



HAL
open science

Évaluation des corrélations phénotype-génotype dans la neurofibromatose de type 1

Alexandre da Silva, Selma Metaane, Sandro Pizzighella, Emmanuel Curis,
Audrey Sabbagh, Ioannis Nicolis

► **To cite this version:**

Alexandre da Silva, Selma Metaane, Sandro Pizzighella, Emmanuel Curis, Audrey Sabbagh, et al..
Évaluation des corrélations phénotype-génotype dans la neurofibromatose de type 1. *Acta discipulo-
rum academiae medicamentariae artis*, 2016, UE LC 9 Cas pratiques d'analyses de données expéri-
mentales, 1, pp.7-14. hal-01379549

HAL Id: hal-01379549

<https://hal.science/hal-01379549>

Submitted on 11 Oct 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Évaluation des corrélations phénotype-génotype dans la neurofibromatose de type 1

Étudiants : Alexandre DA SILVA, Selma METAANE, Sandro PIZZIGHELLA

Enseignants : Emmanuel CURIS, Audrey SABBAGH, Ioannis NICOLIS

Introduction

La neurofibromatose de type 1 (NF1 ; numéro OMIM 162200), ou maladie de Von Recklinghausen, est l'une des maladies génétiques rares les plus fréquentes. Elle a une répartition mondiale homogène et une incidence estimée à 1 cas pour 2500 naissances [1].

Il s'agit d'une maladie à transmission autosomique dominante dont la pénétrance est quasi-complète à l'âge de huit ans [2]. Le gène *NF1* responsable de la maladie est localisé sur le bras long du chromosome 17, en position 17q11.2. Il s'agit d'un gène suppresseur de tumeur de grande taille qui code la neurofibromine 1 (OMIM 613113), une protéine cytoplasmique.

La neurofibromatose est caractérisée par une très grande variabilité de son expression phénotypique, notamment au sein de la même famille [3]. Certains patients sont susceptibles de développer une forme plus sévère de la maladie tout en ayant la même mutation qu'un patient dont les symptômes sont moins importants. La grande variabilité phénotypique pourrait être liée à l'importante diversité des mutations causales à l'origine de la très grande hétérogénéité allélique observée dans la neurofibromatose.

Les mutations mises en cause sont les mutations faux-sens, non-sens, d'épissage et les délétions. Les grandes délétions du gène *NF1* se caractérisent par une délétion du gène entier *NF1* mais également d'une douzaine de gènes situés à proximité. La délétion simultanée de tous les gènes peut expliquer le phénotype un peu particulier des patients porteurs d'une grande délétion.

Nous nous proposons ici d'étudier l'influence du type d'altération génétique sur la variabilité de l'expression de la maladie, afin de mettre en lumière certaines corrélations génotype-phénotype et d'en déduire de possibles mécanismes physiopathologiques à l'origine des divers symptômes caractéristiques.

Variabilité phénotypique de la pathologie

Les principaux symptômes de la neurofibromatose de type 1 sont la présence de macules « café-au-lait », de lentigines (petites taches café-au-lait localisées) axillaires et inguinales, de neurofibromes cutanés et de nodules de Lisch (petits hamartomes de l'iris qui n'entraînent pas de troubles visuels). On peut également observer dans les formes plus graves des difficultés d'apprentissage, des neurofibromes plexiformes, des dysmorphies, des scolioses ou des neurofibrosarcomes.

En dépit de l'identification du gène *NF1* impliqué dans la maladie et de l'analyse systématique des différentes mutations rencontrées chez les patients atteints, il demeure difficile d'établir une corrélation entre le génotype et le phénotype reposant sur une explication physiopathologique claire.

Grâce à la création du réseau NF-France et de sa base de données, il est désormais possible de collecter des données permettant de faire ressortir des tendances en termes de fréquences, ainsi que d'éventuelles corrélations entre les différents critères étudiés.

Matériel & Méthodes

Patients

Les données utilisées proviennent de la banque de données du réseau NF-France. Il s'agit d'une vaste banque de données de génotypes et phénotypes constituée afin d'évaluer l'influence du type de mutation délétère sur la variabilité d'expression de la maladie. Cette banque de données inclut 509 sujets atteints de neurofibromatose, non apparentés, pour lesquels une évaluation clinique exhaustive et standardisée a été réalisée et l'anomalie moléculaire du gène *NF1* recherchée.

Les patients ont été recrutés de 2002 à 2005 par un réseau de cliniciens situés dans toute la France. Il s'agissait de patients qui consultaient déjà au centre de dermatologie de divers hôpitaux en France ; les cliniciens demandaient systématiquement à leurs patients s'ils étaient d'accord pour participer à l'étude « *Study of expressivity of NF1: constitution of a phenotype-genotype database* » (programme de recherche clinique PHRC NF1, coordonné par le Pr Wolkenstein, hôpital Henri Mondor, Créteil, France). Les deux plus gros centres sont situés à Paris (Centre de référence national des neurofibromatoses) et Lyon, mais il y avait aussi plusieurs centres de plus petite taille.

Cette étude a été approuvée par le comité local d'éthique et chaque participant a donné un consentement écrit.

Données phénotypiques

Pour chaque patient, la totalité des informations phénotypiques a été collectée et standardisée selon un fichier de report de cas.

Les critères pris en compte étaient le nombre de taches « café-au-lait », le nombre de neurofibromes sous-cutanés, le nombre de neurofibromes cutanés, le nombre de neurofibromes plexiformes, la présence de

nodules de Lisch et de lentiginos, l'existence de difficultés d'apprentissage, d'une dysmorphie faciale et d'une scoliose. Ces données sont également accompagnées des âges et sexes de chacun des 509 patients ainsi que de leurs données génotypiques pour le gène *NF1*, à savoir le type de mutation et l'existence d'une délétion.

Données génotypiques

Les données génotypiques utilisées proviennent des expérimentations effectuées par le laboratoire INSERM UMR745 « Mère et enfant face aux infections tropicales » (PRES Sorbonne Paris Cité, université Paris Descartes, faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris, France).

Pour faciliter l'évaluation d'une éventuelle corrélation entre le type de mutation délétère et le phénotype clinique des patients, les mutations ont été classées en quatre groupes : les grandes délétions, les mutations non-sens, les mutations faux-sens et les mutations d'épissage.

- *Extraction de l'ADN et de l'ARN*

Pour récupérer ces données, l'ADN a été isolé des leucocytes du sang périphérique par extraction au phénol-chloroforme. L'ARN a directement été extrait de 5 mL de sang entier avec un PAXgene™ (Becton Dickinson, Rungis, France) et le PAXgene™ *Blood RNA System* (Qiagen, Courtaboeuf, France) en accord avec le protocole du laboratoire fabricant.

- *Séquençage du gène*

L'analyse des mutations faux-sens et non-sens du gène *NF1* a été réalisée par un séquençage bidirectionnel des 60 exons du gène, préalablement purifiés et amplifiés par P. C. R. La séquence analysée inclut l'exon alternatif 23a [4] et 500 paires de bases du promoteur proximal, défini par analyse fonctionnelle [5, 6]. Les séquences des amorces oligonucléotidiques pour le séquençage de l'ADN sont données dans le tableau additionnel S3. Les séquences ont été alignées avec le logiciel *Seqscape analysis* (version 2.5, Life Technologies) et ont été comparées avec la séquence de référence génomique correspondante NC 000017.10 (nt 29 422 328 à 29 701 173 dans *Human Genome*, assemblage GRCh37/hg19 de février 2009). Les mutations identifiées par cette approche ont été ensuite confirmées par analyse du séquençage de l'exon correspondant.

- *Détection des micro-délétions*

Quatre microsatellites polymorphiques intragéniques ont été génotypés : D17S1166, D17S1307, D17S2163 et IVS38-GT53.0. Les échantillons ayant un haplotype unique ont été testés par recherche de délétion avec une analyse par RT-PCR.

Quatre microsatellites polymorphiques extragéniques (D17S841, D17S635, D17S1800 et D17S798)

ont aussi été testés. Les conditions de P. C. R. et les amorces utilisées ont été décrites dans l'article de Pasmant et coll. (2008).

- *Séquençage de l'ARN*

Le séquençage de l'ARN permet de mettre en évidence les mutations d'épissage.

Les échantillons d'ARN ont été rétro-transcrits avec 50 unités de transcriptase inverse *Superscript II RNase H* (Life Technologies, Saint Aubin, France), 10 unités d'inhibiteur de ribonucléase *RNasin™* (Promega, Madison, WI, USA), 10 mM de dithiothréitol et 1,5 mM d'hexamères aléatoires pd(N)₆-5'-phosphate (Amersham, GE Healthcare Bioscience, Pittsburgh, PA, USA). Les échantillons ont été incubés à 20 °C pendant 10 min puis à 42 °C pendant 30 min. La transcriptase inverse a ensuite été inactivée à 99 °C pendant 5 min et refroidie à 5 °C pendant 5 min. Tout l'ADN complémentaire ainsi obtenu a alors été amplifié en utilisant le système de P. C. R. *Expand Long Template* (Roche). Les amorces ont alors été ajoutées aux fragments de RT-PCR (kit de séquençage ABI *BigDye terminator v1.1*, Life Technologies) dans un séquenceur ABI Prism 3130 « automatic DNA » (Life Technologies).

Les séquences ont été alignées avec le logiciel *Seqscape analysis* (version 2.5, Life Technologies) et comparées à l'A. D. N. complémentaire correspondant (séquence NM 000267.3).

Plan expérimental de l'étude et des données

L'étude statistique conduite ici est une étude systématique de l'influence des variables explicatives sur les variables expliquées. Les variables explicatives sont l'âge du patient, son sexe, et surtout la détection d'une délétion du gène *NF1* ou, le cas échéant, le type de mutation identifié. L'âge est pris en compte afin de voir quelle est l'évolution de la pénétrance de chaque phénotype. Bien que le gène *NF1* soit autosomal, l'influence du sexe est évaluée car certaines différences d'expression pourraient exister (on pourrait penser notamment à une influence hormonale). Les variables de réponse, expliquées, sont les données phénotypiques standardisées.

Pour chacune de nos analyses, les patients dont le lot de données est incomplet pour un critère sont éliminés.

- *Caractéristiques des données*

Parmi les variables explicatives, le critère de délétion est qualitatif binaire (« oui » ou « non ») et le type de mutation a 3 réponses qualitatives non ordonnées (« faux-sens », « non-sens » et « épissage »), un patient ne pouvant avoir à la fois une mutation et une délétion.

Les différents phénotypes examinés, jouant le rôle de variables expliquées, sont de natures très diverses.

Les symptômes associés à la neurofibromatose peuvent être des variables qualitatives binaires (présence ou absence de lentigines, de nodules de Lisch, de dysmorphie faciale, de scoliose et de neurofibrosarcome, existence ou non de difficultés d'apprentissage), des variables qualitatives ordonnées représentant des intervalles quantitatifs (« absence », « entre 1 et 10 », « entre 11 et 100 » et « supérieur à 100 » pour le nombre de neurofibromes cutanés et sous-cutanés), des variables quantitatives discrètes (entier positif pour le nombre de taches « café au lait » ou de neurofibromes plexiformes). Face à la faible étendue des réponses au critère « nombre de neurofibromes plexiformes » (allant de 0 à 4), cette variable sera assimilée par la suite à une variable qualitative ordonnée.

- *Statistiques univariées*

Dans un premier temps seront réalisées les statistiques univariées. Les tests adéquats seront utilisés en fonction de la nature des variables comparées. D'emblée, il est nécessaire de tester la normalité des variables quantitatives : cela sera fait à l'aide du test de Shapiro-Wilk. Les comparaisons de moyennes, de proportions ou d'effectifs seront faites au moyen des tests suivants :

- test du khi-deux pour deux critères qualitatifs (exemple : étude du lien entre le sexe et la présence de dysmorphie) ;
- test de Wilcoxon ou de Student (si la variable quantitative est normale) pour échantillons non appariés dans le cas de comparaisons de deux moyennes (moyennes d'une donnée quantitative pour deux populations répondant à un critère qualitatif différent) ;
- test de Kruskal-Wallis dans la comparaison de plus de deux moyennes.

- *Modèles de régression*

Les modèles de régression quantifieront la contribution de chacune des variables. La nature des variables joue également dans le choix des modèles de régression utilisés. Dans notre étude, trois cas se distinguent :

- une variable quantitative est expliquée : on fera appel au modèle linéaire ;
- une variable qualitative binaire est expliquée : on utilisera la régression logistique ;
- une variable qualitative ordinale est expliquée : on fait appel à une variante de la régression logistique appelée régression polytomique ordinale, réalisée sous R grâce à la bibliothèque « ordinal » [7].

Pour que ces modèles soient interprétables, l'hypothèse de normalité des erreurs doit être vérifiée, ce qui a également été fait au moyen du test de Shapiro-Wilk. À défaut, les intervalles de confiance des estimations ne sont pas sûrs et les tendances qui en découlent seront difficilement quantifiables. La

Corrélation génotype-phénotype dans la neurofibromatose de type 1
validation du modèle linéaire nécessite également la vérification de l'hypothèse de linéarité et l'homoscédasticité (ce qui sera fait grâce à l'utilisation du test de Bartlett ou de Levene). On s'assurera par ailleurs qu'aucun point n'influe trop sur les résultats du modèle en mesurant la distance de Cook, ne devant pas dépasser 1.

Les modèles obtenus peuvent être optimisés de différentes manières. D'une part, si des variables quantitatives interviennent dans le modèle, elles peuvent être transformées par des fonctions usuelles, dans la limite de leur domaine de définition. D'autre part, dans le cas d'un modèle multivarié, si une variable n'apporte aucune information (ou une part négligeable), il est possible de la supprimer. L'effet de cette variable est alors « ventilé » entre les autres effets et l'erreur résiduelle. Toutefois, si l'on procède de la sorte pour de nombreuses variables, le risque de démontrer un effet significatif alors qu'il ne l'est pas est augmenté.

Résultats

Plusieurs types de tests statistiques sont réalisés dans cette analyse statistique. Le test utilisé pour la détermination des degrés de signification (p) est indiqué par une lettre en exposant : a pour un test du khi-deux, b pour un test de Wilcoxon, c pour un test de Kruskal-Wallis et d pour un test de Shapiro-Wilk.

Statistiques univariées

Les statistiques descriptives reposent sur l'intégralité des données des 509 patients.

Les âges moyens diffèrent de manière significative ($p = 0,0002^b$; tableau 1), les patients avec délétion étant bien plus jeunes que ceux portant une mutation (médiane à 14,7 ans contre 30,3 ans). Aucune distribution d'âge ne satisfait l'hypothèse de normalité ($p < 4 \times 10^{-8}^d$). Par ailleurs, la répartition des patients par sexe est plutôt équilibrée, ce qui permet une détermination optimale de l'influence du sexe sur les symptômes.

Certains symptômes sont rares (tel les neurofibrosarcomes ; tableau 2) et la distribution des neurofibromes diffère en fonction de leur localisation cutanée ou sous-cutanée ($p = 4,97 \times 10^{-7}^a$), avec une plus forte proportion de patients atteints d'un grand nombre de taches cutanées que de taches sous-cutanées. Il est également important de noter l'hétérogénéité de la taille des échantillons pour chaque paramètre étudié, puisqu'elle s'échelonne entre 322 et 507 individus. La variabilité d'effectif, due à des données manquantes pour certains patients, peut entraîner une diminution de la puissance des tests.

Des différences notables de répartition en fonction de l'âge, du sexe et du type d'altération génique ont été trouvées. En procédant purement par comparaison d'effectifs, ou de moyennes, l'âge est la

variable présentant le plus fréquemment de fortes corrélations avec la prévalence des symptômes. L'augmentation de l'âge semble être associée à un plus grand nombre de porteurs de lentiginos ($p = 0,0078^b$) et à un plus grand nombre de neurofibromes sous-cutanés ($p = 1,5 \times 10^{-8}$), cutanés ($p = 2,2 \times 10^{-16}$) et plexiformes ($p = 0,0008^c$). Les porteurs de nodules de Lisch sont également plus âgés que les non-porteurs ($p = 1,1 \times 10^{-9}$). Inversement, l'âge pourrait aller de pair avec une diminution des difficultés d'apprentissage ($p = 0,0004^b$) et des cas de dysmorphies faciales ($p = 8,3 \times 10^{-7}$). Le lien statistique entre le sexe et les paramètres étudiés est plus ténu, avec des valeurs de tests souvent à la limite du seuil de significativité : il pourrait y avoir une certaine tendance pour les femmes à développer davantage de taches café-au-lait ($p = 0,0849^b$) et elles seraient moins sujettes aux difficultés d'apprentissage ($p = 0,052^a$). Enfin, pour se focaliser davantage sur l'origine génétique de la neurofibromatose, les corrélations entre délétions ou type de mutation et les symptômes sont variables, mais parfois très fortes. En effet, les sujets présentant une délétion du gène *NF1* semblent avoir moins de nodules de Lisch ($p = 0,0330^a$) mais plus de difficultés d'apprentissage ($p = 3,1 \times 10^{-6}$) et de dysmorphie ($p = 9,2 \times 10^{-14}$), comparativement aux sujets ayant des mutations. D'autre part, les difficultés d'apprentissage diffèrent significativement selon le type de mutation ($p = 0,0420^a$).

Ainsi, les diverses variables explicatives semblent indépendantes entre elles, à l'exception du lien entre l'âge et la délétion : il apparaît un âge moyen plus bas pour les porteurs de délétion ($p = 1,24 \times 10^{-5}$). Ce biais sera donc systématiquement considéré par la suite.

Statistiques multivariées

Les statistiques multivariées visent ici à mesurer l'impact propre de chaque paramètre sur les phénotypes observés.

Nous avons considéré deux cas de patients : le premier cas correspond aux patients porteurs d'une

délétion ; le second cas inclut les patients dont le gène *NF1* ne présente pas de délétion mais des mutations, d'un type déterminé, les deux cas étant exclusifs l'un de l'autre. La significativité de différences éventuelles est alors étudiée au sein des deux groupes traités de manière indépendante. Alternativement, la combinaison des deux variables permet de les comparer l'une à l'autre, ce qui peut être utile dans le cas où la délétion et le type de mutation ont tous deux un impact significatif.

La réalisation des modèles pour chaque symptôme a abouti à des résultats dont la validité n'est pas totale. En effet, l'une des hypothèses, celle de la normalité des résidus, n'est jamais vérifiée, le degré de signification du test de Shapiro-Wilk appliqué à ces résidus n'atteignant dans le meilleur des cas que 10^{-9} . En revanche, aucun point n'est trop aberrant (la distance de Cook pour chaque point est systématiquement inférieure à 1). Les valeurs de R^2 et de R^2 ajusté sont disponibles en annexe pour chaque test.

- *Taches café-au-lait*

Bien que le nombre de taches café-au-lait ne suive pas une loi normale, une régression linéaire a été réalisée, en supposant que ses propriétés asymptotiques s'appliquent pour la taille de notre échantillon.

Il apparaît une influence évidente de l'âge ($p = 0,0012$) : le nombre de taches diminue avec l'âge du patient. Le sexe, *a priori*, influencerait légèrement sur le nombre de taches ($p = 0,0974$), avec davantage de taches chez les individus de sexe féminin.

La délétion ne semble jouer presque aucun rôle ($p > 0,2043$). En ce qui concerne le type de mutation, les porteurs de mutations non-sens semblent développer davantage de taches ($p = 0,0076$), quand le type de mutation est considéré séparément de la délétion.

- *Neurofibromes sous-cutanés*

Le caractère qualitatif ordinal du nombre de neurofibromes sous-cutanés (et cutanés) impose

Tableau 1 : Effectif et caractéristiques des patients en fonction du type d'atteinte génique

Parmi les patients de l'étude, ceux qui ont une délétion sont plus jeunes que ceux présentant une mutation, quelle qu'elle soit. Cette moyenne d'âge n'est pas expliquée par une variance plus élevée, les âges aux 1^{er} et 3^e quartiles étant également plus bas que dans le cas des patients avec mutation. En revanche, les proportions d'individus de sexe masculin et féminin sont quasi-similaires.

	<i>Grande délétion</i>	<i>Mutation</i>			
		<i>Non-sens</i>	<i>Faux-sens</i>	<i>D'épissage</i>	
Effectif	58	265	41	145	
Moyenne ± écart-type	20,5 ± 17,6	29,4 ± 16,9	33,3 ± 18,1	30,2 ± 16,2	
Médiane	14,7	27,4	36,5	30,8	
1 ^{er} et 3 ^e quartiles	5,0 – 32,5	16,3 – 43,4	22,7 – 46,2	17,9 – 42,3	
Effectif par sexe	H	27 (47%)	118 (45%)	20 (49%)	73 (50%)
	F	31 (53%)	147 (55%)	21 (51%)	72 (50%)

l'utilisation de la régression logistique polytomique

<i>Paramètre considéré</i>	<i>Effectif ou moyenne</i>
Nombre moyen de taches « café au lait »	21,3 ± 15,0 (n = 465)
Neurofibromes cutanés	(n = 502)
Aucune	34,2 %
1 à 10	20,9 %
11 à 100	26,0%
> 100	18,9 %
Neurofibromes sous-cutanés	(n = 507)
Aucune	45,2 %
1 à 10	41,8 %
11 à 100	10,7 %
> 100	1,7 %
Neurofibromes plexiformes (moyenne)	0,68 ± 1,01 (n = 493)
Nodules	59,0 % (n = 322)
Difficultés d'apprentissage	49,4 % (n = 506)
Dysmorphie	15,9 % (n = 483)
Scoliose	37,8 % (n = 505)
Neurofibrosarcome	3,0 % (n = 505)

Tableau 2 : prévalence des symptômes dans la population d'étude

Les effectifs indiqués correspondent à ceux présentant le paramètre considéré. La prévalence de différents symptômes associés à la neurofibromatose est très hétérogène : les neurofibrosarcomes sont relativement rares (3 % des individus), tandis que 65,8 % sont concernés par les neurofibromes cutanés.

ordinaire.

L'âge est là encore le facteur permettant d'expliquer le mieux le nombre de neurofibromes sous-cutanés. ($p = 2,2 \times 10^{-8}$). Le sexe joue également un rôle, mais bien plus modeste ($p = 0,0351$). Les individus âgés et de sexe masculin ont significativement plus de neurofibromes de ce type.

Ni les délétions, ni le type de mutation ne semblent être associés au nombre de neurofibromes sous-cutanés.

- *Neurofibromes cutanés*

Les neurofibromes cutanés apparaissent essentiellement corrélés avec l'âge ($p < 2 \times 10^{-16}$), et bien plus faiblement avec le sexe que les neurofibromes sous-cutanés.

La délétion atteint un seuil significatif après optimisation du modèle ($p = 0,0384$), mais une fois encore difficile à interpréter du fait de la forte corrélation entre l'âge et la présence d'une délétion. L'influence du type de mutation est, lui, négligeable ($p > 0,0489$ mais sans tenir compte de l'âge qui a un effet prédominant).

Corrélation génotype-phénotype dans la neurofibromatose de type 1

- *Neurofibromes plexiformes*

Le nombre de neurofibromes plexiformes est compris entre 0 et 4. Un dénombrement d'entiers sur un intervalle réduit amène à considérer ce nombre comme variable quantitative discrète ou comme variable qualitative ordinaire à 5 classes. De fait, les conclusions sont identiques : seul l'âge est corrélé au nombre de neurofibromes plexiformes, les deux variables augmentant de manière concomitante ($p = 0,0002$), aucune autre variable n'atteignant le seuil de 0,05 même après transformation des modèles.

- *Nodules de Lisch*

La présence de nodules de Lisch est fortement corrélée avec l'augmentation de l'âge ($p = 4,1 \times 10^{-7}$). Le sexe ne semble jouer aucun rôle dans ce symptôme ($p > 0,32$).

La part du rôle de la délétion, une fois l'âge pris en compte, est négligeable ($p = 0,2484$). Le type de mutation semble en revanche avoir un impact : la possession d'une mutation faux-sens est liée à une présence plus faible de nodules de Lisch, comparativement aux porteurs d'autres mutations ($p = 0,0158$).

- *Difficultés d'apprentissage*

L'âge et le sexe ont chacun une part explicative : les sujets plus jeunes ont significativement plus de difficultés d'apprentissage ($p = 0,0126$) et il en est de même pour les patients de sexe masculin ($p = 0,0462$).

Les sujets présentant une délétion ont davantage de difficultés d'apprentissage ($p = 5,5 \times 10^{-5}$; figure 1), que l'on corrige par l'âge ou non, ce qui suggère un rôle de la délétion encore plus important que celui de l'âge et du sexe.

En ne tenant compte que des types de mutations, avoir une mutation d'épissage de *NF1* semble conduire à moins de difficultés d'apprentissage ($p = 0,0106$ par rapport aux porteurs de mutations non-sens). Cependant, après combinaison des variables « Délétion » et « Type de mutation », l'influence de la délétion reste significativement supérieure à celle des trois types de mutation. ($p = 2,6 \times 10^{-6}$; $p = 0,0034$ et $p = 0,0005$, respectivement par rapport aux mutations d'épissage, faux-sens et non-sens).

Dans la cohorte étudiée, les difficultés d'apprentissage sont l'un des signes les plus étroitement corrélés à un génotype caractéristique de la neurofibromatose de type 1.

- *Dysmorphie*

La présence de dysmorphie faciale est étroitement liée à l'âge ($p = 0,0003$) et à la présence d'une délétion ($p = 6,38 \times 10^{-9}$; figure 1), le sexe et le type de mutation n'ayant aucune influence visible.

- *Scoliose*

La scoliose n'est associée qu'à l'âge ($p = 0,0004$), aucune autre variable explicative ne parvenant à un seuil de significativité même après correction. Le nombre de sujets atteints de scoliose augmente avec l'âge.

- *Neurofibrosarcome*

Similairement à la scoliose, seul l'âge parvient à être un facteur explicatif convaincant pour la prévalence de neurofibrosarcomes, qui augmente avec l'âge. Après optimisation des modèles statistiques, les autres variables sont loin du seuil de significativité ($p > 0,180$).

- *Lentigines*

Le modèle de régression logistique dans lequel la présence de lentigines est expliquée ne montre qu'une seule influence, celle de l'âge, et ce dans les modèles tenant compte de la délétion ou du type de mutation. L'augmentation de l'âge est très légèrement associée à une augmentation de la présence de lentigines ($p = 0,0495$). Même après optimisation du modèle, aucune autre contribution significative n'apparaît.

Discussion

Depuis la généralisation des analyses génétiques abordables et rapides, les études sur la corrélation entre phénotypes et génotypes de la neurofibromatose de type 1 se multiplient et aboutissent parfois à la découverte ou à la confirmation d'un lien entre un trait phénotypique et un type de mutation particulier. Cependant, compte-tenu de la très grande hétérogénéité phénotypique de la maladie, les études successives ne donnent pas nécessairement les mêmes résultats. Il est malgré tout possible de retrouver certaines tendances significatives.

Dans le cas des mutations intragéniques de *NF1*, peu de corrélations claires ont été établies entre le génotype et le phénotype. Il semble que la délétion

(c.2970–2972 delAAT) au sein de l'exon 17 du gène *NF1* soit associée à un phénotype caractérisé par l'absence de neurofibromes cutanés [8]. De même, il a été mis en évidence que dans les cas de mutations non-sens ou de mutations qui décalent le cadre de lecture, l'incidence des nodules de Lisch et des taches café-au-lait augmente significativement [9].

L'analyse des données des 509 patients permet de retrouver ces relations. Nous avons par exemple trouvé davantage de nodules de Lisch et de taches café-au-lait chez les patients avec une mutation non-sens que chez ceux avec une mutation faux-sens. Quant à l'effet de la délétion, nous avons trouvé une différence entre les patients présentant une délétion et ceux dont le gène *NF1* présente une mutation non-sens ou d'épissage, ces derniers ayant davantage de neurofibromes cutanés.

Toutefois, ces trois tendances ne sont pas les plus flagrantes trouvées dans l'étude. Les délétions semblent avoir également une influence sur d'autres phénotypes : bien que les patients ayant une délétion soient plus jeunes que ceux portant un autre type de mutation, on note une prévalence significativement plus élevée des difficultés d'apprentissage et des dysmorphies. Cette corrélation semble confirmer la thèse d'une forme plus sévère de la neurofibromatose de type 1 chez les patients présentant une grande délétion, même si elle n'est pas retrouvée dans certaines cohortes [10].

Enfin, le sexe et surtout l'âge demeurent les variables qui expliquent le mieux la répartition des symptômes. La répartition égalitaire des patients de sexe masculin et féminin selon le type d'altération génique et l'âge permet d'établir un tropisme des difficultés d'apprentissage vers les sujets masculins, lesquels sont également davantage concernés par les neurofibromes sous-cutanés, mais moins par les taches café-au-lait. L'âge apporte quant à lui une part d'explication significative dans tous les symptômes : les cas de dysmorphie faciale, les difficultés d'apprentissage et le nombre de taches café-au-lait décroissent avec l'âge,

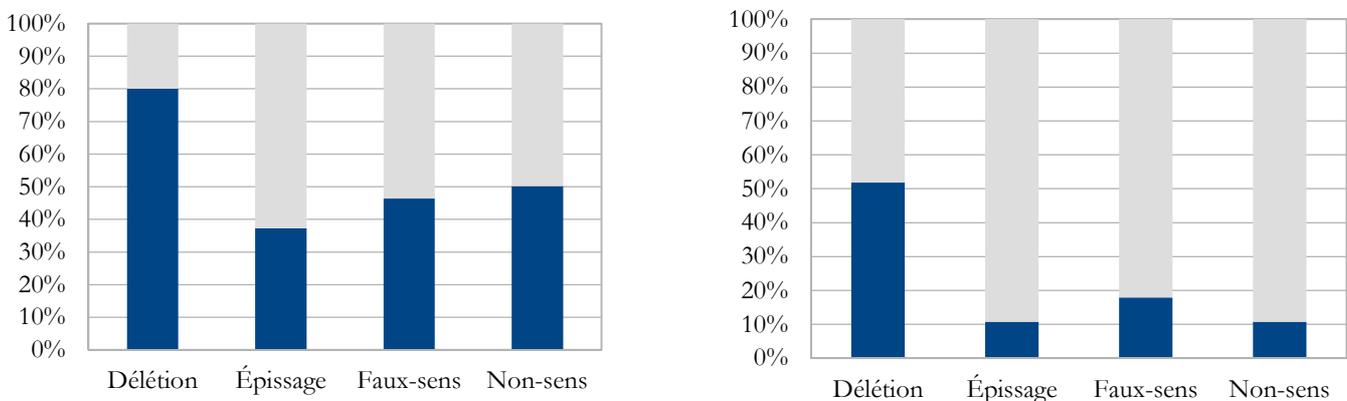


Figure 1 : Influence du type d'altération génique sur les difficultés d'apprentissage et la dysmorphie.

La dysmorphie (à droite) et les difficultés d'apprentissage (à gauche) sont parmi les symptômes les plus facilement détectables et parmi ceux qui ont un impact important en termes de qualité de vie chez le patient. On remarque que les patients présentant une délétion du gène sont davantage concernés par ces deux caractères phénotypiques, et cette différence reste significative même après normalisation selon l'âge et le sexe. En bleu foncé, proportion de patients présentant le phénotype.

tandis que les autres symptômes voient leur prévalence augmenter. Il est cependant impossible ici de différencier le rôle physiologique de l'âge dans certains des symptômes retrouvés dans la population non-atteinte par la maladie et l'impact indirect de l'âge sur la maladie, via l'augmentation de la pénétrance, qui devient complète après la puberté. Une interrogation subsiste également, relative à la corrélation entre l'âge et la présence d'une grande délétion. Les sujets présentant une délétion sont significativement plus jeunes que les autres, ce qui induit un biais. La réponse à ce problème est de l'ordre de l'hypothèse : il est envisageable de penser que les difficultés d'apprentissage et la dysmorphie, qui sont des symptômes plus visibles et, de ce fait, plus facilement détectables, ont conduit à une prise en charge plus précoce que pour les patients développant d'autres symptômes, et par conséquent une inclusion également plus précoce dans les cohortes étudiées. La forte corrélation entre la présence de délétions dans le gène *NF1* et les deux symptômes pourrait alors avoir conservé la différence d'âge trouvée dans l'étude.

Conclusion

Les études menées concernant les corrélations entre le phénotype et le génotype des patients atteints de neurofibromatose de type 1 sont de plus en plus

Corrélation génotype-phénotype dans la neurofibromatose de type 1 nombreuses mais restent indicatives puisque le polymorphisme des phénotypes est tel que les cohortes accessibles demeurent insuffisantes. La base de données NF France utilisée pour cette étude nous permet de tirer des conclusions de corrélation notamment entre les grandes délétions et la présence de difficultés d'apprentissage ou de dysmorphies. Nous pouvons également confirmer l'influence de l'âge sur la majorité des symptômes puisque les cas de dysmorphie faciale, les difficultés d'apprentissage et le nombre de taches café-au-lait décroissent avec l'âge. Intuitivement, plus la base de données utilisée sera riche et plus les corrélations seront précises. Il serait peut-être intéressant de faire ces analyses statistiques sur un échantillon plus important de patients, notamment concernant la recherche des altérations génétiques correspondantes.

Remerciements

Nous tenions à remercier chaleureusement l'équipe de statistique pour leur encadrement : Mme Desaulle et M. Nicolis, ainsi que M. Curis qui a œuvré pour la création de cette U. E. expérimentale.

Merci également à Mme Sabbagh, notre « coach », pour son suivi et sa disponibilité, et merci à Mme Merckx pour avoir été son porte-parole lors de notre soutenance.

Bibliographie

- [1] A. COMPTON. « The Neurofibromatoses: A Pathogenetic and Clinical Overview », *J. Neurol. Neurosurg. Amp Psychiatry*, **1994**, vol. 57 n° 10.
- [2] J. M. FRIEDMAN et P. H. BIRCH. « Type 1 neurofibromatosis: A descriptive analysis of the disorder in 1,728 patients », *Am. J. Med. Genet.*, mai **1997**, vol. 70 n° 2, p. 138-143.
- [3] D. F. EASTON, M. A. PONDER, S. M. HUSON et B. A. PONDER. « An analysis of variation in expression of neurofibromatosis (NF) type 1 (NF1): evidence for modifying genes », *Am. J. Hum. Genet.*, août **1993**, vol. 53 n° 2, p. 305-313.
- [4] H. L. VICTORIA et A. BARRON. « Alternative splicing of the neurofibromatosis type 1 pre-mRNA. Biosci Rep », *Biosci. Rep.*, **2012**, vol. 32 n° 2, p. 131-8.
- [5] M.-X. ZOU, D. T. BUTCHER, B. SADIKOVIC, T. C. GROVES, S.-P. YEE et D. I. RODENHISER. « Characterization of functional elements in the neurofibromatosis (*NF1*) proximal promoter region », *Oncogene*, **2004**, vol. 23 n° 2, p. 330-339.
- [6] M. P. HORAN, M. OSBORN, D. N. COOPER et M. UPADHYAYA. « Functional analysis of polymorphic variation within the promoter and 5' untranslated region of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene », *Am. J. Med. Genet.*, décembre **2004**, vol. 131 n° 3, p. 227-231.
- [7] R. H. B. CHRISTENSEN, *ordinal: Regression Models for Ordinal Data*. **2015**.
- [8] M. UPADHYAYA, S. M. HUSON, M. DAVIES, N. THOMAS, N. CHUZHANOVA, S. GIOVANNINI, D. G. EVANS, E. HOWARD, B. KERR, S. GRIFFITHS, C. CONSOLI, L. SIDE, D. ADAMS, M. PIERPONT, R. HACHEN, A. BARNICOAT, H. LI, P. WALLACE, J. P. VAN BIERVLIET, D. STEVENSON, D. VISKOCIL, D. BARALLE, E. HAAN, V. RICCARDI, P. TURNPENNY, C. LAZARO, et L. MESSIAEN, « An Absence of Cutaneous Neurofibromas Associated with a 3-bp Inframe Deletion in Exon 17 of the *NF1* Gene (c.2970-2972 delAAT): Evidence of a Clinically Significant NF1 Genotype-Phenotype Correlation », *Am. J. Hum. Genet.*, janvier **2007**, vol. 80 n° 1, p. 140-151.
- [9] Audrey SABBAGH, E. PASMANT, A. IMBARD, A. LUSCAN, M. Soares, H. BLANCHÉ, I. LAURENDEAU, S. FERKAL, Michel VIDAUD, S. PINSON, C. BELLANNÉ-CHANTELOT, Dominique VIDAUD, Béatrice PARFAIT

et P. WOLKENSTEIN. « *NF1* molecular characterization and neurofibromatosis type I genotype-phenotype correlation: the French experience », *Hum. Mutat.*, novembre **2013**, vol. 34 n° 11, p. 1510-1518.

- [10] D. BIANCHESI, S. MOROSINI, V. SALETTI, M. C. IBBA, F. NATACCI, S. ESPOSITO, C. CESARETTI, D. RIVA, G. FINOCCHIARO et M. EOLI. « 126 novel mutations in Italian patients with neurofibromatosis type 1 », *Mol. Genet. Genomic Med.*, novembre **2015**, vol. 3 n° 6, p. 513-525.