostiqués à l'adolescence, la majorité d'entre eux (83.7%) sont asymptomatiques, mais aussi bilatéraux (83.8%) et multiples (87.6%)<sup>(7)</sup>. Dans les rares cas où ils sont symptomatiques, ils causent entre autres: douleur, augmentation de la pression artérielle, diminution de la fonction rénale et hématurie microscopique. Le risque principal de ces lésions est l'hémorragie quand le diamètre tumoral est supérieur à 4cm (3.7% des patients). Il faudra donc suivre la fonction rénale et la tension artérielle et traiter 27,8 des patients atteints <sup>(7)</sup>.

En Belgique, après concertation avec le néphrologue, l'urologue et le radiologue, s'il n'y a pas d'indication de traitement interventionnel embolisant ou chirurgical, on démarrera un traitement par inhibiteur de mTOR pour les AML de 3cm. Par la suite, un suivi par imagerie est nécessaire pour prolonger le traitement à plus long terme. Une première prolongation est justifiée après 6 mois si les lésions ont diminué d'au moins 30%. Après 1 an, celles-ci doivent avoir diminué de 50%. Au delà de 1 an, le traitement peut être maintenu s'il n'y a pas d'augmentation de plus de 20% des AML ou s'il n'y a pas d'augmentation de plus de 20% du volume rénal ou pas d'apparition d'un nouvel AML de plus de 1cm.<sup>(9)</sup> Le traitement par inhibiteur de mTOR est à privilégier, car il est moins à risque de détériorer la fonction rénale. (7). Les patients souffrant d'hypertension artérielle sont traités avec des inhibiteurs du système rénine-angiotensine-aldostérone. Chez les patients traités par inhibiteur des mTOR, il est conseillé d'éviter les IEC, car il y a un risque accru d'angiooedème lorsqu'on combine les deux médicaments. (2)



Figure 6 : Angiomyolipomes visibles au scanner<sup>(3)</sup>

### c. Cardiaques :

Les rhabdomyomes cardiaques sont les manifestations cardiaques les plus courantes (35 à 70%) et sont en moyenne diagnostiqués à l'âge de 3 ans, mais il est possible de faire un diagnostic prénatal par échographie<sup>(2)</sup>. Ils sont dans la majorité des cas asymptomatiques. Dans de rares cas, ils peuvent être associés à des arrêts cardiaques durant l'enfance. 47% des enfants ayant développé des rhabdomyomes ont fait un jour de l'arythmie cardiaque comme de la tachycardie, bloc complet, syndrome de Wolff-Parkinson-White<sup>(5)</sup>. Les symptômes ne perdurent pas et disparaissent spontanément, de même que le myome. Un suivi par ECG est recommandé tous les 1 à 3 ans si un rhabdomyome asymptomatique est documenté<sup>(2)</sup>.

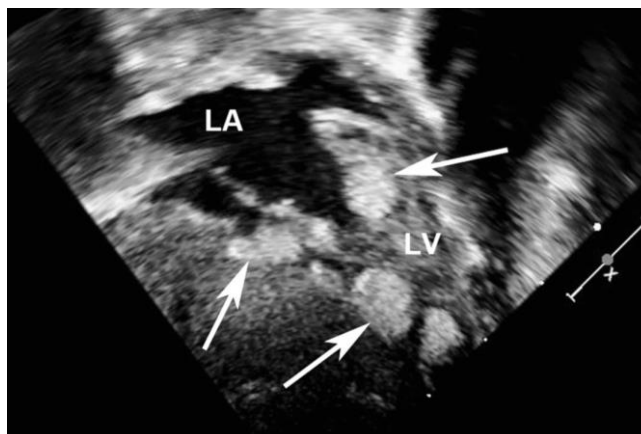


Figure 7: Rhabdomyomes visibles à l'échographie cardiaque<sup>(4)</sup>

#### d. Cutanées :

Les macules hypomélaniques sont les lésions les plus fréquentes observées chez plus de 66,8% des malades. Elles doivent faire plus de 5mm de diamètre pour être considérées comme typiques de la maladie<sup>(7)</sup>.

Les angiofibromes de la face se présentent comme des papules de couleur chair à érythémateuse et sont localisés de façon symétrique, principalement au niveau des sillons naso-géniens, des joues et du menton<sup>(3)</sup>. Ils sont courants et sont présents chez environ 57,3% des patients à l'âge adulte, ils apparaissent en général entre 2 et 5 ans<sup>(7)</sup>. Ils sont composés de cellules semblables aux fibroblastes, de tissus fibreux, de vaisseaux sanguins et de follicules pileux. Ils apparaissent dès l'enfance et augmentent en taille, nombre et épaisseur à l'adolescence. Ils peuvent représenter une gêne importante d'un point de vue social et esthétique. L'apparition de ceux-ci pourrait être causée par l'exposition au soleil apportant un second hit<sup>(1)</sup>.

On retrouve d'autres symptômes cutanés comme les plaques « peau de chagrin » qui sont des hamartomes de type collagénique, de couleur chair ou brun clair, à surface bosselée en « peau d'orange », souvent de localisation lombaire, apparaissant à partir du début de la première décennie chez 20 à 40% des patients<sup>(10)</sup>, mais peuvent atteindre une prévalence allant jusqu'à 50% pour certaines études<sup>(2)</sup>. Les autres présentations sont les fibromes péri-inguinaux (14.1%), les taches café au lait, et d'autres manifestations non spécifiques. Une évaluation dermatologique est conseillée lorsque le diagnostic de STB est posé.<sup>(2)</sup>



Figure 8: Macules hypopigmentées<sup>(4)</sup>



Figure 9: Angiofibromes de la face<sup>(4)</sup>

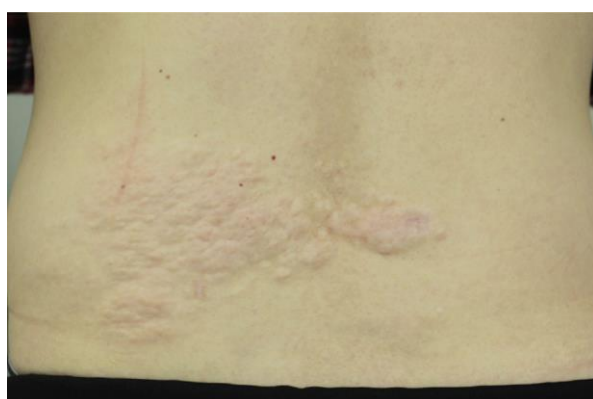


Figure 10: Peau de chagrin<sup>(4)</sup>

### e. Oculaires :

Les hamartomes rétiniens sont histologiquement semblables aux tubers corticaux, et sont observés chez 30 à 50% des patients <sup>(4)</sup>. Ces lésions ne causent habituellement aucun problème de vision, mais constituent un bon marqueur de la maladie, surtout chez les jeunes enfants ne présentant encore aucun symptôme. <sup>(4)</sup>

D'autres lésions de type taches rétiniennes achromiques « Retinal achromic patch » existent également. (39% des patients). <sup>(4)</sup>



Figure 11: Hamartome rétinien visible au fond d'œil<sup>(4)</sup>



Figure 12: Retinal achromic patch visible au fond d'œil<sup>(4)</sup>

### f. Pulmonaires:

La lymphangioliéiomyomatose (LAM) est moins fréquente (6.9%) que les manifestations citées décrites précédemment et apparaît presque exclusivement chez les adultes (36.7 ans). Elle est symptomatique dans 10 à 40% des cas et principalement sous forme de dyspnée (69%), de pneumothorax (44.8%) et d'épanchements pleuraux<sup>(7)</sup>.

Les symptômes apparaissent plus fréquemment chez les femmes et ont tendance à augmenter en préménopause, suggérant une influence hormonale. L'évaluation de la fonction respiratoire se fait en général chez les femmes après 18 ans ou chez les personnes plus âgées, par une EFR (épreuve fonctionnelle respiratoire), un test de marche de 6 min et par un CT-scan thoracique à coupes fines. Le suivi se fait tous les 2 à 3 ans par EFR et par test de marche. <sup>(2)</sup>

La LAM n'est pas une entité spécifique à la STB. Il existe aussi des formes sporadiques où des femmes portent de façon somatique un double hit au niveau des gènes TSC, mais elles ne possèdent pas de mutations dans leur lignée germinale, elles ne sont donc pas atteintes de la STB <sup>(1)</sup>. Cependant 60% de ces femmes possèdent des AML et les mutations somatiques retrouvées au niveau des AML sont identiques à celles des LAM, ces mutations ne sont pas retrouvées dans les autres cellules du corps, suggérant qu'il y a un précurseur commun à la mutation<sup>(1)</sup>.



Figure 13: Lymphangioliéiomyomatose visibles au scanner<sup>(4)</sup>

## 1.4 Diagnostic (selon le consensus 2012 international)<sup>(3)</sup> <sup>(4)</sup>

Le diagnostic se fait généralement aux alentours de la première année de vie. Cependant, un diagnostic prénatal est réalisable et confirmé par la mise en évidence d'un rhabdomyome cardiaque (5,9% des cas<sup>(7)</sup>). Il peut être fait également à un âge plus avancé, l'âge de celui-ci dépendra en majeure partie des manifestations cliniques. Il existe des formes familiales se transmettant de manière autosomique dominante (un parent a 50% de chance de transmettre la mutation à sa descendance) et des formes sporadiques. Dans 1/3 des cas, la maladie est familiale; chez ces familles, on retrouve 10 à 30% de mutation TSC1, ce qui représente le double de la prévalence de la mutation TSC1 chez l'ensemble des malades<sup>(1)</sup>. Les cas sporadiques sont en majorité TSC2. Par conséquent, identifier une mutation TSC1 nous donne deux fois plus de probabilité d'avoir une forme familiale par rapport à une forme sporadique.

En 2012, les critères de diagnostic ont été modifiés par rapport à ceux de 1998 pour incorporer les résultats des tests génétiques.<sup>(4)</sup>

En cas de tests génétiques négatifs (10-15% <sup>(3)</sup>), le diagnostic sera posé grâce aux critères majeurs et mineurs selon le consensus international de 2012 <sup>(3)</sup>. Ce consensus se base sur des observations et des examens complémentaires : IRM, CT, Échographie, analyse génétique de la famille.

### Critères majeurs <sup>(3)</sup> :

1. Macules hypopigmentées (>3, minimum 5mm de diamètre)
2. Angiofibromes (>3) ou plaque céphalique fibreuse
3. Fibromes unguéaux (>2)
4. Plaque « peau de chagrin »
5. Hamartomes rétiniens multiples
6. Dysplasies du cortex cérébral
7. Nodules sous-épendymaires
8. Astrocytome sous épendymaire à cellules géantes (SEGA)
9. Rhabdomyome cardiaque
10. lymphangioléiomyomatose (LAM)
11. Angiomyolipomes (AMI) (>2)

### Critères mineurs <sup>(3)</sup> :

1. Lésions cutanées hypopigmentées en « confettis »
2. Puits de l'émail dentaire (>3)
3. Fibromes intra-oraux (>2)
4. Patch achromique de la rétine
5. Multiples kystes rénaux
6. Hamartomes extra-rénaux

**Diagnostic définitif** : 2 critères majeurs ou un critère majeur avec >2 critères mineurs

**Diagnostic possible** : un critère majeur ou > 2 critères mineurs

# 1.5 ANALYSES GENETIQUES

## 1.5.1 METHODE SANGER

La technique de séquençage de l'ADN par méthode Sanger a été inventée fin des années 70. Elle consiste en la détection de bases marquées par fluorescence au niveau de brins néoformés. Avant l'avènement du séquençage de l'ADN à haut débit (NGS), elle était la technique de référence pour mettre en évidence les variants de l'ADN<sup>(11)</sup>. La limite de cette technique est qu'elle ne permet pas d'analyser rapidement de longues séquences. De nos jours, les centres de génétiques utilisent les deux techniques. La méthode par NGS pour le séquençage de gènes entiers et chez les patients NMI. La méthode Sanger pour rechercher une mutation ponctuelle, notamment si mutation est connue dans une famille et qu'on la souhaite la rechercher chez un apparenté.

Pour la technique: La polymérisation de l'ADN est initiée par un petit oligonucléotide (amorce) complémentaire à une partie du fragment d'ADN à séquencer. L'élongation de l'amorce est réalisée par la « séquenase » (une ADN polymérase I). Les quatre désoxynucléosides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sont ajoutés, ainsi qu'en faible concentration, les quatre 2'- 3'didésoxynucléosides (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) marqués par des fluorochromes différents. Ces didésoxynucléosides, une fois incorporés à la nouvelle chaîne synthétisée, empêchent la poursuite de l'élongation. Il en résulte de nouveaux fragments d'ADN de tailles variables, qui sont ensuite séparés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide ou par électrophorèse capillaire. Le séquençage Sanger est cependant limité à 500 nucléotides par run ; de plus, il est difficile de visualiser les mutations en cas de mosaïque.<sup>(12)</sup>

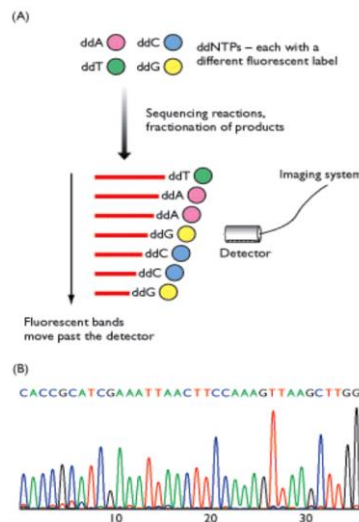


Figure 14 : Méthode SANGER, cours de génétique CUSL Pr Sznajer <sup>(12)</sup>

## 1.5.2 METHODE NGS UTILISEE : ILLUMINA

En 2005 est apparu le séquençage à haut débit (= NGS, Next-Generation Sequencing) permettant de produire des millions de séquences en un seul run. Cette technique permet de réduire considérablement les coûts, le temps de séquençage et de couvrir une bibliothèque étendue de gènes d'intérêt. La sensibilité est haute avec une grande profondeur de lecture et une large couverture. Elle permet de repérer les mosaïques et de les quantifier<sup>(13)</sup>. Aux CUSL, les techniques de séquençage par Sanger et NGS sont utilisées.

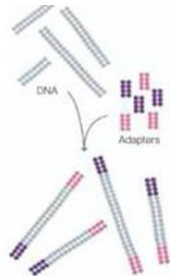
La technologie Illumina employée est la MiSeq permettant en 4 à 24h de produire 25 millions de reads de 300 bases chacune.

Pour réaliser un séquençage selon la méthode Illumina, on débute par une fragmentation enzymatique de l'ADN génomique en fragments générés aléatoirement d'ADN simple brin. Après une réparation des extrémités des brins, on vient liguer des adaptateurs qui contiennent des séquences communes complémentaires aux amorces de la PCR, un couple index permettant d'identifier l'ADN du patient et ainsi que les séquences p5 et p7 qui permettent aux fragments de se lier sur le support solide (= flow cell) (Figure 15)<sup>(14)</sup>.

Parmi les fragments générés, seuls ceux dont la taille est comprise entre 300 et 700pb sont sélectionnés pour être liés à la flow cell. Une fois les fragments liés (Figure 16), on réalise une amplification par la méthode de Bridge PCR (Figure 17) générant à chaque fois un cluster d'ADN qui pourra être reconnu lors du séquençage. Lorsque l'amplification est réalisée, on procède à la construction d'une librairie d'ADN génomique d'intérêt par méthode de capture IDT (basé sur la capture des fragments d'intérêt par liaison à des billes), suivie d'une amplification par PCR pour assurer une quantité suffisante d'ADN pour le séquençage<sup>(14)</sup>.

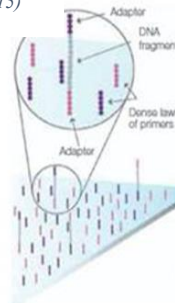
Pour réaliser l'étape du séquençage à proprement parler, on rajoute une polymérase et des nucléotides couplés à des molécules fluorescentes. À chaque cycle d'amplification, le laser excite les nucléotides fluorescents et détecte quel nucléotide a été rajouté, créant à chaque fois une séquence de bases appelée read. Les regroupements ou clusters permettent d'avoir un signal suffisant afin qu'il soit détecté (Figure 18). Pour terminer, les millions de read de 300 bases couvrant l'ensemble des fragments du gène sont ensuite alignées permettant de reconstruire le gène (Figure 19).<sup>(14)</sup> Il est possible par la suite d'analyser sa séquence et de repérer les mutations présentes. Cette technique détecte d'éventuelles mutations ponctuelles ne concernant pas l'ensemble des cellules (= mosaïcisme). La détection et la quantification d'un mosaïcisme sont réalisables grâce au grand nombre de reads créées par fragmentations du gène d'intérêt provenant de l'ADN de nombreuses cellules.

Figure 15<sup>(15)</sup>



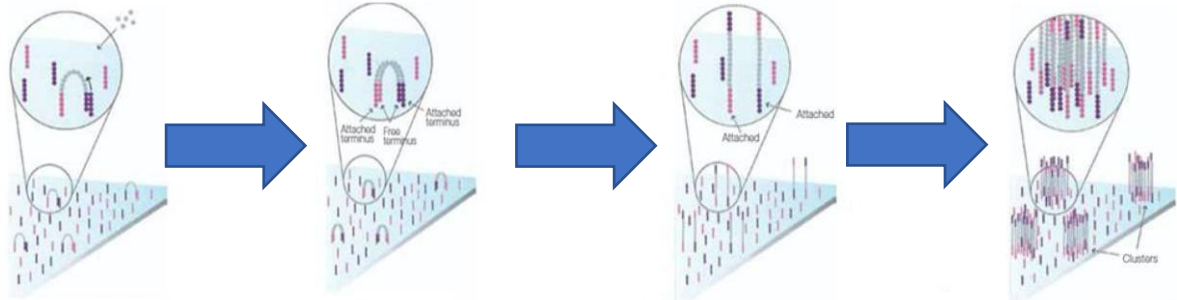
Randomly fragment genomic DNA and ligate adapters to both ends of the fragments.

Figure 16<sup>(15)</sup>



Bind single-stranded fragments randomly to the inside surface of the flow cell channels.

Figure 17<sup>(15)</sup>



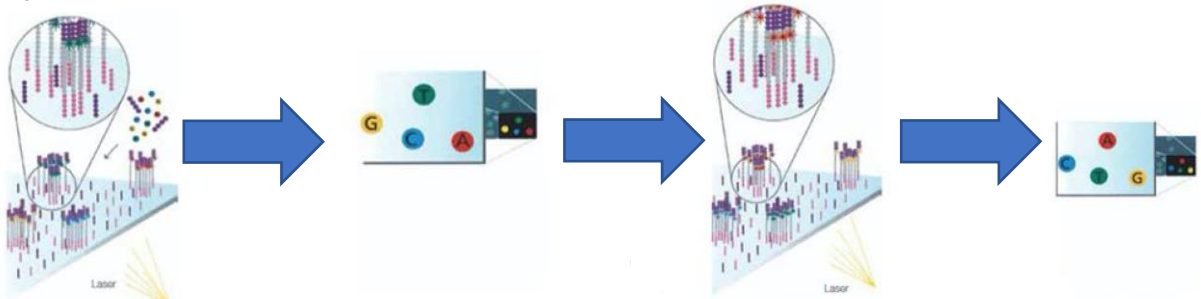
Add unlabeled nucleotides and enzyme to initiate solid-phase bridge amplification.

The enzyme incorporates nucleotides to build double-stranded bridges on the solid-phase substrate.

Denaturation leaves single-stranded templates anchored to the substrate.

Several million dense clusters of double-stranded DNA are generated in each channel of the flow cell.

Figure 18<sup>(15)</sup>



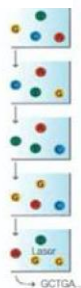
The first sequencing cycle begins by adding four labeled reversible terminators, primers, and DNA polymerase.

After laser excitation, the emitted fluorescence from each cluster is captured and the first base is identified.

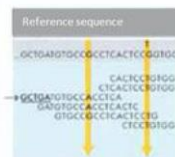
The next cycle repeats the incorporation of four labeled reversible terminators, primers, and DNA polymerase.

After laser excitation, the image is captured as before, and the identity of the second base is recorded.

Figure 19<sup>(15)</sup>



The sequencing cycles are repeated to determine the sequence of bases in a fragment, one base at a time.



The data are aligned and compared to reference, and sequencing differences are identified.

Lorsqu'une mutation est détectée, il faut déterminer si celle-ci est pathogène. Pour ce faire, on s'aide d'outils. Aux CUSL on utilise différentes bases de données : par exemple gnomAD, LOVD (base de données concernant uniquement les mutations retrouvées dans la sclérose de Bourneville), clinVar, PubMed et autres documentations provenant de moteurs de recherche. Si le variant est encore inconnu dans les différentes bases de données, on analyse l'influence de l'épissage si la mutation se trouve sur une séquence intronique et on utilise des algorithmes faux-sens si la mutation se trouve sur un exon.

Si le variant est toujours inconnu ou incertain : on le recherche au sein de la famille et des parents et on le confronte à la clinique.

Ensuite chaque variant est classé de 1 à 5 pour une maladie autosomique dominante :

1. Bénin : variant présent chez plus de 1% de la population
2. Probablement bénin : variant présent chez moins de 1% de la population
3. Variant inconnu, discordance, pas de littérature
4. Probablement pathologique
5. Pathologique : ex : délétion de 2 bases modifiant le cadre de lecture créant un codon STOP rapidement dans un des premiers exons du gène

### 1.5.3 PATIENT NMI

Au sein des patients atteints d'une STB, on retrouve des patients pour lesquels aucune mutation n'a été retrouvée après un séquençage par Sanger, ceux-ci représentent 9 à 24% selon les études. <sup>(16)</sup>

Les causes avancées de NMI chez les patients sont : un échec de la détection de la mutation (échec de la technique), la présence d'un 3<sup>e</sup> locus TSC3 encore inconnu, un mosaïcisme pour la mutation TSC1 ou TSC2 et finalement une mutation dans une séquence intronique, une séquence promotrice ou une séquence régulatrice (enhancer) du gène. <sup>(17)</sup>

Les atteintes les plus sévères sont retrouvées chez les patients hétérozygotes pour la mutation (TSC2 plus sévère que TSC1), ensuite chez les patients atteints de mosaïcisme et les moins sévères concernent les patients NMI post-NGS<sup>(18)</sup>. L'étude de Tyburczy M. <sup>(18)</sup> mentionne que la population de NMI post-Sanger présente des atteintes plus sévères que les patients diagnostiqués TSC1 par Sanger, car la majorité des patients NMI est atteinte par une mutation concernant le gène TSC2.

## 1.5.4 MOSAICISME

**Une mosaïque** est un mélange de deux populations cellulaires dérivées d'une cellule-oeuf avec un génotype différent au sein d'un même individu. Les mutations responsables apparaissent durant l'embryogenèse à un stade très précoce, elles peuvent être somatiques (c'est-à-dire apparaissant spontanément et ne se retrouvant pas chez les parents) ou bien germinales (retrouvées chez un des parents, qui les transmettra par ses cellules germinales à sa descendance). Plus la mutation apparaît tôt durant l'embryogenèse, plus le pourcentage de cellules touchées sera important <sup>(19)</sup>.

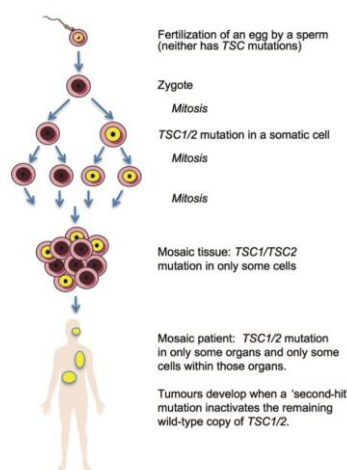


Figure 20: Mosaïsme somatique<sup>(8)</sup>

L'étude de Tyburczy M, réalisée à l'université d'Alabama aux États-Unis, comprend 53 patients NMI issus de Boston, de Cincinnati et du Massachusetts chez qui un mosaïcisme est retrouvé dans 58% des cas après un séquençage par NGS. Dans leur étude, les mutations retrouvées au sein des mosaïcismes sont peu communes, 65% (17 sur 26) des patients présentent une mutation connue chez moins de 5% des malades, parmi ceux-ci 30% (5/17) sont porteurs de mutation avec une prévalence <1%. <sup>(18)</sup>

Lorsque les premiers cas de mosaïcisme ont été retrouvés grâce aux premières NGS, la prévalence lors de la détection de ceux-ci s'élevait à 5,3%. <sup>(18)</sup> Sachant qu'on retrouve 15% de NMI au sein de la population TSC, et que parmi ces 15%, environ la moitié de ceux-ci sont des mosaïques, l'on peut en déduire que 7,5% des patients TSC seraient des mosaïques. <sup>(18)</sup>

## 1.6 Traitement :

La STB est une maladie multi-systémique demandant un suivi pluridisciplinaire régulier, un soutien psychologique et parfois une consultation génétique pour la famille. Auparavant, les traitements étaient strictement symptomatiques.

Lorsque les 2 gènes responsables de la maladie furent identifiés, leur compréhension permit d'ouvrir une nouvelle voie pour le traitement médical. Les protéines censées coder un complexe inhibant mTOR étant absentes, la prolifération des tissus est possible dans les cellules présentant une 2<sup>e</sup> mutation somatique. Les inhibiteurs de la voie mTOR semblables à ceux utilisés pour les greffes ont été testés. Ceux-ci ont démontré des effets favorables sur des modèles animaux et ensuite chez des patients présentant des manifestations rénales, pulmonaires ou encore cérébrales. Sont utilisés, le sirolimus ou rapamycine, everolimus. <sup>(3)</sup>

Les effets démontrés sont tels qu'après 6 mois chez 75% des patients, la taille des tumeurs s'est réduite de 30%. <sup>(3)</sup>

Du point de vue neurologique, il y a peu, le seul traitement des SEGA était la chirurgie. Cependant l'avènement des inhibiteurs permet de réduire le volume de ces lésions. Dans l'étude EXIST 1 portant sur 117 patients traités par l'everolimus pour SEGA, une réduction de la taille de 50% est notée dans 35% des cas après 6 mois et 49% au terme du suivi à 24 mois<sup>(3)</sup>

Il est recommandé aujourd'hui d'y avoir recours dès l'âge de 3 ans, chez les patients présentant un SEGA en croissance et asymptomatique, ou inopérable. <sup>(3)</sup>

Par la suite dans l'étude EXIST 2 (Bissler J, Kingswood C, Radzikowska E, and al <sup>(20)</sup>) portant sur 118 patients, traiter les AML par des inhibiteurs de mTOR permet dans 95% des cas de diminuer leur taille. Ceux-ci permettent également de prévenir les saignements des AML mesurant plus de 3cm. Après 24 semaines de traitement, la moitié des patients montre une diminution d'au moins 50% des AML. Donner un inhibiteur des mTOR pour stopper la croissance des AML permet aussi d'avoir des effets positifs sur les angiofibromes de la face et sur les lésions cérébrales. <sup>(20)</sup>

Dans les études EXIST 1 et 2, les principaux effets secondaires rencontrés dans le groupe de patients traités par inhibiteur sont : stomatites (48%), rhinopharyngites (24%), lésions cutanées de type acné (22%), otalgies (22%), toux (20%), hypercholestérolémie (20%), aphtes (20%), fatigue (18%), ulcérations buccales (16%).<sup>(20)</sup> Malgré la présence d'effets secondaires, la balance risque bénéfique d'un traitement par inhibiteur de mTor est en faveur de la mise en route d'un traitement<sup>(20)</sup>.

Du point de vue cutané, auparavant il fallait recourir à des ablations (cryothérapie, shave-coagulation, laser) qui sont douloureuses, peu efficaces et à fort taux de récurrences. Aujourd'hui, la rapamycine est efficace qu'elle soit prise per os ou de façon topique. Les résultats apparaissent rapidement (2 à 4 semaines). Le traitement peut être initié dès l'âge de 3 ans et sera d'autant plus efficace qu'il sera commencé tôt durant l'enfance.

L'effet secondaire du traitement topique est une dermite irritative et ce d'autant plus que le nombre d'applications quotidiennes est élevé, l'effet secondaire cesse lorsqu'on diminue la dose. <sup>(3)</sup>



*Figure 21: Angiofibromes en plaque du front et des joues- avant et après 7 mois de rapamycine.<sup>(3)</sup>*

# 2. METHODE

---

## 2.1 OBJECTIFS

L'objectif de ce mémoire consistera en une revue d'une cohorte des cas de Sclérose Tubéreuse de Bourneville de Saint-Luc comprenant 103 patients. Une analyse génétique par méthode Sanger a été réalisée au préalable chez 81 des 103 patients de la cohorte, soit à visée clinique, soit à visée de recherche. Après ce premier screening, on a retrouvé 48% de patients TSC2 (39/81), 28% de TSC1 (18/81) et 31% de NMI (25/81). Une seconde analyse par NGS a été réalisée chez 19 patients NMI.

Dans un premier temps, le mémoire visera à revoir (d'une manière rétrospective) l'ensemble des dossiers des patients de la cohorte TSC, et de réaliser un recueil des éléments cliniques en s'intéressant particulièrement aux manifestations cutanées, neurologiques et rénales qui sont les plus fréquentes.

Pour chacune des manifestations étudiées, les données seront classées comme suit :

- Ensemble de la cohorte CUSL
- Ensemble des patients génotypés TSC1 par quelque analyse génétique
- Ensemble des patients génotypés TSC2 par quelque analyse génétique
- Ensemble des patients génotypés TSC1 par méthode SANGER
- Ensemble des patients génotypés TSC2 par méthode SANGER
- Ensemble des patients génotypés TSC1 par méthode NGS
- Ensemble des patients génotypés TSC2 par méthode NGS

Il sera ainsi possible de comparer les fréquences d'apparition des éléments cliniques, en fonction du type de génotypage à réaliser pour mettre en évidence la mutation et en fonction de la mutation retrouvée. Ces données seront comparées entre elles, mais feront également l'objet d'une comparaison avec les données retrouvées au sein de la littérature.

Pour finir, on comparera notre base de données concernant les patients NMI après Sanger et nous pourrons comparer les fréquences d'apparition des manifestations avec la littérature. Un point concernant les mosaïcismes sera également évoqué.

## 2.2 POPULATION & METHODE

L'ensemble de la cohorte peut être divisé en trois populations. La première sera les patients génotypés TSC1 ou TSC2 par le séquençage Sanger ; la deuxième sera les patients non génotypés par séquençage Sanger mais à génotype déterminé par NGS et la troisième population sera les patients non génotypés ni par Sanger ni par NGS à diagnostic clinique de STB.

Les dossiers des patients ont été parcourus pour retenir les éléments cliniques suivants qui feront l'objet de la recherche de ce mémoire :

- Phénotype rénal : présence d'AML, atteintes rénales
- Phénotype cutané : macules hypomélaniques, angiofibromes de la face, peau de chagrin
- Manifestations neurologiques : épilepsie, troubles neuropsychologiques
- Imagerie neurologique : NSE, SEGA, tubers corticaux

Le but de ce mémoire sera de comparer au sein des 3 populations de la cohorte, la fréquence des éléments cliniques décrits ci-dessus et d'en dégager, s'il le permet, une corrélation génotype-phénotype. Il sera également question de comparer les données récoltées à celles de la littérature pour la population de patients atteints.

Lors de nos analyses par NGS, pour rechercher les mutations au sein du génome du patient, on a ciblé les gènes TSC1 et TSC2. Aux CUSL, les pathologies pouvant être mises en évidence par NGS sont regroupées au sein d'un panel de malformations vasculaires. Pour réaliser une analyse par NGS, on prélèvera l'ADN des cellules sanguines, une simple prise de sang est suffisante pour recueillir le matériel nécessaire à l'analyse.

Aux CUSL, les gènes TSC1 et 2 sont compris dans le panel de malformations vasculaires composé de 42 gènes au total <sup>(21)</sup> : KRIT1, CCM2, PDCD10, GLMN, TEK, RASA1, EPHB4, ACVRL1, ENG, SMAD4, GDF2, PTEN, STAMBP, EFNB2, NOTCH1, NOTCH4, ANGPT2, FLT4, FOXC2, VEGFC, GATA2, CCBE1, GJA1, GJC2, HGF, HRAS, KRAS, NRAS, PTPN11, PTPN14, SOS1, RAF1, SOX18, IKBKG, ITGA9, KIF11, RELN, PIEZO1, FAT4, CDC42, TSC1, TSC2. À la date du 1 décembre 2018, le délai de réponse des analyses génétiques moléculaires pour le panel des gènes vasculaires prend 3 mois.

Une comparaison de notre cohorte de patients NMI sera faite avec des études précédentes portant sur un grand nombre de patients NMI.

Pour finir, une évaluation des patients atteints par mosaïcisme sera effectuée ainsi qu'une revue de la littérature concernant le sujet.

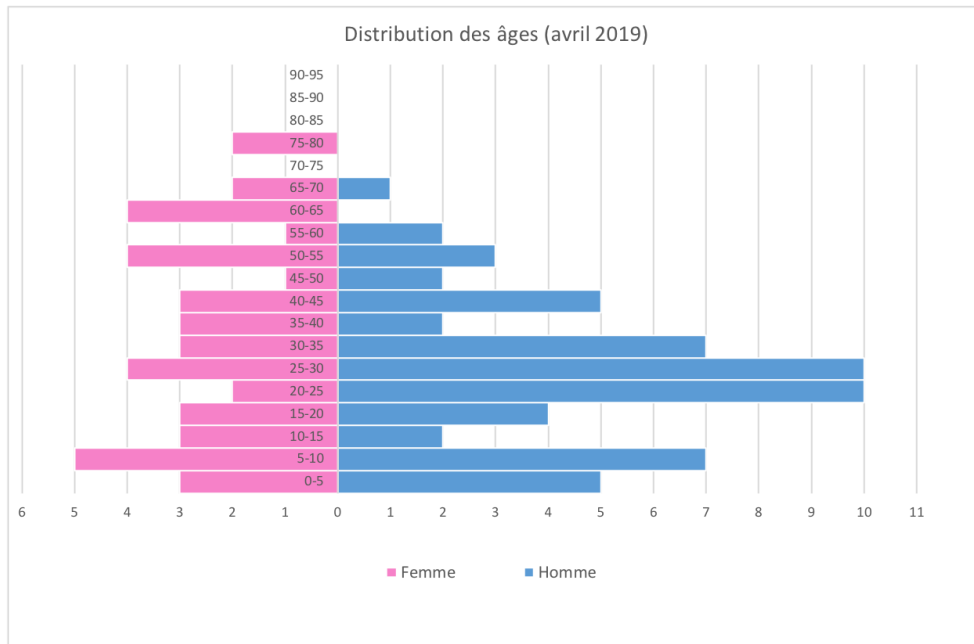
### 3. RÉSULTATS : Revue de la cohorte

Notre étude comporte 103 patients issus des CUSL. Cette cohorte de patients est composée de 44 femmes (43%) et de 59 hommes (58%). La collecte des données s'est effectuée en avril 2019 ; à cette date, l'âge moyen de la cohorte était de 35,1 ans avec 18 patients mineurs (17%). Concernant l'âge au moment du diagnostic, les données récoltées dans les dossiers sont très souvent imprécises et ne nous permettent pas de calculer précisément une moyenne pour notre cohorte. Cependant, il a été possible de récolter des informations concernant la période de la vie durant laquelle le diagnostic a été posé pour 92 patients : 5 cas en anténatal (5,4%), 44 cas à la naissance jusqu'à la deuxième année de vie (47,8%), 16 cas durant l'enfance (17,4%), 4 cas durant l'adolescence (4,3%), 23 cas après 18 ans (25,0%). L'histoire familiale est positive chez 29 patients. Une analyse génétique par méthode Sanger a été réalisée chez 81 patients, les résultats ressortant font état de 48% de patients TSC2 (39/81), 28% de TSC1 (18/81) et 31% de NMI (25/81). Un patient présente une mutation au sein du gène TSC1 et TSC2. Parmi les 25 NMI, 19 d'entre eux (ou apparentés) ont réalisé une nouvelle analyse génétique par NGS ( mutation retrouvée chez 16 des 19 patients).

	Cohorte complète des CUSL (n=103)
Nombre de femmes (%)	44 (43%)
Nombre d'hommes (%)	59 (58%)
Âge moyen	35,1
< 18 ans (%) (avril 2019)	18 (17%)
Histoire familiale positive	29
Patients testés par méthode Sanger	81
Patients génotypés TSC1 par méthode Sanger	18
Patients génotypés TSC2 par méthode Sanger	39
Patients NMI	25
Patients NMI testés par NGS	19
Patients NMI positifs TSC1	6
Patients NMI positifs TSC2	10
Présence de manifestations rénales (%)	82/95 (86%)
Présence d'AML (%)	54/95 (57%)
Présence de manifestations cutanées (%)	83/92 (90%)
Présence de « peau de chagrin » (%)	30/92 (33%)
Présence de macules hypomélaniques (%)	67/92 (73%)
Présence d'angiofibromes de la face (%)	68/92 (74%)
Imagerie cérébrale positive (%)	86/92 (93%)
Présence de Tubers Corticaux (%)	81/92 (88%)
Présence de NSE (%)	71/92 (77%)
Présence de SEGA (%)	9/92 (10%)
Présence d'épilepsie (%)	72/95 (76%)
Présence d'un trouble neuropsychologique (%)	50/95 (53%)

Tableau 1 : Présentation de la cohorte

*Distribution des âges :*



*Figure 22: Distribution des âges*

## 3.2 RÉSULTATS

### 3.2.1. ATTEINTES NEUROLOGIQUES

Sur notre cohorte de 103 patients, 92 ont bénéficié d'une imagerie cérébrale. Celle-ci a montré des anomalies chez 83 patients soit 93% d'entre eux. Les atteintes les plus fréquentes sont les tubers corticaux présents chez 81 patients (88%), suivis par les NSE présents chez 71 patients (78%), avec pour finir, l'atteinte la plus rare, les SEGA, chez 9 patients (10%). En ce qui concerne les différents groupes en fonction de leur génotype et de la méthode de détection, les patients génotypés TSC1 et 2 par la méthode de Sanger ont respectivement 94% et 92% d'atteintes cérébrales, 92% tubers corticaux pour les 2 mutations, 75% et 81% pour les NSE et enfin 13% et 6% pour les SEGA. Les patients initialement NMI et génotypés TSC1 et TSC2 par NGS ont quant à eux une imagerie positive dans 100% des cas, des tubers corticaux dans respectivement 83% et 100% des cas, des NSE dans respectivement 100% et 90% des cas et aucun patient ne présente de SEGA.

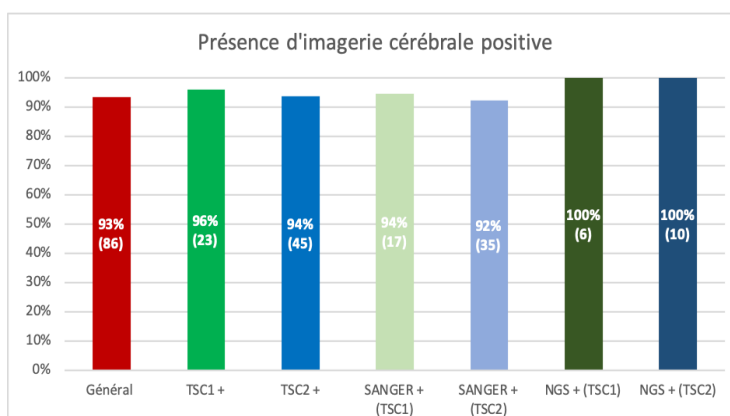


Figure 23

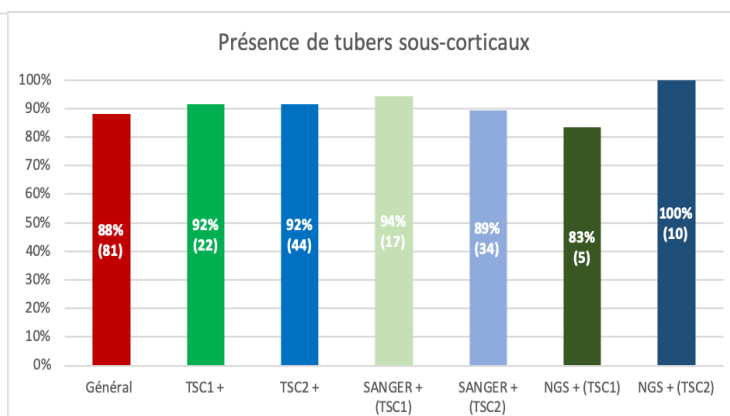


Figure 24

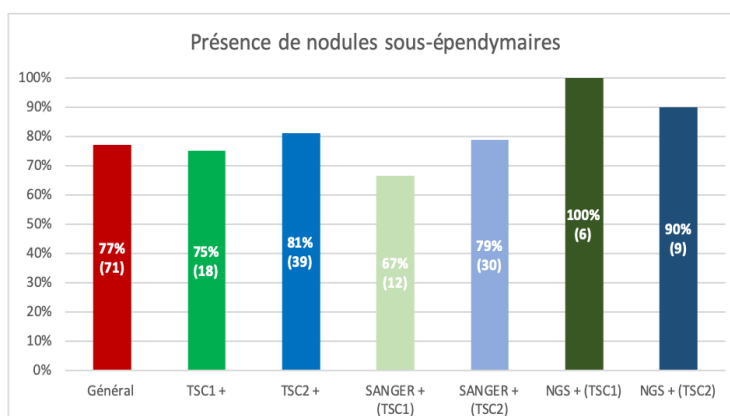


Figure 25

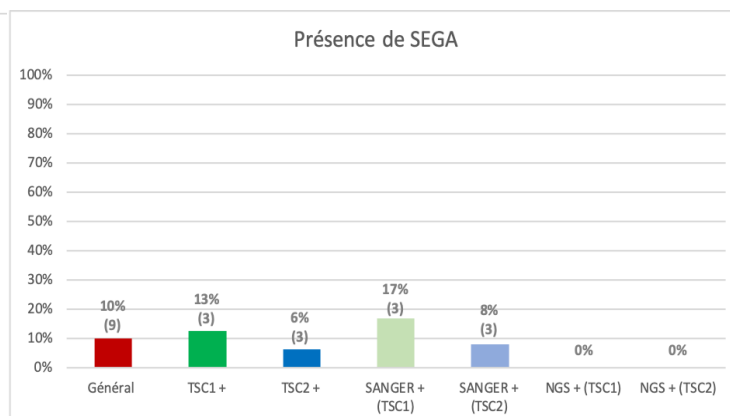


Figure 26

Les troubles neuropsychologiques comprennent à la fois déficits intellectuels, autisme, anxiété importante, dépression, hyperactivité, et troubles comportementaux. 95 patients sur 103 ont bénéficié d'une évaluation en neurologie. Pour l'ensemble de la cohorte, 50 patients présentent ces troubles précités (53%). 67 % des patients avec une mutation TSC2 présentent ces troubles psychologiques, retrouvés globalement en mêmes proportions qu'il s'agisse de la cohorte typée par Sanger ou par NGS, soit respectivement 69 et 60 %. Pour les génotypés TSC1, 50% des patients présentent ces troubles, principalement retrouvés chez les patients génotypés par Sanger avec 56% et moins retrouvés chez les patients génotypés par NGS.

L'épilepsie est la conséquence principale des lésions cérébrales, elle est présente chez 72 des 95 patients ayant bénéficié d'une évaluation neurologique (76%). 71% des patients TSC1 présentent de l'épilepsie avec une proportion semblable pour les patients TSC1 diagnostiqués par Sanger. A contrario, 83% des patients diagnostiqués TSC1 par NGS sont positifs. 82% des patients atteints de la mutation TSC2 présentent de l'épilepsie avec une proportion semblable chez les génotypés par Sanger (87%), mais nettement inférieure que ceux diagnostiqués par NGS (60%).

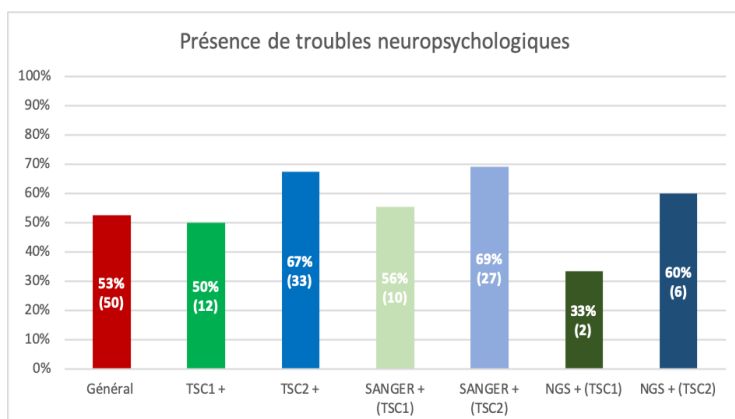


Figure 27

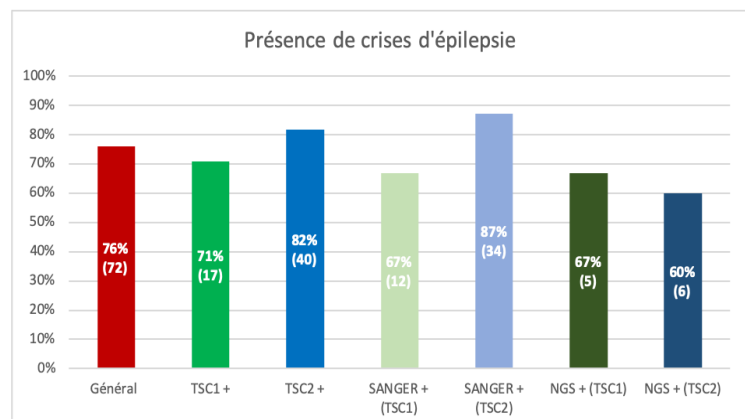


Figure 28

### 3.2.2. ATTEINTES CUTANÉES

On retrouve une évaluation dermatologique détaillée chez 92 des 103 patients. Chez ces 92 patients, 83 présentent des manifestations cutanées (90%). Celles-ci se répartissent entre angiofibromes de la face (74%), macules hypomélaniques (73%) et les « peau de chagrin » (33%). Au niveau des sous-groupes génotypés, les patients diagnostiqués par la méthode Sanger et par NGS ont des atteintes en proportions semblables à la cohorte générale en ce qui concerne la présence de manifestations cutanées, d'angiofibromes de la face, de « peau de chagrin ». Dans notre cohorte, les patients génotypés par NGS présentent moins de macules hypomélaniques par rapport aux patients diagnostiqués par Sanger quelle qu'en soit la mutation avec une différence marquée au niveau de la mutation TSC1 (88% contre 50% pour les NGS).

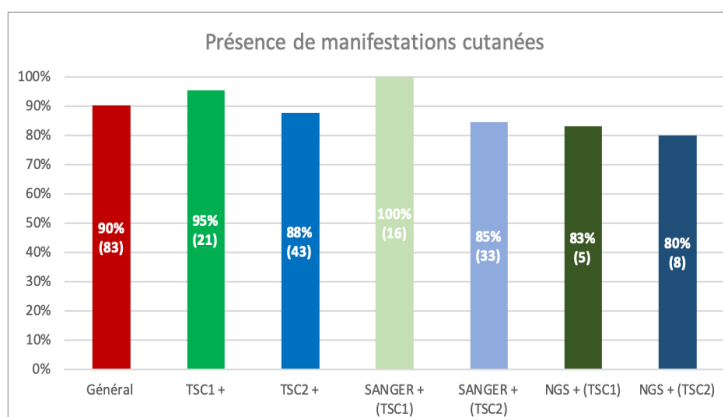


Figure 29

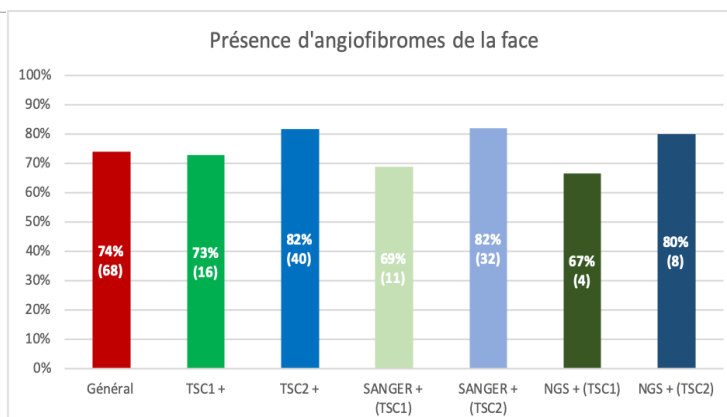


Figure 30

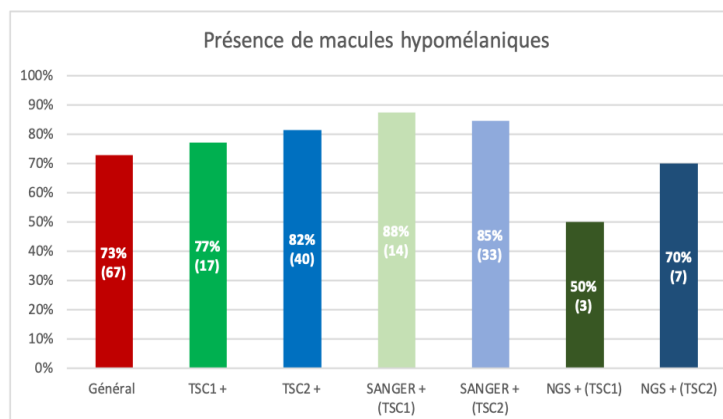


Figure 31

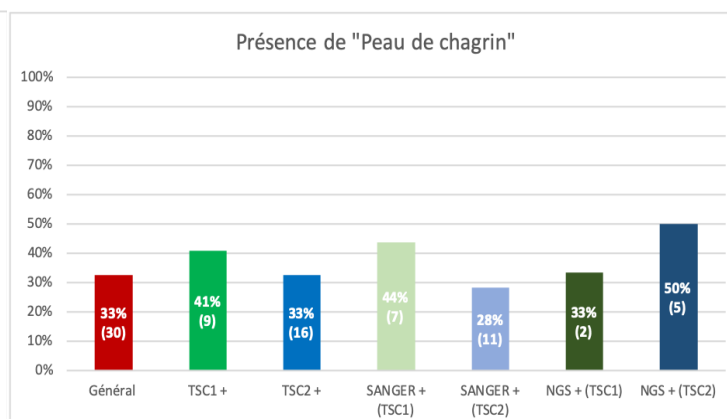


Figure 32

### 3.2.3 ATTEINTES RENALES

Concernant l'atteinte rénale, 95 patients soit 86% ont bénéficié d'une imagerie abdominale que ce soit un CT scanner (34 patients), une IRM abdominale (20 patients) ou encore une échographie abdominale (28 patients). Plus des ¾ des patients avaient une imagerie rénale montrant des lésions (82/95 soit 86 %) uni ou bilatérales. Chez les patients TSC1, on retrouve une imagerie positive moins fréquemment que chez les patients TSC2 quelle qu'en soit la méthode diagnostique de la mutation (différence supérieure à >10% pour chaque). 5 patients sont connus comme greffés rénaux (5%), 7 patients ont bénéficié d'une néphrectomie (7%). Un patient présente un syndrome des gènes contigus chez qui les atteintes de la PKD sont prédominantes.

Pour les AML, 54 patients en présentent, et dans 76 % des cas, ceux-ci sont bilatéraux. Ils sont présents chez 42% des patients TSC1 et 66% des patients TSC2. Chez les patients diagnostiqués par Sanger, les chiffres sont plus ou moins identiques ; par contre, chez les patients diagnostiqués par NGS, les chiffres sont inférieurs avec 33% et 40%.

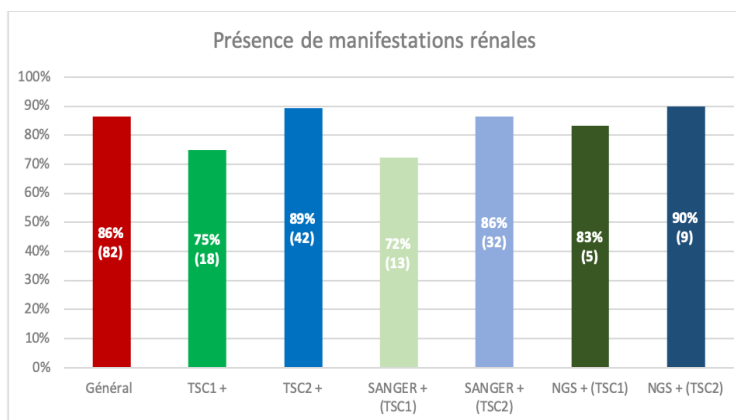


Figure 33

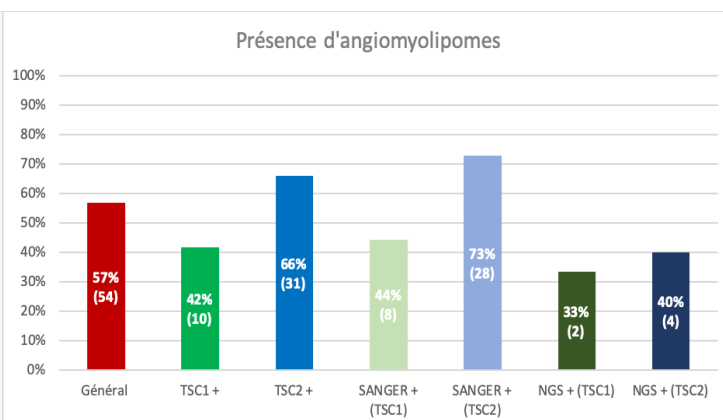


Figure 34

### 3.3 SYNTHÈSE DES RÉSULTATS

Tableau 2 : Synthèse de résultats

	TSC1		TSC2	
	SANGER	NGS	SANGER	NGS
Troubles neuropsychologiques	10 ( 56%)	2 ( 33%)	27 ( 69%)	6 ( 60%)
Épilepsie	12 ( 67%)	5 ( 83%)	34 ( 87%)	6 ( 60%)
Imagerie cérébrale positive	17 ( 94%)	6 ( 100%)	35 ( 92%)	10 ( 100%)
Tubers sous-corticaux	17 ( 94%)	5 ( 83%)	34 (89%)	10 ( 100%)
NSE	12 ( 67%)	6 ( 100%)	30 ( 79%)	9 ( 90%)
SEGA	3 ( 17%)	0 ( 0%)	3 ( 8%)	0 ( 0%)
Manifestations cutanées	16 ( 100%)	5 ( 83%)	33 ( 85%)	8 ( 80%)
Macules hypomélaniques	14 ( 87%)	3 ( 50%)	33 (85%)	7 ( 70%)
Peau de chagrin	7 ( 44%)	2 ( 33%)	11 ( 28%)	5 ( 50%)
Angiofibromes de la face	11 ( 69%)	5 ( 83%)	32 ( 82%)	8 ( 80%)
Manifestations rénales	13 ( 72%)	5 ( 83%)	32 ( 86%)	9 ( 90%)
AML	8 ( 35%)	2 ( 33%)	27 ( 73 %)	4 ( 40%)

## 3.4 MUTATIONS CHEZ LES PATIENTS DIAGNOSTIQUES PAR NGS

Pour rappel, 19 patients dont la mutation n'était pas identifiée par Sanger ont bénéficié d'une nouvelle analyse par NGS. Chez 16 d'entre eux (5 apparentés), une mutation a été identifiée .

Chez les 16 patients diagnostiqués par NGS, 6 patients sont atteints d'une mutation dans le gène TSC1, 10 d'une mutation TSC2. On retrouve 11 mutations différentes, 4 causées par une délétion de bases (dont une large), 5 causées par une substitution de bases et 2 causées par une duplication de bases. Pour 4 de ces mutations, la conséquence de la mutation n'a pu être identifiée. Les conséquences des autres mutations sont, dans 5 cas, des codons-STOP apparus prématurément, dans 1 cas une perte d'exon et dans 1 cas, une erreur d'épissage.

Tableau 3 : Mutation retrouvée au sein de la cohorte NMI

SUBJECT	GENE	MUTATION	TYPE DE MUTATION	CONSEQUENCE	SEXE	AGE
P27	TSC1	c.271_272delTC, p.(Ser91Valfs*15), dans l'exon 5	délétion	STOP prématuré	M	38y
P28	TSC1	c.271_272delTC, p.(Ser91Valfs*15), dans l'exon 5	délétion	STOP prématuré	M	40y
P36	TSC2	c.1443+33_1716+1544delinsTCA / p.? dans l'exon 15 et 16	large délétion	Erreur d'épissage	F	47y
P39	TSC2	c.848+281C>T / p.(Arg283Serfs*40) dans l'intron 9	substitution	STOP prématuré	F	12y
P44	TSC2	c.107_139-778del, dans l'exon 2	délétion	Perte d'exon	M	71y
P46	TSC2	c.107_139-778del, dans l'exon 2	délétion	Perte d'exon	F	41y
P58	TSC2	c.2819_2822dupTCAA / p.(Glu942Glnfs*19) dans l'exon 25	duplication	STOP prématuré	M	48y
P60	TSC2	c.2098G>A, p.(Glu700Lys) dans l'exon 20	substitution	variant classé 4/5 avec avec conséquence inconnue sur la protéine	F	10y
P67	TSC1	c.2230_2242dup / p.(Gln748Argfs*10) dans l'exon 18	duplication	STOP prématuré	F	22y
P72	TSC2	c.1257+1G>A	substitution	variant classé 4/5 avec avec conséquence inconnue sur la protéine	M	61y
P73	TSC1	c.2672delA, p.(Asn891Thrfs*40)	délétion	STOP prématuré	M	12y
P86	TSC2	c.599+5G>A dans l'exon 9	substitution	variant classé 4/5 avec avec conséquence inconnue sur la protéine	M	30y
P87	TSC2	c.599+5G>A dans l'exon 9	substitution	variant classé 4/5 avec avec conséquence inconnue sur la protéine	F	57y
P88	TSC2	c.599+5G>A dans l'exon 9	substitution	variant classé 4/5 avec avec conséquence inconnue sur la protéine	F	39y
P102	TSC1	c.363G>A, p.(Lys121Lys) dans l'exon 5	substitution	variant classé 3/5 avec avec conséquence inconnue sur la protéine	F	18y
P103	TSC1	c.271_272delTC, p.(Ser91Valfs*15), dans l'exon 5	délétion	STOP prématuré	F	69y

## 4. DISCUSSION

---

Notre cohorte de 103 patients comporte 43% de femmes et 57% d'hommes, l'âge moyen est de 31,7 ans lors du recueil des données en avril 2019, avec 17% de patients mineurs. 29 patients présentent une histoire familiale positive pour la maladie.

Grâce à une IRM cérébrale, nous avons observé une prévalence d'atteintes cérébrales chez 93% patients, sous forme de 88% de tubers corticaux, de 77% de NSE et de 10% de SEGA. L'étude TOSCA (Kingswood JC, d'Augères GB, Belousova E, et al. Tuberous Sclerosis registry to increase disease Awareness (TOSCA) – baseline data on 2093 patients. Orphanet Journal of Rare Diseases. 2017), composée d'une majorité de patients mineurs, est la plus grande cohorte étudiée de patients avec une STB, elle reprend les caractéristiques cliniques de 2093 patients provenant de 170 centres répartis dans 31 pays à travers le monde. Les patients de la cohorte TOSCA présentaient des tubers corticaux dans 82.2% des cas et des NSE chez 78.2% soit les mêmes proportions que nous avons observé. L'étude de Dabora S. <sup>(22)</sup>, portant sur 224 patients en provenance des États-Unis et de Pologne, avec un âge moyen de 11,5 ans, rapporte également des SEGA dans 11% des cas.

Chez les patients de notre population, une évaluation neurologique a été réalisée chez 92% des patients. Le spectre des manifestations neurologiques est large, comprenant déficits intellectuels, autisme, anxiété importante, dépression, hyperactivité et troubles comportementaux. Selon le site Orphanet<sup>(10)</sup>, site de référence publique dédié aux maladies rares, on retrouve ces troubles chez 30 à 60% des patients. Dans notre cohorte, on a au moins un des troubles précités chez 53% des patients. Concernant la présence d'épilepsie, principale manifestation des lésions cérébrales, les prévalences indiquées dans l'étude TOSCA<sup>(7)</sup> avec 83.5% et sur le site Orphanet<sup>(10)</sup> sont similaires aux 76% retrouvés dans notre étude.

Au niveau cutané, une évaluation dermatologique a permis de diagnostiquer chez 90% des patients des manifestations cutanées, les angiofibromes de la face et les macules hypomélaniques sont les deux lésions cutanées les plus fréquentes avec des prévalences semblables (respectivement 74% et 73%) que celles de la base de données Orphanet<sup>(10)</sup> et dans l'étude TOSCA<sup>(7)</sup>. La « peau de chagrin » est recensée chez 20 à 40% des patients toujours selon la base de données Orphanet, notre prévalence est bien comprise dans ce range. D'un point de vue dermatologique, notre cohorte semble être un bon échantillonnage de la population atteinte de la maladie.

Au niveau néphrologique, l'imagerie rénale montre une lésion chez 86% (données semblables aux études publiées dans le NIH<sup>(4)</sup>), des AML dans 57% des cas et bilatéraux pour 76% de ces patients. Au sein de la cohorte TOSCA<sup>(7)</sup>, on peut noter la présence des AML chez 47,2% des patients. Il est important de préciser que la cohorte TOSCA est constituée de patients jeunes avec une moyenne d'âge de 13,1 ans alors qu'il est connu que les AML apparaissent durant l'adolescence et à l'âge adulte.

D'un point de vue génétique, chez 81 des 103 patients qui composent notre cohorte, une première analyse génétique par méthode Sanger a été réalisée. Grâce à ce séquençage, on a pu révéler une mutation chez 56 patients, et chez les 25 restants aucune mutation n'a pas pu être identifiée (= NMI). Parmi les 81 patients, on note la présence dans 22% des cas, d'une mutation TSC1, dans 48% des cas d'une mutation TSC2 et 30% de NMI. En fonction des études, ces proportions peuvent varier allant de 10% à 30% de mutation TSC1<sup>(5)</sup>, 50% à 70% de mutation TSC2<sup>(5)</sup> et 10 à 24% de patients NMI<sup>(16)</sup>.

Nous avons pu étudier les patients de la cohorte ayant réalisé une analyse génétique par NGS, sujet principal de notre étude. Cependant au vu du manque d'études comparatives portant uniquement sur des patients génotypés par NGS, leurs données sont comparées avec celles récoltées dans l'ensemble de la cohorte. Ces dernières sont elles-mêmes relativement semblables à celles décrites dans la littérature comme vue ci-dessus. Les patients génotypés par NGS présentent moins de crises d'épilepsie, moins de troubles neuropsychologiques, moins de macules hypomélaniques, moins AML et moins de SEGA que ceux génotypés par Sanger. Seul les NSE sont plus fréquemment retrouvés chez ces patients. Ces résultats coïncident avec ceux de l'étude de Tyburczy M.<sup>(18)</sup> et ceux de l'étude de Peron A.<sup>(16)</sup> où les patients qui n'ont pas été génotypés par Sanger sont moins fréquemment et sévèrement atteints.

Dans notre étude, les NMI représentent 30% des patients testés par Sanger, soit 24% des patients de la cohorte des CUSL, ces valeurs sont semblables à celles provenant de l'étude de Peron A.<sup>(16)</sup> où on dénombre 10 à 24% de NMI. L'étude de Peron A. de l'université de Milan s'intéresse à une cohorte de 22 patients NMI âgés de 3 à 58 ans.<sup>(16)</sup> elle reprend également des données concernant les patients NMI provenant d'autres études.<sup>(16)</sup>

Sur les 19 patients NMI, 16 ont été génotypés (84%) et 3 non-génotypés (16%). Les 3 non-génotypés présentent des phénotypes faibles, leur diagnostic de STB pourrait être à revoir. Les données portant sur les NMI ne nous indiquent pas plusieurs informations telles que la prévalence de NMI post-NGS, le nombre éventuel de diagnostics à revoir et si les phénotypes faibles ont été exclus.

Après une comparaison avec le tableau ci-dessous provenant de l'étude de Peron A, on peut constater que seuls les NSE et les « peau de chagrin » sont plus fréquemment retrouvés chez nos patients NMI. Cette différence pourrait être causée par le nombre restreint d'études comparatives. Les SEGA sont quant à eux moins présents. Dans l'ensemble, les diverses manifestations de la maladie étudiées sont plus fréquemment retrouvées chez les patients génotypés par NGS que chez les patients NMI post-Sanger. La seule exception concerne les AML qui sont légèrement moins présents. Cette tendance est évoquée au sein de la littérature, notamment dans les études de Tyburczy M, et Peron A ; celles-ci précisent que les patients non génotypés par NGS présentent les phénotypes les moins sévères de la maladie, notre étude en compte 3 ainsi que 6 patients à génotype inconnu n'ayant pas réalisé d'analyse par NGS.

Tableau 4 : Caractéristiques des patients NMI

	NMI (%)	DI	Épilepsie	TC	NSE	SEGA	MH	AF	PC	AML
Dabora et al., 2001 <sup>(22)</sup>	38/224 (17%)	54%	68%	79%	76%	5%	74%	58%	26%	46%
Sancak et al., 2005 <sup>(23)</sup>	27/276 (10%)	36%	68%	78%	82%	7%	74%	64%	19%	56%
Rakowski et al., 2006 <sup>(24)</sup>	23/136 (17%)	/	/	/	/	/	/	/	/	48%
Au et al., 2007 <sup>(25)</sup>	74/308 (24%)	39%	60%	71%	67%	13%	78%	53%	30%	39%
Camposano et al., 2009 <sup>(17)</sup>	23/157 (15%)	17%	56%	78%	70%	13%	/	/	/	43%
Black et al., 2012 <sup>(26)</sup>	25/161 (16%)	/	/	/	/	/	/	/	/	57%
Boronat et al., 2014 <sup>(27)</sup>	42/280 (15%)	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Peron et al, 2018 <sup>(16)</sup>	22/240 (9%)	5%	60%	95%	68%	0%	75%	85%	10%	68%
Etude actuelle	25/103 (24%)	37%	67%	87%	87%	0%	48%	65%	39%	43%
Patients NMI génotypés	16/19 (84%)	50%	69%	94%	94%	0%	62%	81%	44%	38%

DI : Déficience intellectuelle et comportementale ; TC : tubers corticaux ; NSE : nodules sous-épendymaire ; SEGA : astrocytome sous-épendymaire à cellules géantes ; MH : Macules Hypomélaniques ; AF : Angiofibromes de la face ; PC : Peau de chagrin ; AML : Angiomyolipome

À travers ces différentes analyses, la tendance révélée par notre étude nous montre que nos patients génotypés par NGS présentent au niveau phénotypique moins de troubles neuropsychologiques, de crises d'épilepsie, de macules hypomélaniques et d'AML que chez les patients génotypés par Sanger. Les fréquences pour le reste des manifestations étudiées de la maladie semblent être similaires. Une des hypothèses avancée pourrait être que les mutations retrouvées par Sanger sont plus sévères (large délétions, codon stop etc), pouvant les rendre plus facilement identifiables. Les mutations identifiées par NGS pourraient, quant à elles, être passées inaperçues car plus petites, on retrouve également 2 patients atteints de mosaïcisme ce qui atténue le phénotype. Cependant cette hypothèse n'a pas été vérifiée, en effet les mutations retrouvées par NGS sont connues alors que nous n'avons pas relevé le type de mutations retrouvées par la technique Sanger. Les patients génotypés par NGS, quant à eux, présentent un profil plus sévère que l'ensemble des patients NMI après séquençage par la méthode Sanger.

Le classement, concernant la sévérité de la maladie en fonction de la génétique, établi dans l'étude de Tyburczy A. <sup>(18)</sup> coïncide au notre. Dans notre classement, les patients les plus sévères semblent être ceux génotypés par méthode Sanger (avec les TSC2 qui sont les plus atteints), suivis des patients génotypés par NGS (avec les TSC2 qui sont les plus atteints), suivis des non génotypés par Sanger et pour finir ceux non génotypés après un séquençage par NGS.

À la fois chez les patients NMI et chez ceux génotypés par Sanger, il ne nous a pas été possible de mettre en évidence une manifestation clinique caractérisant les patients de ces populations. Cette conclusion concernant les patients NMI est également relevée dans l'étude de Peron A, publiée dans l'European Journal of Medical Genetics <sup>(16)</sup>.

Comme rapporté précédemment dans l'étude de Tyburczy A<sup>(18)</sup>, et dans celle Lam HC<sup>(8)</sup>, l'analyse par NGS a permis de repérer un grand nombre de mutations non identifiées auparavant. Dans le cas de notre étude, 84% des patients ayant réalisé un séquençage par NGS sont revenus positifs à une mutation (cela est semblable au 85% de l'étude de Lam HC<sup>(8)</sup>). Ces études laissent peu de place quant à la présence d'un 3<sup>ème</sup> gène responsable de la maladie et laissent à supposer que les patients non diagnostiqués par NGS présentent soit un mosaïcisme intéressant un nombre extrêmement faible de cellules, soit un diagnostic à remettre en cause<sup>(18)</sup>.

Cependant il est à mentionner qu'il existe quelques limites au sein de notre étude. Ce travail est un recueil de données rétrospectives, et certaines d'entre elles sont donc manquantes. La prise en charge d'un seul centre confère à notre étude un effet monocentrique non généralisable, bien que les patients proviennent de toute la Wallonie, ce qui représente une large couverture géographique.

Concernant les patients atteints de mosaïcisme, notre étude en a recensé 2 cas de mosaïques par NGS (2/16 ; 13,3%). Un mosaïcisme diagnostiqué par NGS, est dit comme à faible taux de mosaïcisme (low-level mosaicism) avec moins de 10% des cellules atteintes par la mutation. Ces patients présentent un phénotype moins sévère avec habituellement un ou deux systèmes différents atteints. Les angiofibromes unilatéraux de la face sont les atteintes les plus caractéristiques d'une mosaïque et permettent cliniquement de suspecter une mosaïcisme chez un patient<sup>(28)(29)</sup>. À travers les deux profils retrouvés dans notre étude, on peut se rendre compte que les atteintes et la sévérité sont variables. La variabilité est expliquée par le fait que chez ces patients, un taux faible de cellules est atteint, ces cellules sont issues de tissus différents, le type de tissu dépend du moment durant lequel survient la mutation durant l'embryogenèse<sup>(28)</sup>.

Tableau 5 : Patient N°36

<b>N° du patient</b>	36
<b>Âge</b>	42
<b>Sexe</b>	Féminin
<b>Âge au moment du diagnostic</b>	Durant l'enfance
<b>Mutation</b>	TSC2: mosaïcisme 20% délétion des exons 15 et 16 du gène TSC2 et d'une insertion de trinuécléotide TCA : c.1443+33_1716+1544delinsTCA / p.?
<b>Base de données</b>	Cette mutation est connue depuis plus de 20 ans comme étant pathogène
<b>Histoire familiale</b>	Négative
<b>Manifestations rénales (date de la dernière imagerie)</b>	(2016) Uroscanner : Antécédant de néphrectomie gauche et néphrectomie polaire supérieure droite + Kyste annexiel gauche de 38mm + Néphromégalie droite avec saignement sur fond d'angiomyomatose
<b>Manifestations neurologiques</b>	Crise d'épilepsie + épisode de mouvements cloniques et hypertonie généralisée avec perte de connaissance et morsure de langue + retard mental léger
<b>Imageries cérébrales</b>	Multiplés tubers corticaux frontaux et pariétaux bilatéraux avec des anomalies de la substance blanche principalement pariétale et occipitale + nodules sous-épendymaires
<b>Manifestations dermatologiques</b>	/

Tableau 6 : Patient N°72

<b>N° du patient</b>	72
<b>Âge</b>	42
<b>Sexe</b>	Masculin
<b>Âge au moment du diagnostic</b>	45 ans
<b>Mutation</b>	TSC2 : mosaïcisme 2% substitution d'une fraction allélique de 2% : c.1257+1G>A
<b>Base de données</b>	La mutation n'est rapportée que par 6 groupes de travail dont 3 sont apparus de novo, indiquant une très faible prévalence de la mutation
<b>Histoire familiale</b>	Peut-être fils
<b>Manifestations rénales (date de la dernière imagerie)</b>	(2017) IRM: multiples AML bilatéraux // gauche: Lésion nodulaire polaire inf (24x17mm) + AML importants de 14, 16, 21mm au pôle supérieur // droite: AML importants de 16 mm pôle inf, 15 et 12mm pôle sup
<b>Manifestations neurologiques</b>	/
<b>Imageries cérébrales</b>	Multiplés tubers cortico-sous-corticaux + multiplés tubers nodulaires épendymaires
<b>Manifestations dermatologiques</b>	/

La lecture d'un mosaïcisme peut se faire comme suit : chez un patient atteint d'une mutation à l'état hétérozygote dans toutes les cellules du corps, au NGS on retrouve aux alentours de 50% de mutation sur l'ensemble des fragments d'ADN correspondant au gène atteint. Chez une personne atteinte d'un mosaïcisme, on ne retrouve pas 50% d'allèle muté, mais un pourcentage inférieur signifiant que l'ensemble des cellules du corps ne sont pas toutes porteuses d'un allèle muté (ex : 27% d'allèle muté signifie que 33% des cellules ne présentent pas de mutation dans les allèles des gènes TSC 1 ou 2 et 27% présentent une mutation sur l'un des 2 allèles). Pour 2,3% d'allèle muté sur base de l'échantillon sanguin, il n'aurait pas été possible de repérer la mutation autrement que par NGS, grâce aux nombreuses reads de 300 bases formées.

## 5. CONCLUSION

---

On peut conclure que notre cohorte présente des caractéristiques semblables aux larges séries publiées précédemment. Une majorité des patients a pu être diagnostiquée par Sanger. Pour les patients NMI après ce séquençage par Sanger, une majorité a pu être génotypée par NGS. Les patients présentant le phénotype le plus sévère semblent être ceux génotypés par méthode Sanger (avec les TSC2 qui sont les plus atteints), suivis des patients génotypés par NGS (avec les TSC2 qui sont les plus atteints), suivis des non génotypés par Sanger et pour finir les patients atteints d'un mosaïcisme.

La technique de séquençage de l'ADN par NGS permet de retrouver des mutations peu connues ou intéressant un nombre restreint de cellules. Actuellement, la méthode de choix pour le diagnostic de la maladie devrait être le séquençage par NGS et si aucune mutation n'est identifiée, il faudrait envisager de revoir le diagnostic selon les critères cliniques. Notre étude ne nous a également pas permis de dégager une caractéristique propre aux génotypés par NGS, leurs phénotypes sont simplement atténués.

Pour finir, malgré l'apport considérable de la génétique, la place du clinicien est primordiale. Le clinicien s'aide des données génétiques pour établir un pronostic et traiter son patient. Étudier la corrélation génotype-phénotype et l'utiliser apporte un bénéfice pour le patient et ses apparentés quant à leur prise en charge. Continuer à étudier ces corrélations permet de faire avancer nos connaissances de la génomique dans l'espoir d'apporter de nouvelles solutions thérapeutiques.

# 6. RÉFÉRENCES

---

- (1) Curatolo P, Bombardieri R, Jozwiak S. Tuberous sclerosis. *Lancet* 2008; 372: 657–668.
- (2) Krueger DA, MD, PhD. Tuberous Sclerosis Complex Surveillance and Management: Recommendation of the 2012 International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference. *NIH Public Access Author Manuscript*. 2013 10; 49(4): 255-265 doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2013.08.002
- (3) Dekeuleneer V, Ho T-A, Van Rijckevorsel K, Sznajder Y, Nassogne M-C, Godefroid N, Derouaux A-S, Pirson Y. Les inhibiteurs mTOR: nouvel outil thérapeutique dans la prise en charge de la Sclérose tubéreuse de Bourneville. *louvain med* 2015; 134 (10): 537-546
- (4) Krueger DA, MD, PhD. Tuberous Sclerosis Complex Diagnostic Criteria Update: Recommendation of the 2012 International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference. *NIH Public Access Author Manuscript*. 2013 10; 49(4): 243-254 doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2013.08.002
- (5) Crino PB, D.Ph., Nathanson KL, Petri Henske E. The Tuberous Sclerosis Complex. *N Eng J Med*. 2006 9: 1345-1356. 2006;355:1345-56.
- (6) Papadopoulou A, et al., Screening for TSC1 and TSC2 mutations using NGS in Greek children with tuberous sclerosis syndrome, *European Journal of Paediatric Neurology* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2018.01.026>
- (7) Kingswood JC, d’Augères GB, Belousova E, et al. Tuberous Sclerosis registry to increase disease Awareness (TOSCA) – baseline data on 2093 patients. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2017 2: 1-13. doi : 10.1186/s13023-016-0553-5
- (8) Lam HC, Nijmeh J, Petri Henske E. New developments in the genetics and pathogenesis of tumours in tuberous sclerosis complex. *J Pathol* 2017; 241: 219–225. DOI: 10.1002/path.4827
- (9) Annexe A: modèle de formulaire de demande destiné au médecin-conseil pour un angiomyolipome rénal (AML) associé à une sclérose tubéreuse de Bourneville (STB). Formulaire de demande de remboursement de la spécialité Votubia® (§ 8180000 du chapitre IV de l’A.R. du 21 décembre 2001). Belgique, version valable à partir du 01/08/2016
- (10) Cottin V, Nabbout R, Rouvière O, and al. Sclérose tubéreuse de Bourneville. *Orphanet* 02 2015. (Page consulté le 15 mars 2020 sur la page [www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/ScleroseTubereuseBourneville-FRfrPub660.pdf](http://www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/ScleroseTubereuseBourneville-FRfrPub660.pdf))
- (11) Séquençage de l’ADN, méthode Sangerr, 2020, Wikipédia [en ligne]. [Consulté le 22 mars 2020]. Disponible à l’adresse [https://fr.wikipedia.org/wiki/S%C3%A9quen%C3%A7age\\_de\\_l%27ADN](https://fr.wikipedia.org/wiki/S%C3%A9quen%C3%A7age_de_l%27ADN)
- (12) Cours de génétique médicale master 1 Université de Saint-Luc: Sznajder Y., De Leener A.
- (13) Séquençage de l’ADN, nouvelle technique de séquençage de l’ADN, 2020, Wikipédia [en ligne]. [Consulté le 22 mars 2020]. Disponible à l’adresse [https://fr.wikipedia.org/wiki/S%C3%A9quen%C3%A7age\\_de\\_l%27ADN](https://fr.wikipedia.org/wiki/S%C3%A9quen%C3%A7age_de_l%27ADN)
- (14) Procédure de laboratoire, Département des laboratoires cliniques (Cliniques Universitaires Saint-Luc) : Construction d’une librairie d’ADNg sur base du processus Kapa ; Construction d’une librairie

- (15) Audebert C. « MiSeq vs PGM : équilibre du temps de parole ». 30 mars 2012 (Consulté le 3 février 2020 à l'adresse <https://www.biorigami.com/?tag=erreurs-de-sequencage>)
- (16) Peron A, Vignoli A, La Briola F. Deep phenotyping of patients with Tuberous Sclerosis Complex and no mutation identified in TSC1 and TSC2. *European Journal of Medical Genetics* 61. 2018; 403-410. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2018.02.005>
- (17) Camposano S, Greenberg E, Kwiatkowski D and al. Distinct clinical characteristics of Tuberous Sclerosis Complex patients with no mutation identified. *NIH Public Access Author Manuscript*. 2009 3 ; 73(2): 141–146. doi:10.1111/j.1469-1809.2008.00496.x.
- (18) Tyburczy M, Dies K, Glass J. Mosaic and Intronic Mutations in TSC1/TSC2 Explain the Majority of TSC Patients with No Mutation Identified by Conventional Testing, *PLOS GENETICS* 2015 11; 1-17. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005637
- (19) Marc Marie-Ève , Thèse : place de l'évérolimus dans la prise en charge des complications de la sclérose tubéreuse de Bourneville pour l'Université de Toulouse III Paul Sabatier. Publié le 8 janvier 2015. Disponible sur <http://thesesante.ups-tlse.fr/751/1/2015TOU32005.pdf>
- (20) Bissler J, Kingswood C, Radzikowska E, and al. Everolimus for angiomyolipoma associated with tuberous sclerosis complex or sporadic lymphangiomyomatosis (EXIST-2): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2013; 381: 817–824. <http://dx.doi.org/10.1016/>
- (21) FORM-4910\_Délais de réponse des analyses génétiques moléculaires\_Rev 3\_19janvier2017 (page consultée le 20 janvier 2020 à l'adresse <https://www.saintluc.be/laboratoires/analyses/form-4910-delais-reponses-genetique-moleculaire-2018-02-21.pdf>)
- (22) Dabora, S.L., Jozwiak, S., Franz, D.N., et al. Mutational analysis in a cohort of 224 tuberous sclerosis patients indicates increased severity of TSC2, compared with TSC1, disease in multiple organs. *Am. J. Hum. Genet* 2001. 68 (1), 64–80. DOI : <https://doi.org/10.1086/316951>
- (23) Sancak, O., Nellist, M., Goedbloed, M., et al. Mutational analysis of the TSC1 and TSC2 genes in a diagnostic setting: genotype–phenotype correlations and comparison of diagnostic DNA techniques in Tuberous Sclerosis Complex. *Eur. J. Hum. Genet*. 03/2005. 13 (6), 731–741. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201402>
- (24) Rakowski, S.K., Winterkorn, E.B., Paul, E., et al. Renal manifestations of tuberous sclerosis complex: incidence, prognosis, and predictive factors. *Kidney Int*. 11/2006. 70; 1777–1782. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5001853>
- (25) Au, K.S., Williams, A.T., Roach, E.S., et al. Genotype/phenotype correlation in 325 individuals referred for a diagnosis of tuberous sclerosis complex in the United States. *Genetics in Medicine*. 02/2007. 9, 88–100. DOI : <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e31803068c7>
- (26) Black M.E., Hedgire S.S., Camposano S., and al., Hepatic manifestations of tuberous sclerosis complex: a genotypic and phenotypic analysis. *Clin. Genet*. 01/2012. 82, 552–557. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2012.01845.x>

- (27) Boronat S., Caruso P., Thiele E.A. Absence of subependymal nodules in patients with tubers suggests possible neuroectodermal mosaicism in tuberous sclerosis complex. *Dev. Med. Child Neurol.* 06/2014. 56 (12), 1207–1211. DOI : <https://doi.org/10.1111/dmcn.12523>
- (28) Trechel A, Hamieh L, Nathan N, and al. Phenotypic distinctions between mosaic forms of tuberous sclerosis complex. *Genetics inMedecine* 2019.DOI: <https://doi.org/10.1038/s41436-019-0520-3>
- (29) Giannoukou K, Lasseter K, Grivelink J, and al. Low-level mosaicism in tuberous sclerosis complex: prevalence, clinical features, and risk of disease transmission. *Genetics inMedecine* 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41436-019-0562-6>

UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN  
Faculté de médecine et médecine dentaire

Avenue Mounier, 50 bte B1.50.04, 1200 Woluwe-Saint-Lambert, Belgique | [www.uclouvain.be/mede](http://www.uclouvain.be/mede)