

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique
Université de Jijel



BC.21/07

$\frac{02}{02}$

Faculté des Sciences
Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire

Mémoire

de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme d'Etudes Supérieures
(D.E.S)

Option : Biochimie

Thème

Diagnostic moléculaire des maladies
héréditaires par PCR chez l'homme

Membre du Jury :

- * Encadreur : Dr RECHRECHE Hocine
- * Examineur : Mr AICHEUR Ridha



Présenté par :

- * CHAALEL Madiha
- * MEDBOUH Nadira
- * MOUBAREK Yamina



Promotion-Juin 2007



REMERCEMENT

Nous tenons à remercier Dieu, avant tout, de nous avoir donné la force et la volonté pour réaliser ce modeste travail.

Nous remercions vivement tous les enseignants qui ont participé à notre formation, et particulièrement notre Encadreur, Dr RECHRECHE Hocine pour sa confiance et ces conseils judicieux et sa totale disponibilité.

Nos remerciements vont aux membres du jury pour nous avoir honoré en acceptant de juger notre travail.

Enfin nous exprimons également notre gratitude à nos collègues, amis et à tous ceux qui nous avons témoigné un soutien moral inégalable lors de la réalisation de ce travail.

Les abréviations

aa : Acide aminé

ADN : Acide Decoys Ribonucleic

ARN : Acide Ribo Nucleic

ARNm : Acide Ribo Nucleic messenger

CF : Cystic Fibrosis

CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

Kb : Kilo base

KDa : Kilo Dalton

HG : Hémochromatose Génétique

CS-TF : Coefficient de Saturation de la Transferrine

Glu : Glutamine

Val : Valine

HBs : Hémoglobine s

HBA1 : Hémoglobine 1

HBF : Hémoglobine F

FRXA : Fragile chromosome X site A

CGG : Cytosine-Guanine-Guanine

FMR1 : Fragile X Mendal Retadation 1

CPG : Cytosine par Guanine

F8 : Facteur 8

DMD : Dystrophie Musculaire de Duchenne

PCK : Phospho-Créatine Kinase

MDX : Muscular Dystrophy X-Lunked

CAD : Complexe associé à la dystrophine

NOS : Nitric Oxyde Synthase



AD : Alzheimer Disease
APP : Amyloide Precurseur Proteine
DNF : Dégénérescence Neuro-Fibrillaire
CAG : Cytosine-Adenine-guanine
PS1 : Présélines 1
PS2 : Présélines 2
GAA : Guanine-Adinine-Adinine
PolyQ : Poly glutamine
PRP : Prion Related Protein
HDL2 : Huntington Disease Like 2
BDNF : Brain Derived Neurotrophie Factor
CH : Chorée de Huntington
HAP1 : Huntingtin Associated Protein
FRDA : Ataxie de Friedreich
OLA : Oligonucléotide Ligation Assay
Cl : Chlore
PASA : PCR Amplification of Specific Alleles

Tables des matières

Chapitre I – Introduction	1
--	---

Chapitre II - Mutations et maladies héréditaires

II.1- Mutations.....	5
II.2- Maladies héréditaires.....	6
II.2.1- Maladies autosomiques.....	7
II.2.1.1- Mucoviscidose.....	7
II.2.1.2- Hémochromatose.....	9
II.2.1.3- Drépanocytose.....	11
II.2.2- Maladies liées au chromosome X.....	13
II.2.2.1- Syndrome de l’X fragile.....	14
II.2.2.2- Hémophilie A et B.....	16
II.2.2.3- Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD).....	18
II.2.3- Maladies neurodégénératives.....	21
II.2.3.1- Maladie d’Alzheimer.....	21
II.2.3.2- Ataxie de Friedreich.....	25
II.2.3.3- Maladie de Huntington.....	27

Chapitre III - Diagnostic moléculaire des maladies héréditaires

III.1- Introduction.....	29
III.2- Technique de PCR (Polymerase Chain Reaction).....	29
III.2.1- Principe et étapes de la PCR.....	30
III.2.2- Réalisation d’une réaction de PCR.....	31
III.2.3- Variantes de la PCR.....	32
III.3- Quelques exemples du diagnostic des maladies héréditaires.....	33
III.3.1- Mucoviscidose.....	33
III.3.2- Hémochromatose.....	34
III.3.3- Drépanocytose.....	35
III.3.4- Syndrome de l’X fragile.....	35
III.3.5- Hémophilie A	37

III.3.6- Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD).....	39
III.3.7- Maladie d'Alzheimer.....	40
III.3.8- Ataxie de Friedreich.....	40
III.3.9- Maladie de Huntington.....	44
<i>Chapitre IV - Discussion et conclusion</i>	46

Chapitre I

Introduction

Les hommes souffrent à cause de plusieurs maladies et pour cela ils sont fourvoyés considérablement en cherchant à expliquer l'origine de ces maladies. On a accusé tour à tour les esprits malins; les vents mauvais et la colère des dieux. Les charmes, les potions magiques, les chants, les incantations et les prières faisaient partie des traitements. Heureusement, le savoir pratique tiré des expériences et des échecs a complété ces stratégies du surnaturel tout au long des âges. Les plantes en particulier ont fourni une source abondante et naturelle de substances soulageant la douleur et atténuant l'effet de la maladie. Mais la relation entre la guérison d'une maladie et des soins particuliers s'est révélée ténue, sauf en de rares cas. En général une maladie suivait son cours indépendamment du traitement. Nombreux sont d'ailleurs les exemples où la thérapie accélérait la mort. Dans les années 1800, une approche plus systématique, moins anecdotique des maladies en a éclairci l'origine pour certaines, fournissant ainsi des éléments rationnels à la mise au point de traitements efficaces. La recherche médicale a conquis les laboratoires, la notion de spécialisation médicale est apparue, les techniques d'asepsie se sont répandues la chirurgie a bénéficié des progrès de l'anesthésie, les instruments sont devenus plus performants et finalement les comptes rendus des travaux de recherche parurent dans des journaux à diffusion internationale.

La percée fondamentale dans la compréhension des maladies humaines est venue de la découverte simultanée et indépendante du rôle pathogène d'un micro-organisme (*Bacillus anthracis*) dans la genèse d'une maladie spécifique (le charbon) par Robert Koch (1843-1910) et Louis Pasteur (1822-1895). Cette découverte a établi clairement, comme l'a souligné un historien, que «l'homme est en vérité la victime d'innombrables assassins invisibles». Les premières décennies du XX^e siècle ont vu l'identification de l'agent causal du typhus, de la tuberculose, de la syphilis, de la variole, de la peste bubonique, du choléra, de la fièvre jaune, du paludisme et de bien d'autres maladies. Les vaccins, les traitements médicamenteux et une politique de santé publique ont raréfié nombre des fléaux de l'espèce humaine. Selon certaines études épidémiologiques récentes, un grand nombre de ces maladies étaient déjà en régression avant l'emploi intensif des vaccins et des médicaments, qui ont permis de réduire le taux de mortalité par des maladies infectieuses à un niveau négligeable au moins dans les pays développés. Certaines maladies restent un défi pour la prévention (paludisme et SIDA) tandis que d'autres réapparaissent périodiquement, soit en raison de la résistance accrue aux antibiotiques (la tuberculose) soit en raison d'une baisse de qualité de l'environnement sanitaire (le choléra et la peste pulmonaire) [1].

L'accumulation progressive des connaissances sur les maladies infectieuses a fait apparaître clairement, vers la fin du XIX^e siècle, que nombre de maladies n'étaient pas dues à un

agent infectieux. On connaissait des maladies non infectieuses provoquant des troubles malins dégénératifs et chroniques, mais elle suscitaient bien moins de peurs que les maladies contagieuses. Vers 1900, des chercheurs se sont intéressés au «terrain» de certaines maladies (des maladies familiales) et à d'autres comme le cancer ou des affections mentales (psychologiques) que semblaient sporadiques. La redécouverte faite indépendamment par Hugo de Vries (1848-1935), Carl Correns (1864-1933) et Erich von Tschermak (1871-1962), des lois de l'hérédité formulées initialement en 1865 par John Gregor Mendel (1822-1884) ont apporté un regain d'intérêt à ce type de maladies [2].

Les recherches génétiques sont à l'origine du plus extraordinaire bouleversement des connaissances depuis que la médecine existe. C'est en 1900 que le botaniste hollandais Hugo de Vries redécouvrit les lois de Mendel qui permettait de comprendre les règles de la transmission héréditaire des traits caractéristiques des organismes. On ignorait alors sous quelle forme concrète existait le patrimoine héréditaire dans les cellules. En 1915, Thomas Morgan (New York, Usa) démontra que l'ensemble des chromosomes portait les gènes. Toujours à New York mais en 1944, O-Avery découvrait l'acide désoxyribonucléique ou ADN, ce qui permettait à Crick et Watson (Cambridge Grande-Bretagne) de comprendre en 1953 comment l'information héréditaire était enregistrée sous forme d'un message codé dans les gènes. Leur découverte, sans doute l'une des plus grandes du XX^e siècle, démontre comment le message héréditaire est écrit dans les gènes sous forme d'une suite de symboles constitués par les unités chimiques de l'ADN (nucléotides).

Vingt ans plus tard, la Génie Génétique s'est développée grâce aux progrès de la Chimie des acides nucléiques. Des enzymes particulières appelées 'enzymes de restriction' ont été découvertes en 1973, elles permettent de découper et de recoller à volonté des filaments d'ADN extraits des cellules et d'implanter des gènes d'animaux ou d'hommes dans des bactéries [3]. Grâce à ces manipulations génétiques, les biologistes ont pu faire produire des 1978 à des bactéries des hormones humaines (insuline, hormone de croissance). Les autres outils du génie génétique mis au point en 1978 (sondes génétiques) ont concerné la reconnaissance de séquences de nucléotides particulières sur les filaments d'ADN chromosomiques. Ces sondes ont permis la détection sur les chromosomes humains du gène responsable de la chorée de Huntington (14982 chromosomes n°4), de la myopathie de Duchenne (1986) et celui de la mucoviscidose (1989). Un vrai travail de fourmi qui a consisté à rechercher sur les chromosomes, des séquences de nucléotides se transmettant héréditairement en association étroite avec les maladies respectives, jusqu'à en trouver une se transmettant exactement comme la maladie elle-même et signalant qu'elle faisant partie du gène lui-même. Il ne restait plus alors au moyen de techniques

biochimiques de séquençage de l'ADN mises au point en 1975-1977 qu'à établir la séquence complète des nucléotides composant le gène en question pour savoir de quelle sorte de protéine il gouverne la synthèse dans l'organisme [4].

La découverte de la Biologie Moléculaire a eu des conséquences beaucoup plus importante autant dans le domaine fondamental que dans ses applications, simplement parce qu'elle donne un accès direct aux gènes qui pilotent les phénomènes biologiques alors qu'auparavant on n'avait accès au mieux qu'à leurs produits ou simplement aux perturbations phénotypiques des phénomènes résultants des mutations, elle a permis le clonage des gènes, leur séquençage, mais surtout la capacité de les isoler *in vitro* dans des vecteurs, de les modifier de manière ciblée, de les réintroduire dans des cellules ou des organismes afin d'étudier de manière contrôlée la façon dont ils pilotent telle ou telle étape d'un phénomène, elle fait partie très rapidement une part constitutive de la plupart des domaines de la Biologie, non seulement du fait de sa puissance de dissection d'un phénomène biologique mais aussi en raison de sa capacité croissante à unifier des domaines qui semblaient auparavant disparates ou sans relation [5].

Appréhender dans leur totalité les relations entre un phénotype, qu'il soit normal ou anormal et le génotype qui lui correspond dépend en fin compte de la capacité à isoler (cloner) et caractériser un gène individuel (ou plusieurs). Lorsque l'on connaît la séquence d'un gène, il devient possible d'expliquer en partie la fonction assurée par son produit dans les conditions normales; comment les mutations interfèrent avec la fonction? Et dans quelle mesure les différentes mutations des différents exons sont à l'origine d'une maladie? Lorsque l'on dispose d'un gène, on peut tester expérimentalement les fonctions et les interactions du produit du gène, et établir comment les différents produits mutants perturbent le processus normal. En outre, il est possible de mettre au point des tests diagnostiques vis-à-vis de mutations spécifiques, à partir des informations contenues dans les séquences normales et mutantes du gène. Enfin, connaître la fonction d'un gène peut aboutir à un traitement thérapeutique pour une maladie génétique.

Des listes de symptômes ont été établies à partir des cas publiés dans la littérature afin de décrire et de cerner des maladies. Ces listes de consensus ont permis de poser des diagnostics plus précis et mieux documentés et ont supplanté le système hasardeux dans lequel chaque praticien imaginait à sa façon les actions à mener face à la maladie de ses patients, plusieurs méthodes de diagnostic s'effectuent à amplifier de manière élective, soit une séquence d'ADN, soit une séquence d'ARN. Certaines de ces méthodes visent seulement à disposer d'une grande quantité de la séquence d'intérêt (méthodes quantitatives) comme le cas de la technique de

clonage moléculaire qui est une technique longue, coûteuse, très difficile à mettre en œuvre et demande des quantités d'ADN relativement importantes.

Toutes les techniques d'amplification sont des techniques de génération qui supposent que le fragment d'intérêt a déjà été cloné et séquencé, au moins partiellement à ses extrémités. Dans ce cas, il suffit d'un peu d'ADN génomique (ou plasmidique) contenant le fragment d'intérêt ou de quelques molécules d'ARN dans un mélange, pour pouvoir amplifier *in vitro* ce seul fragment et en obtenir d'importantes quantités afin d'en réaliser l'étude, les techniques de digestion, de séparation, de transfert et d'analyse de première génération devenant alors inutiles parmi ces techniques la PCR (Polymerase Chain Reaction), mise au point en 1985 par Kary Mullis (prix Nobel de chimie en 1993); elle a révolutionné la Biologie Moléculaire et ses applications en proposant une routine simple, économique et rapide (quelques heures) là où les techniques de première génération étaient lourdes, coûteuses et longues (plusieurs jours) [6]. Actuellement cette méthode est la plus utilisée dans le diagnostic précoce de plusieurs maladies et notamment les maladies héréditaires pour améliorer la santé des générations.

Chapitre II

Mutations et maladies héréditaires

II.1-Mutations

L'analyse génétique serait impossible sans l'existence de variants des organismes qui présente des différences phénotypiques pour un caractère donné. Il y a plusieurs exemples d'analyses génétiques portant sur des phénotypes différents pour un caractère donné. Ici, nous considérons l'origine de ces variants génétiques, comment apparaissent – ils ? [7]. La repense est simple : les organismes ont une tendance naturelle à passer d'un état héréditaire à un autre. Un tel changement héréditaire s'appelle une mutation. Ce dernier qui est la cause principale des maladies héréditaires.

Les mutations sont des altérations permanentes et héréditaires touchant la séquence de base de l'ADN. Elles émergent soit des erreurs spontanées dans la réplication de l'ADN ou de la recombinaison méiotique, ou comme conséquence des effets d'altération par les agents physiques et chimiques sur l'ADN. La plus simple des mutations est la mutation ponctuelle, changements d'une seule base. Ce phénomène peut être soit une transition dans laquelle une base est remplacée par une autre ou une transversion ou une purine remplace une pyrimidine ou réciproquement. Les effets phénotypiques d'une telle mutation peuvent être variés. Si elle existe en dehors de la partie non codante et régulatrice, ou touche la troisième position d'un codon qui ne produit souvent aucun effet sur l'acide aminé incorporé dans une protéine, elle est silencieuse. Si elle résulte en un acide aminé altéré dans le produit génique c'est alors une mutation faux sens laquelle peut produire des effets variés allant jusqu'à la létalité, selon l'acide aminé effectué [8]. Les mutations qui génèrent de nouveaux codons d'arrêt représentent la mutation non sens et les produisent des protéine tronqués. Les insertion ou les suppression impliquent la perte ou l'addition d'une ou de plusieurs bases, et peuvent produise des mutations à trame décalée dans le gène, ou la séquence d'une protéine traduite du côté C –terminal de la mutation est complètement changée.

Les mutations qui affectent les processus de la croissance et de la mort cellulaires peuvent conduire à la tumorigenèse. L'accumulation de plusieurs mutations silencieuses et autres non létales dans les populations produit les polymorphismes génétiques, variation acceptables dans l'ADN normale et dans les séquence protéiques [9]. L'hétérogénéité génétique recouvre le fait qu'un même phénotype, une même maladie, peut correspondes à des situations génétiques très diverses et, plus généralement, que la relation entre l'univer des génotypes et celui des phénotypes est souvent plus complexe qu'on ne l'imagine. Il y a deux formes d'hétérogénéité, l'une inter-locus qui peut associer une même maladie à plusieurs gènes et l'autre intra-locus qui peut associer plusieurs maladies différentes à un même gène [5].

II.2- Maladies héréditaires

Presque tous les troubles de santé résultent d'une interaction défavorable entre les facteurs héréditaires et environnementaux, quoique dans des proportions différentes. 5 à 10 % de toutes les maladies sont imputables en premier lieu à des gènes mutés (modifiés). On connaît aujourd'hui 4000 maladies héréditaires monogéniques, c.à.d dues à un seul défectueux. Les maladies héréditaires sont des maladies génétiques, elles sont dues à une anomalie dans le code génétique. Ce code génétique, les gènes contenus dans les chromosomes à l'intérieur des noyaux cellulaires, est transmis par moitié des gènes par la mère et moitié des gènes par le père. Ces codes génétiques ont été élaborés au cours des millions d'années qui ont précédé la venue de l'homme sur la terre. Ils sont comme des logiciels informatiques, ils sont chargés d'exécuter des programmes pour fabriquer telle cellule et tel organes du corps. Ces programmes sont très complexes, ils doivent se transmettre de générations en générations et il peut parfois y avoir des erreurs de recopie, ces dernières entraînent l'apparition des maladies génétiques qui sont dues à un défaut de fonctionnement d'un gène, par fois elles sont héréditaires. Les maladies héréditaires obéissent aux lois de l'hérédité découvertes au XIX^e siècle par le moine augustin Gregor Mendel lors d'expérience d'hybridation sur le pois [10].

Deux aspects en particulier sont déterminants pour le pronostic des maladies héréditaires chez les enfants de parents eux-mêmes atteints d'une maladie héréditaire ou porteurs sains d'un gène muté. Premièrement, il convient de vérifier si le gène défectueux est localisé sur un autosome ou sur un chromosome sexuel. Si le caractère héréditaire anormal se trouve sur le chromosome X ou Y, on parle de transmission héréditaire liée au sexe. Les gènes défectueux localisés sur le chromosome X ou sur les autosomes peuvent entraîner la maladie aussi bien chez la femme que chez l'homme. En revanche, si les gènes mutés se trouvent sur le chromosome Y, la maladie ne peut se déclarer que chez l'homme.

Deuxièmement, il importe de savoir s'il faut que le gène malade se trouve sur un seul chromosome (transmission héréditaire dominante) ou sur deux chromosomes (transmission héréditaire récessive) pour que la maladie héréditaire se déclare. L'application de la maladie à chaque génération est typique de la transmission dominante. Les maladies à transmission héréditaires récessives peuvent aussi sauter des générations, car les porteurs qui ont allèle défectueux dans leur matériel génétique peuvent être épargnés si l'autre allèle est normal [11]. En cas de transmission héréditaire récessive, l'enfant ne peut être atteint de la maladie que si les deux parents sont porteurs du gène malade. Le père et la mère transmettent à leurs enfants avec leur cellules sexuelles l'allèle normal ou l'allèle responsable de la maladie. Il y a trois combinaisons différentes possibles : la probabilité de transmission du gène normal par les deux

parents est de 25 %. En ce cas, l'enfant ne sera ni porteur de l'allèle défectueux ni malade. Un des parents transmet le gène sain, l'autre le gène responsable de la maladie. En ce cas, l'enfant sera sain, mais porteur de l'allèle défectueux. La probabilité est de 50% puisque le gène muté peut provenir aussi bien du père que la mère [12]. Les deux parents transmettent le gène anormal, c'est uniquement dans ce cas que l'enfant sera atteint de la maladie. La probabilité que l'enfant tombe malade dans ces circonstances est donc de 25 % la mucoviscidose est un exemple de maladie héréditaire monogénique transmise sur le mode récessif.

En cas de transmission héréditaire dominante, un gène défectueux suffit pour que la maladie se déclare. Même si l'un des parents présente deux allèles sains, un enfant sur deux sera malade (statistiquement parlant) si l'autre parent possède le gène muté (et est lui-même malade). En même temps la probabilité que l'enfant soit sain et ne transmette pas l'allèle défectueux à sa descendance est de 50%. La chorée de huntington est un exemple de maladie héréditaire monogénique transmise sur le mode dominant on peut classer les maladies héréditaires en trois types. Les maladies autosomiques, les maladies liées au chromosome X et les maladies neurodégénératives [13].

II.2.1- Maladies autosomiques

Dans les maladies autosomiques, les gènes défectueux se trouvent sur l'un des 22 autres chromosomes. Les maladies transmises sur le mode autosomique sont aussi fréquentes chez la femme que chez l'homme. Parmi ces maladies on peut citer : rétinites pigmentaires, polykystose rénal, syndrome de Marfan, mucoviscidose, maladie de Gancher de type1, hémochromatose, maladie de Wilson et le drépanocytose.

II.2.1.1-Mucoviscidose

La mucoviscidose, encore appelée fibrose kystique du pancréas c'est la plus fréquente des maladies autosomiques récessives graves dans les populations d'origine européenne, touchant un nouveau né tous les 2500. Il s'agit d'une exocrinopathie généralisée, frappant les glandes séreuses et les glandes à sécrétion muqueuse. Sont touché principalement : l'appareil respiratoire, le tube digestif et ses annexes (pancréas, foie et voies biliaires), mais également les glandes sudoripares et le tractus génital [14]. La description de mucoviscidose en tant qu'affection autonome date de la fin des années 30 : l'association " fibrose kystique congénitale du pancréas et bronchectasies " est identifiée en 1936. Le terme de mucoviscidose fut créé en 1943 par le Docteur Sydney Farber : il obtenu par la contraction de mucus visqueux et du suffixe ose. Le caractère héréditaire et le mode de transmission récessif furent suggérés en 1945 [15]. Après 8 ans, le Professeur Disant Agnese a découvert les anomalies électrolytiques dans la

Chromosome 7

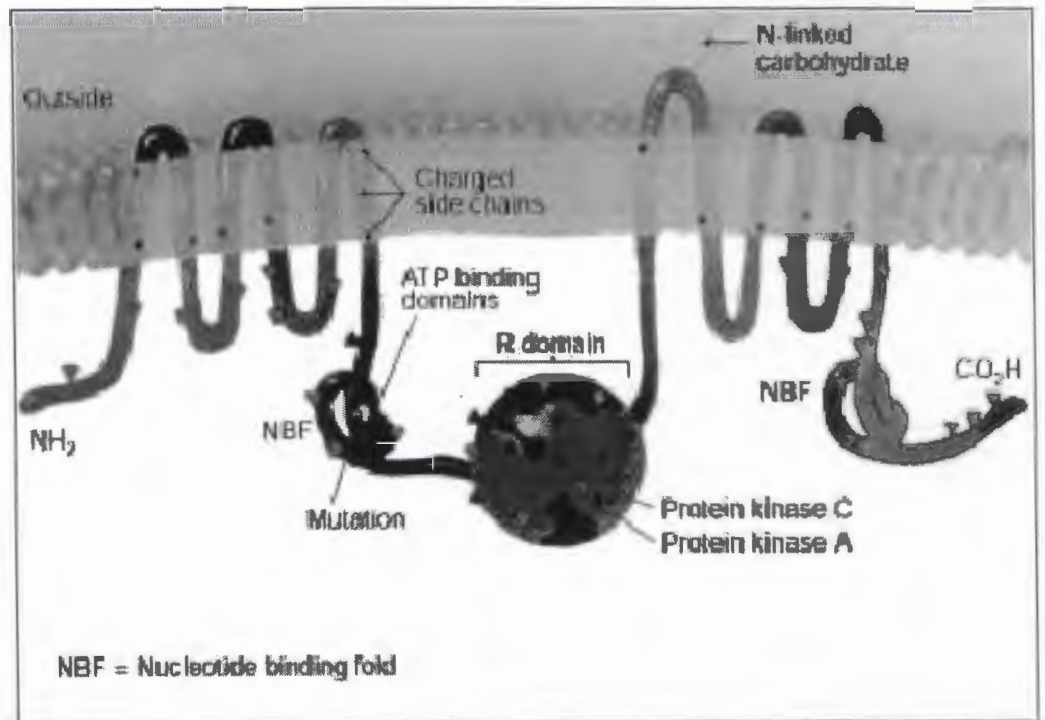
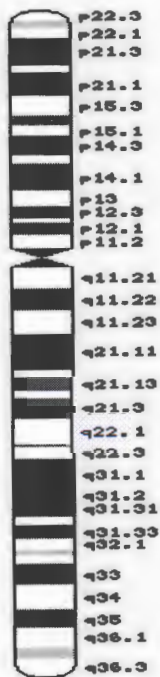


Figure 1. Mutation du gène CF localisé sur le locus q31-2 de chromosome 7 et la protéine CFTR altérée.

sueur des malades permettant d'envisager un diagnostic spécifique à la maladie : le teste de la sueur [16].

En 1989, l'équipe du professeur Lap Chee Tsui a mis en évidence l'anomalie génétique à l'origine de la maladie; qu'est une mutation du gène CF (cystic fibrosis) qui contient 27 exons s'étendant sur 250 kb du chromosome 7, en 7q 31 (Figure 1 et 2). Ce gène code la protéine CFTR qui comprend 1480 AA avec deux sites de glycosylation. Sa masse moléculaire est 170 KDa; elle est formée de deux moitiés similaires avec, pour chacune, six segments transmembranaires (Figure 3). Elle est impliquée dans le contrôle du transport de Cl⁻. Le trouble fonctionnel concerne l'échange de cet ion par suite de l'absence ou d'un dysfonctionnement de la protéine CFTR qui forme un canal membranaire pour l'anion [17]. Le canal est le plus souvent ouvert chez le sujet sain et est régulé positivement par l'AMBP_c. La protéine CFTR est multifonctionnelle ; en plus de la régulation des canaux, il y a d'autre fonctions, transport d'ATP, modulation de phénomènes d'exocytose /endocytose (Figure 4).

Il existe une très grande variabilité des manifestations et de la gravité de cette maladie en rapport avec les multiples mutations responsables du mauvais fonctionnement de la protéine CFTR. L'âge d'apparition des premiers symptômes est très variable [18]. Les symptômes concernent prioritairement le poumon ou la production d'un mucus anormalement visqueux conduit à une observation chronique avec colonisation bactérienne des voies aériennes, fréquemment par *Pseudo-monas aeruginosa* (Figure 5), puis à une insuffisance respiratoire progressive qui est la principale cause de décès. Les liquides broncho-alvéolaires contiennent souvent des taux importants d'activité élastasique non inhibée par les antiprotéases, ce qui peut entraîner des altérations [19]. La maladie provoque dans 85 à 90 % des cas une insuffisance pancréatique exocrine [20], d'où le nom de fibrose kystique du pancréas avec maldigestion, surtout lipidique, associée à des déficits multiples (vitamines liposolubles, acides gras essentiels) et à un retard de croissance. Ces anomalies se développent progressivement et évoluent vers une disposition du parenchyme pancréatique, les îlots de langerhans étant souvent préservés. La malabsorption est peu spécifique; des troubles hépatiques peuvent évoluer jusqu'à la cirrhose biliaire. L'équilibre acidobasique et l'état d'hydratation peuvent être modifiés avec hypotension, hyponatrémie et hypochlorurémie; les atteintes de l'appareil de reproduction (azoospermie obstructive, mucus cervical épais) sont très fréquentes (95 p.10).

L'iléus méconial est présent chez 10p.100 des nouveau-nés (le méconium est constitué des premiers éléments libérés par l'intestin). Un iléus peut apparaître dans les deux premiers jours de vie (Figure 6) [21]. Les traitements de maladie les plus courants visent à améliorer la

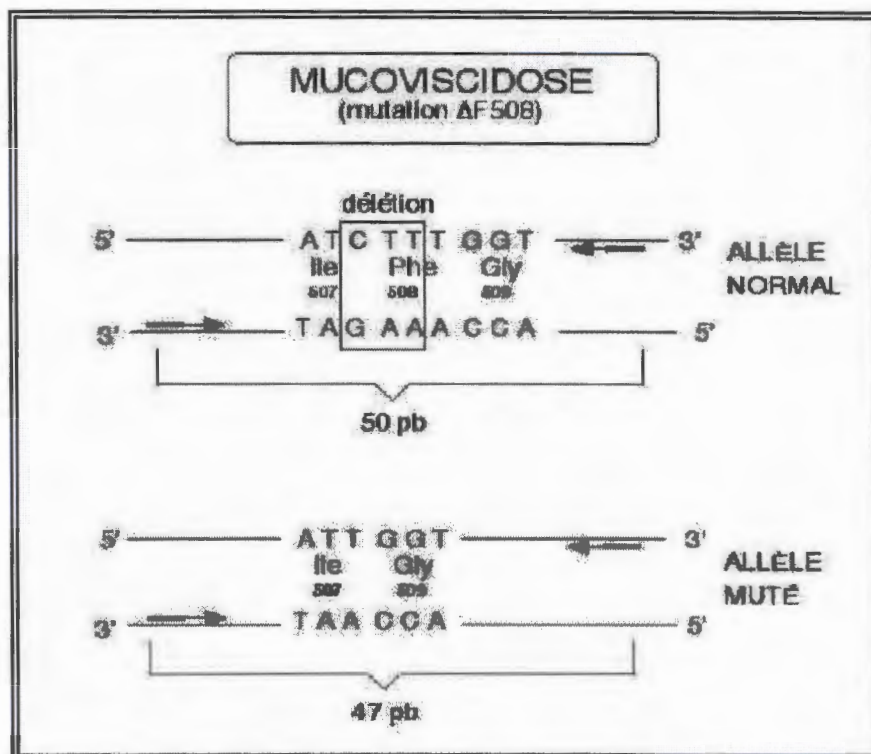


Figure 2. Mutation $\Delta F 508$ du gène CF, responsable de la Mucoviscidose.

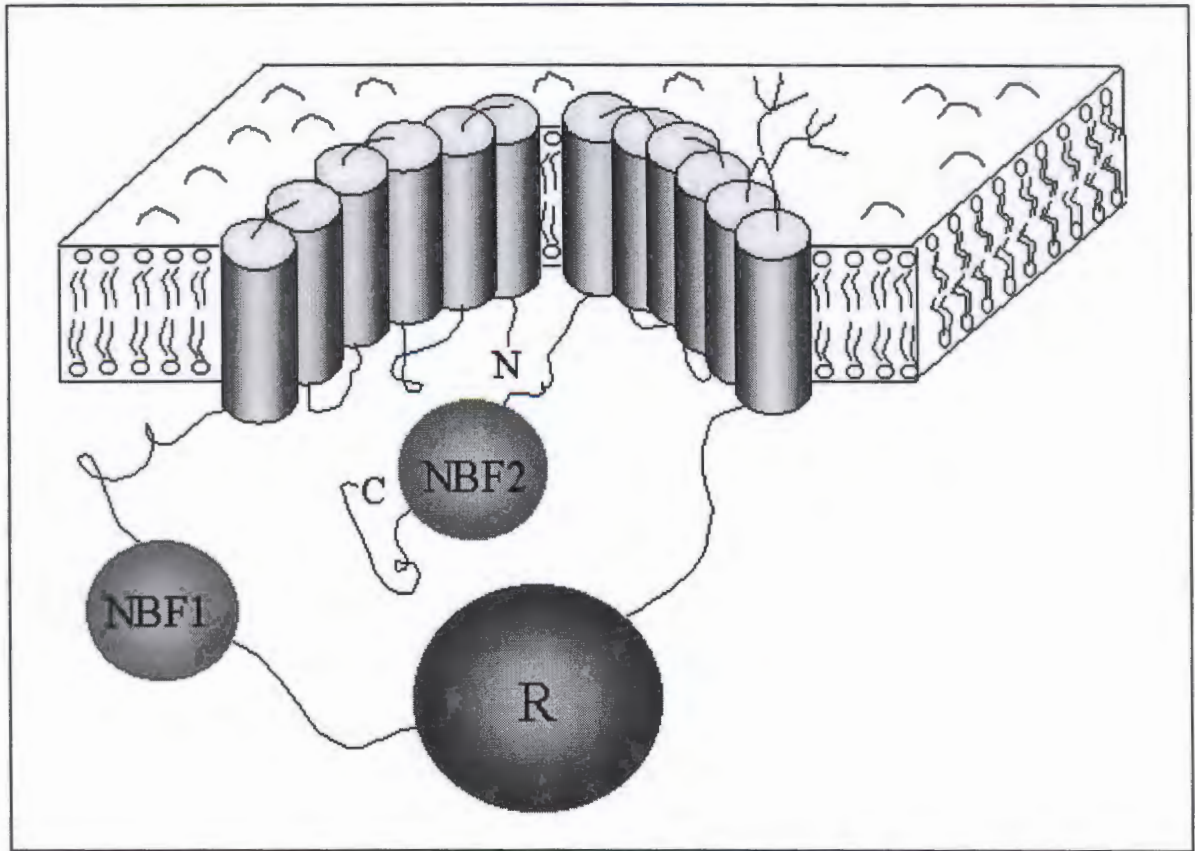


Figure 3. Structure prédictive de la protéine CFTR. La partie en vert représente le domaine R, la partie violette représente le nucléotide Binding Fold, la partie jaune représente le domaine transmembranaire.

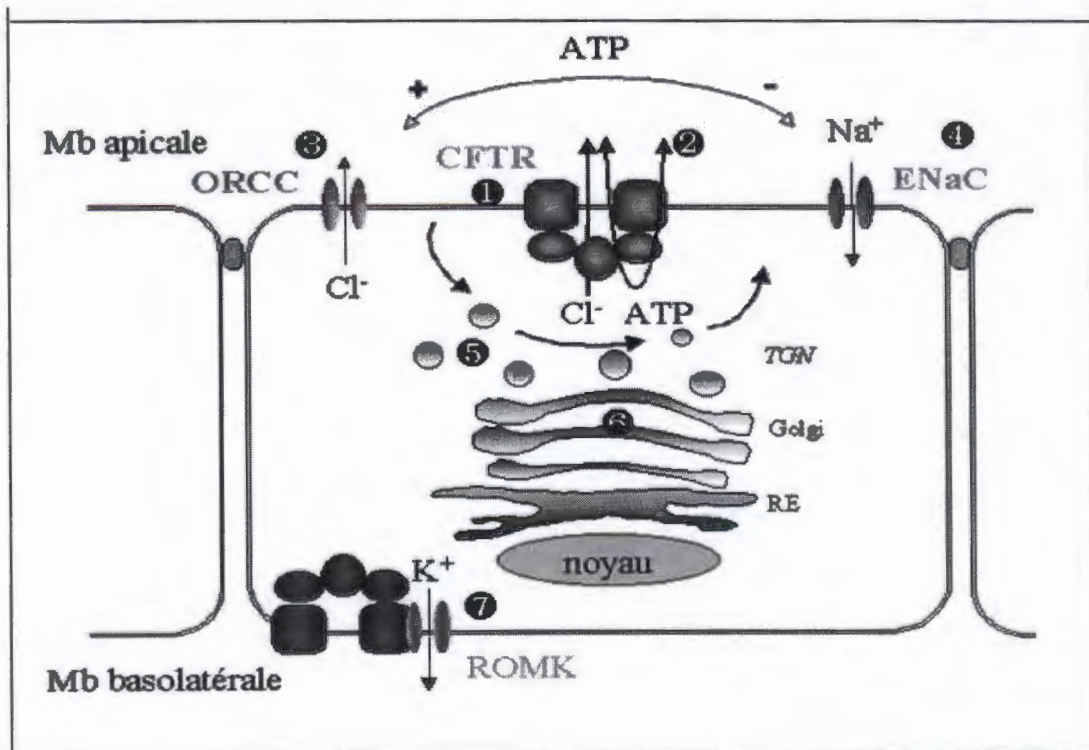


Figure 4. CFTR, une protéine multifonctionnelle.

Transport de l'ATP, modulation de phénomène de l'exocytose et endocytose.

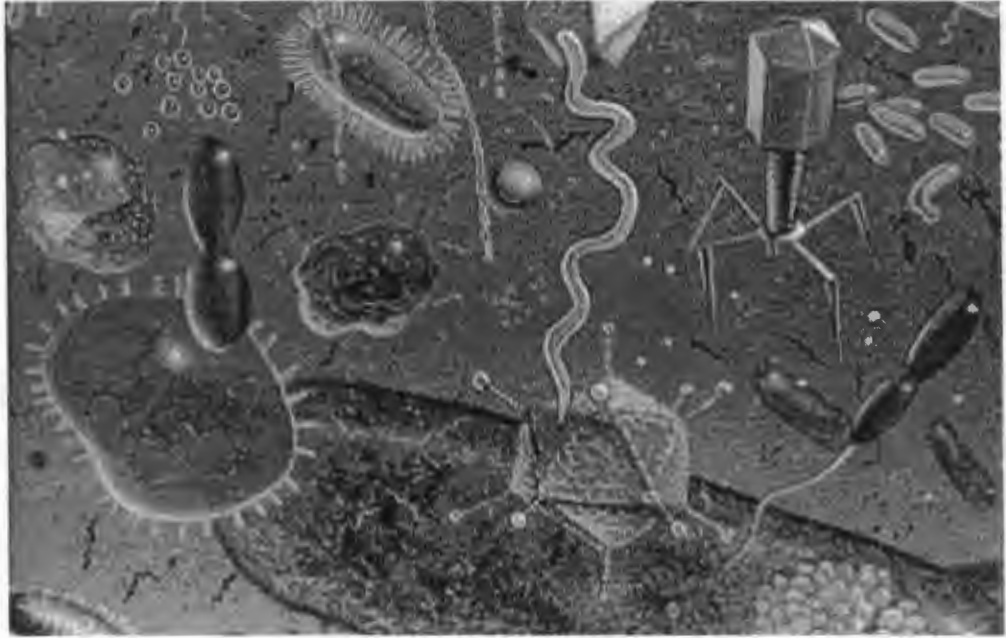


Figure 5. Schéma de mucus, semblable à celui que contiennent les organes d'un mucoviscidosique. On peut observer différents virus, des bactéries, des cellules et des brins d'ADN qui restés englués qui épaississent encore ce mucus, déjà anormalement épais à l'origine.



Figure 6. Image d'Iléus méconial. Les flèches dans la figure c'est l'anse intestinale dilatée à paroi hyperéchogène.

fonction respiratoire, les bronches étant souvent obstruées et sujettes à des infections broncho-pulmonaires permanentes mais cela nécessite des traitements lourds de kinésithérapie respiratoire, drainage postural et de toilette bronchique qu'il faut pratiquer plusieurs fois par jour, notamment par les parents aux jeunes enfants. Dans les cas désespérés d'atteintes sérieuses de la voie respiratoire, la greffe de poumon permet de prolonger la vie, mais la mortalité après 3 ans de greffe est de 50 %

Pour la fonction digestive un régime adapté, hyperprotéiné, pauvre en graisse (sauf huile de tournesol) et riche en fer, en vitamines liposolubles et en triglycérides à chaînes moyennes doit être suivi, et des poudres de pancréas "gastro-Protégées" permettent d'améliorer les fonctions digestives.

II.2.1.2- Hémochromatose

En 1889, Von Recklinghausen décrivait sous le terme d'hémochromatose une surcharge généralisée en fer de l'organisme se traduisant par de nombreuses atteintes viscérales et métaboliques. Il a fallu attendre 1975 pour que soient démontrés le caractère héréditaires et la transmission récessive de la maladie. Le premier indice qui a permis de déduire la localisation chromosomique du gène causal de l'hémochromatose a été l'observation que les sujets atteints d'hémochromatose avaient une fréquence élevée de l'allèle HLA A3 [22]. La confirmation d'un déséquilibre de liaison entre le locus HLA (chromosome 6P) et le phénotype de l'hémochromatose indiquait que le gène causal était situé dans cette région, toute fois l'identification de ce gène a été très difficile à réaliser. De nombreux groupes académiques y ont consacré des efforts intenses pendant plusieurs années sans succès.

Le gène fut finalement identifié en 1996 par une compagnie de biotechnologie californienne nommée Mercator Genetics [23]. Les chercheurs de Mercator Genetics ont d'abord identifié une région candidate d'environ 250 Kb en comparant les allèles de marqueurs polymorphiques de l'ADN entre des sujets atteints d'hémochromatose et des sujets normaux le séquençage systématique des 15 gènes de cette région a permis d'identifier qu'un de ceux-ci était muté chez plus de 85 % des patients avec hémochromatose. Ce gène possède une structure très similaire aux molécules HLA de classe I. Il fut initialement nommé HLA-H puis HFE en raison d'un conflit de nomenclature avec une autre molécule HLA, les multiples études de populations et la création de souris "Knock-out " pour ce gène ont confirmé que le gène HFE joue un rôle primordial dans l'absorption du fer, et que les deux mutations identifiées dans ce gène sont responsables de la majorité des hémochromatoses héréditaires [24].

L'hémochromatose génétique (HG) est maladie héréditaire autosomique récessive, est une affection causée par une absorption intestinale accrue et non contrôlée de fer entraînant sa déposition dans une multitude de tissus. Le fer libre est hautement toxique parce qu'il induit la génération de radicaux libres et d'autres composés d'oxydation, ces molécules causent la peroxydation des membranes cellulaires et le dommage tissulaire, l'hémochromatose est souvent mal diagnostiquée car silencieuse avant 30ans. Non traitée, cette maladie est susceptible d'entraîner une mort prématurée vers la trentaine chez l'homme et le quarantaine chez la femme (un peu plus tardivement chez la femme en raison des règles et des grossesses), est une maladie d'apparition tardive; la première phase est latente, elle dure jusqu'à l'âge de 15 à 20ans, puis apparaissent des anomalies biologiques asymptomatiques telles que l'augmentation du fer sérique, du coefficient de saturation de la transferrine et enfin une phase d'expression clinique de la maladie, vers 30 ans (ou 40ans chez les femmes) [25].

Le gène HFE code pour une protéine de 343 acides aminés dont la structure est très similaire aux molécules HLA de classe I. La protéine HFE est exprimée à la surface des cellules des cryptes intestinales, du colon de l'estomac et du placenta en association avec la β 2-microglobuline avec qui elle se lie de façon non covalente. La protéine HFE joue un rôle dans la régulation de l'absorption du fer, elle se lie au récepteur de la transferrine situé à la surface des cellules intestinales près du site de liaison du complexe fer-transferrine, ceci diminuerait l'affinité du récepteur de la transferrine pour le complexe fer-transferrine et par conséquent diminuerait d'absorption du fer [24]. La protéine HFE est donc un régulateur négatif de l'absorption du fer.

Une mutation ponctuelle à la position 845 du début du cadre la lecture du gène HFE (transition G à A) cause un changement de la séquence d'acide aminé de la protéine HFE. Une tyrosine remplace une cystéine à la position 282 de la protéine (C 282 Y) . L'effet de cette mutation sur la protéine HFE est considérable. La perte de la cystéine modifie la structure de la molécule et empêche la liaison avec la β 2- microglobuline. Celle-ci est essentielle pour l'expression de HFE à la surface de la cellule [26]. L'absence de HFE à la surface des cellules rend l'affinité du récepteur de la transferrine pour la transferrine inhibée. L'absorption intestinale de fer est donc augmentée chez les sujets porteurs de cette mutation à l'état homozygote. Il y a aussi un autre type de mutation dans le gène HFE c'est la mutation H63D, cette mutation entraîne aussi un changement dans la séquence des acides aminés de HFE. L'histidine de la position 63 est remplacée par l'acide aspartique. Il ne semble pas y avoir d'effet fondateur pour cette mutation qui est commune à toutes les populations. Cette mutation n'a pas les effets

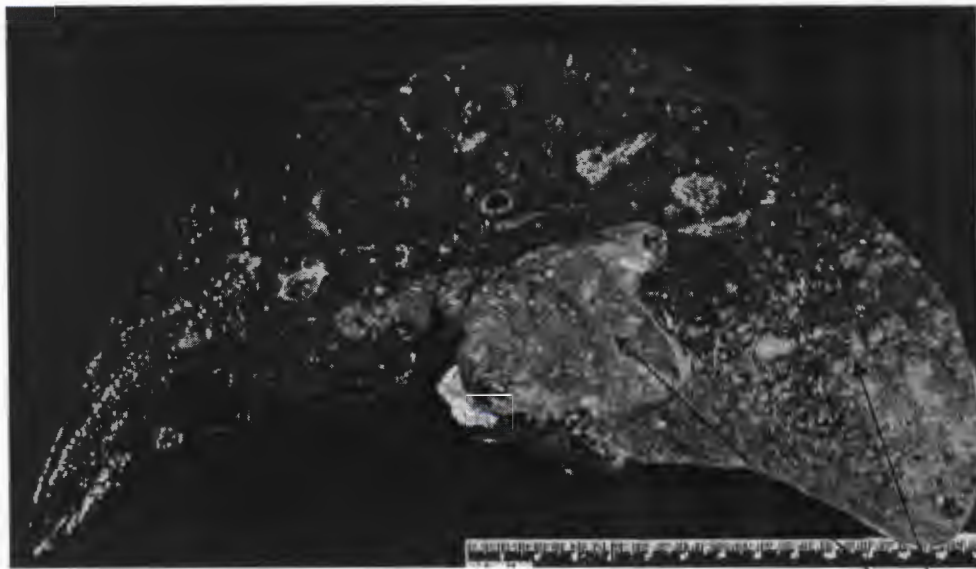
dramatiques de la mutation C 282 Y sur la protéine HFE. La protéine HFE est exprimée à la surface des cellules, mais son interaction avec le récepteur de la transferrine est diminuée.

Les médecins réalisent un dépistage systématique de l'hémochromatose avant la phase des symptômes pour simplifier le traitement. Le dépistage de masse pour l'hémochromatose devrait être une priorité de santé publique. Les données récentes suggèrent que la détermination de la saturation de la transferrine est d'une très grande sensibilité et détectera le quasi totalité des personnes avec un génotype HFE compatible avec une hémochromatose. Elle a aussi l'avantage de détecter les individus avec les hémochromatoses non - HFE. Tout fois, il n'y a pas encore de consensus sur le niveau de seuil critique de saturation qui est suspect d'une hémochromatose (> 45 %, 50 %, > ?). Le dépistage devrait idéalement être fait entre la deuxième et la troisième décennie de la vie pour pouvoir identifier les sujets atteints avant que le dommage tissulaire se soit installé. La confirmation du diagnostic d'hémochromatose héréditaire chez un sujet commande l'évaluation de la fratrie puisque 25 % d'entre eux sont statistiquement à risque d'avoir le même diagnostic. Si le sujet index était HFE positif, ce test est le test de choix pour identifier les membres atteints de sa fratrie. Il n'y a plus d'indication de faire le typage HLA qui n'apporte aucune information supplémentaire. Les sujets identifiés doivent par la suite avoir un bilan martial, et selon les résultats une investigation et un traitement approprié.

Il n'y a pas des symptômes avant 35-40 ans, la maladie passe par plusieurs stades, le stade zéro se caractérisant, outre l'absence de symptôme et une ferritinémie normale par un coefficient de saturation de la transferrine (CS-Tf) inférieur à 45 %, tandis que le stade 1 est marqué par une augmentation de CS-Tf. Ces deux stades ne nécessitent qu'un suivi tri annuel (stade zéro) ou annuel (stade 1), tandis que l'engagement dans un traitement concerne les stades 2, 3, et 4, qui se caractérisent par une hyperferritinémie (stade 2) et l'apparition des premiers symptômes cliniques (stade 3 et 4). Parmi les signes cliniques on peut citer une asthénie (fatigue, épuisement) dans 73 % des cas, des arthralgies (douleurs articulaires, inflammations, enflures) dans 45 % des cas, on peut trouver aussi des symptômes tardifs comme l'insuffisance cardiaque (cœur), diabète (pancréas), cirrhose (foie) (Figure 7) [27]. Le traitement de l'HG repose sur des saignées régulières qui permettent l'élimination d'une importante quantité de fer et entraîne, sans causer d'anémie, la fabrication de nouveaux globules rouges qui puisent le fer dont ils ont besoin dans les organes surchargés [28].

II.2.1.3-Drépanocytose

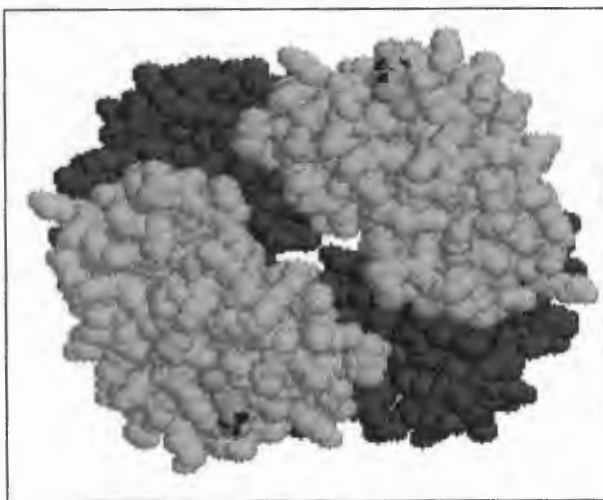
La drépanocytose (ou anémie falciforme) est une maladie héréditaire récessive autosomique, due à une mutation unique, ponctuelle du gène β globine situé sur le chromosome



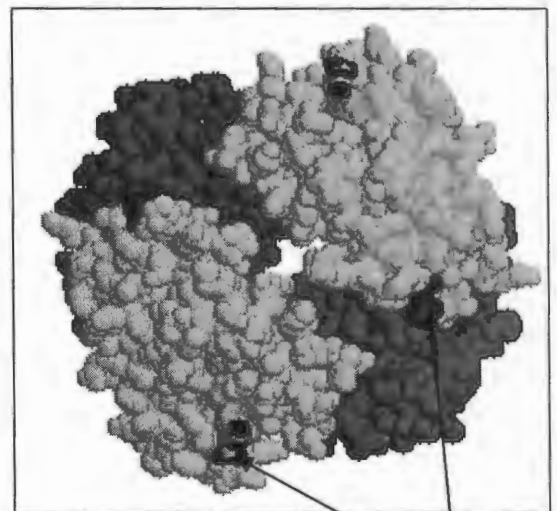
La partie atteint
de la maladie

Figure 7. Image obtenue par microscope optique d'un foie atteint par l'hémochromatose due à l'accumulation du fer.

(A)



(B)



Mutations

Figure 8. Image de synthèse de l'hémoglobine d'une personne saine et d'une personne atteinte d'anémie falciforme.

11 (11p11-5). La mutation de 6^{ème} codon (GAG6GTG) entraîne le remplacement de l'acide glutamique 6 par de la valine (Glu 6 Val) [29] (Figure 8 A et 8 B). La présence de cette mutation conduit à la formation d'hémoglobine HbS exclusive chez l'homozygote, en concentration minoritaire chez l'hétérozygote porteur sain. D'une autre manière, il s'agit d'une hémoglobinopathie dans laquelle l'hémoglobine A normale est remplacée par l'hémoglobine S polymérisant en situation d'hyposcie et aboutissant à une rigidification du globule rouge [30].

Les symptômes de cette maladie peuvent apparaître dès l'âge de six mois. Les manifestations aiguës habituelles de la drépanocytose sont de trois ordres : crises vaso-occlusives, anémie hémolytique et des Infections : qui sont plus fréquentes chez les drépanocytaires. Elles peuvent aussi aggraver l'anémie en cas d'infection par le parvovirus B19. La désoxyhémoglobine HBS possède une propriété de polymérisation , cette dernière est due à que la valine n° 6 est un résidu hydrophobe qui remplace un acide aminé hydrophile , l'acide glutamique les globules étant entourés par un film d'eau, la présence d'un site hydrophobe crée un point de "collage " entre deux molécules d'hémoglobine voisines, celui-ci s'établit entre la leucine 88 et la phénylalanine 85 d'une chaîne α d'une molécule d'hémoglobine et la valine 6 de la chaîne β de l'hémoglobine voisine d'où création d'une structure cristalline en fibres (figure 9) [31].

Les syndromes drépanocytaires majeurs regroupent 3 types d'hémoglobinopathies : les formes homozygotes SS, les doubles hétérozygoties SC et S β -thalassémie et d'autres formes plus rares telle que SDP un Jab. Chez les homozygotes (HBS/ HBS) 80 % des homozygotes mouraient avant l'âge de la reproduction. Aujourd'hui, grâce au dépistage précoce, à la prévention des infections (vaccination, antibiothérapie, systématique), la maladie reste sérieuse et invalidante mais l'espérance de vie s'est considérablement normalisée. Les patients SS ne fabriquent pas d'HBA₁ et seulement de l'HBF $\alpha_2 \gamma_2$ en quantité variable et de l'HBA₂. Parmi une population d'individus porteurs du génotype HBS/HBS on a identifié deux catégories de patient : certains développent des crises fréquentes et graves (accidents vasculaires) dues à la falciformation des hématies, d'autres ne développent qu'exceptionnellement des crises qui sont le plus souvent bénignes [32]. Dans le cas des hétérozygotes composites β S / β C, une pathologie grave, proche de la drépanocytose.

Dans 25 % des cas un enfant atteint de thalasso-drépanocytose S β O-thalassémie, ne fabriquant pas non plus d'HBA₁ remplacée par de l'HBS et dont la symptomatologie est équivalente à celle d'une forme SS [33]. Les syndromes β -thalassémique se voient essentiellement autour du bassin méditerranéen. Leur expression clinique dépend de l'état

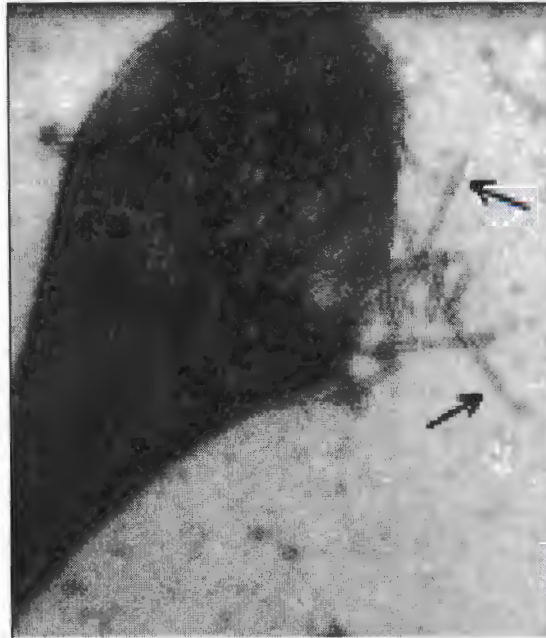


Figure 9. Image obtenue par microscopie électronique montrant la déformation des globules rouges d'une personne atteinte par drépanocytose.

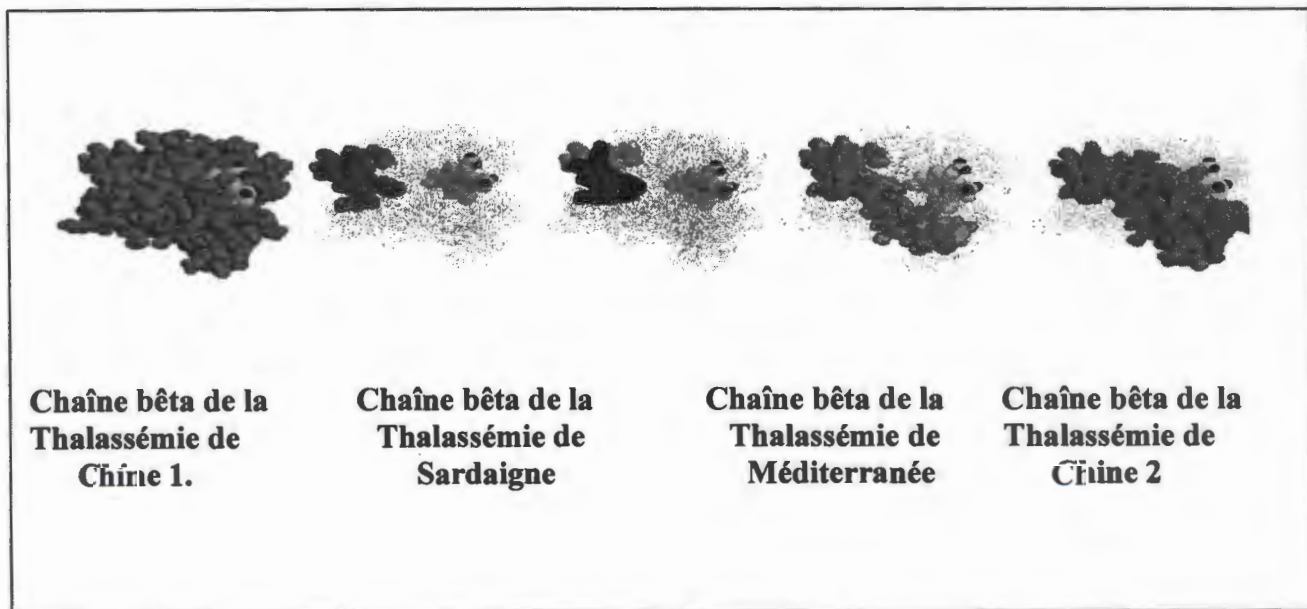


Figure 10. Localisation des mutations thalassémiques sur la protéine de la chaîne bêta en géographique.

hétérozygote ou homozygote ou de l'association à d'autres hémoglobinopathies l'anomalie génétique des β -thalassémiques est transmise selon le mode autosomique récessif. (Figure 10), dans ces syndromes on distingue un déficit en chaîne β [34].

Il y a des lésions moléculaires à l'origine de β - thalassémies, un premier groupe d'anomalies affecte les régions promotrices citons par exemple ,les mutations situées au niveau de la séquence ATA, en -28 et -29 , ou celles , plus en amont ,au niveau des nucléotides -87 et -88, elles diminuent l'efficacité transformationnelle en perturbant de polymérase (ou d'une autre protéine régulatrice) sur l'ADN .le peu d'ARN m formé a une structure normale ,mais il en quantité trop faible il ne peut assurer la synthèse en quantité suffisante de chaîne et le résultat est donc une β + thalassémie. Un deuxième groupe, englobe en ensemble de mutants perturbant la maturation du message. Il comporte des jonctions exon-intron et touche aussi bien les sites donneurs que les sites accepteurs .ces mutation sont responsable de BO thalassémie lorsque'elles interdisent totalement l'épissage. Un troisième modèle est constitué par la mutation de la séquence signal de polyadénylation : le transcrit n'est pas clivé en 3' et aucune polyadénylation ne s'effectue. Ce ARNm trop long est instable mais est cependant traduit, en faible quantité, en protéine normale. Le quatrième groupe comporte les cas où le message est normalement épissé mais son traductible en protéine. La cause peut être une mutation ponctuelle, dans l'un des exons, aboutissant à un codon non sens (Figure 11).

II.2.2- Maladies liées aux chromosomes X

La présence d'un seul allèle récessif lié à l'X suffit à produire un phénotype chez l'homme puisque très peu d'information génétique est partagée par les régions homologues des chromosomes X et Y. Par conséquent, il n'existe pratiquement aucune possibilité qu'un allèle normal dominant masque l'effet de l'allèle récessif dans ces conditions. On détermine le caractère dominant ou récessif d'un gène lié à l'X grâce au phénotype chez les femmes, puisqu'elles possèdent deux X. Dans les arbres généalogiques d'un état lié à l'X et dominant, on retrouve habituellement un individu atteint à chaque génération, toutes les filles d'un homme atteint sont touchées une femme atteinte peut donner naissance aussi bien à des garçons qu'à filles atteints, et globalement, autant de femmes que l'hommes manifestent le trait. Dans le cas d'une maladie liée à l'X et récessive, tous les fils d'une mère malade sont atteints, les pères atteints ne transmettent jamais le trait à leurs fils, des parents sains peuvent donner naissance à des enfants atteints, et globalement, la maladie est plus fréquente chez les garçons que chez les filles. Parmi ces maladies on peut citer : dystrophie musculaire de Duchenne, syndrome de l'X

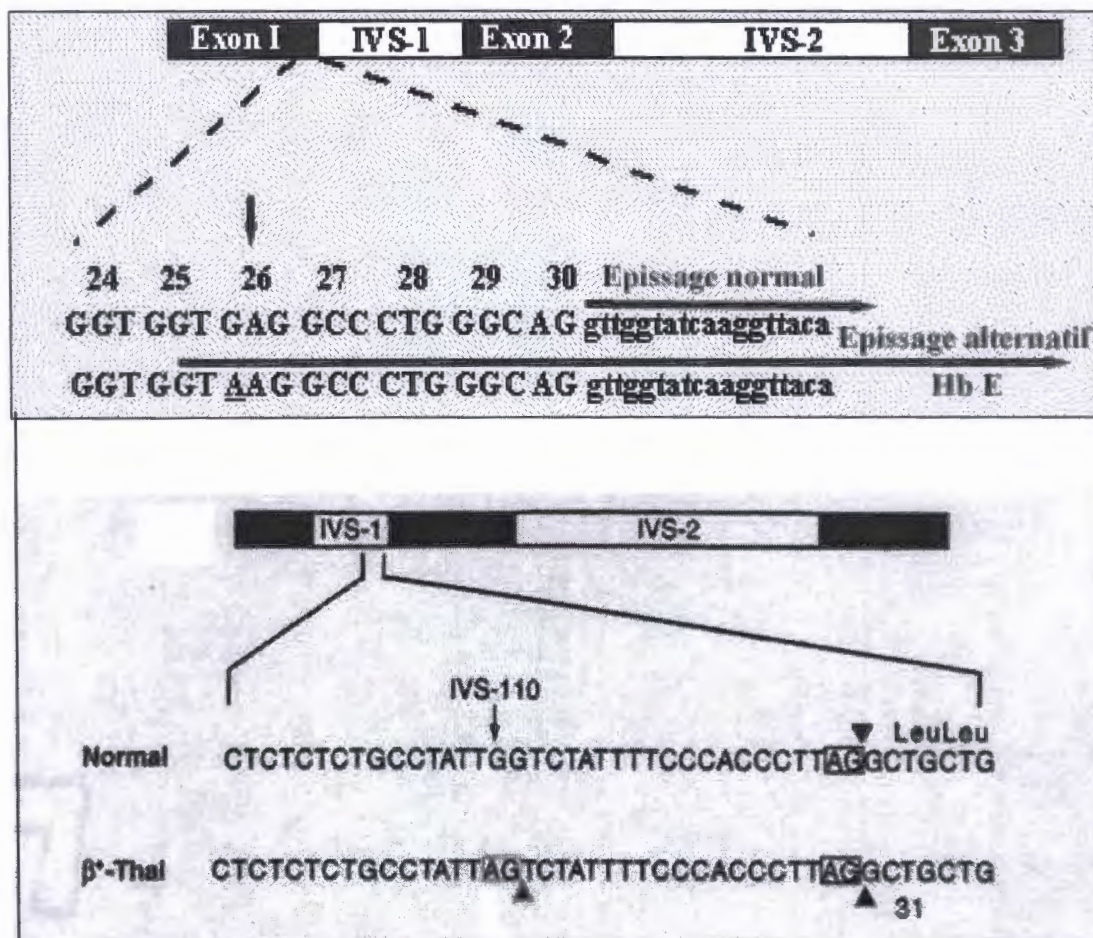


Figure 11. Lésions moléculaires à l'origine de β -thalassémies. Une mutation au niveau de la séquence ATA (en 28 et 29) le résultat est bêta + thalassémie.



fragile, adrénoleucodystrophie, hémophilie A et B, maladie de Norvège, Anomalie de la vision des couleurs et l'Ichtyose.

II.2.2.1-Syndrome de l'X fragile

En 1943, J. Martin et J. Bell ont identifié un désordre lié au chromosome X présentant une ségrégation non conforme aux lois de Mendel. Ces chercheurs ont étudié deux générations d'une famille où se trouvaient onze individus atteints de retard mental qui présentaient des traits physiques communs. La maladie fut désignée sous le nom de syndrome de Martin- Bell jusqu'en 1969, année où Lubs observa chez les sujets atteints un site fragile à l'extrémité du bras long du chromosome X qu'il nomma FRAXA (Fragile chromosome X site A) (Lubs 1969). Ce site fragile peut être visualisé sur les chromosomes en métaphase de mâles atteints de retard mental ainsi que chez les femmes porteuses obligatoires de la même famille. On conserva la notion de fragilité pour nommer le syndrome. Quelques années plus tard, Sutherland démontra que les sites fragiles se produisaient dans des conditions de culture où l'acide folique ou la thymidine étaient absents (Sutherland 1977). Le site fut localisé en Xq 27.3 en 1985.

Le syndrome de l'X fragile est la cause la plus fréquente de retard mental héréditaire. Son incidence est estimée à environ 1/4000 chez les hommes, mais il est également responsable d'un retard mental léger à modéré chez une femme sur 7000 environ. Il est probablement dû à une amplification d'une séquence répétée de triplets cytosine- Guanine- Guanine (CGG) située dans l'extrémité 5' du premier exon non traduit du gène FMR1 (fragile X Mental Retardation1). Ce gène est localisé au locus FRAXA en Xq 27.3, forme de plusieurs exons (17 exons répartis sur 38 Kb), et précédé en 5' par un « îlot CPG » normalement non méthylé sur le chromosome X de l'homme et méthylé uniquement sur l'X inactive de la femme. L'allongement important de la taille de séquence (CGG)_n par augmentation du nombre de répétitions est associé à une méthylation du gène FMR1 qui n'est alors plus exprimé (Figure 12). Cette méthylation qui, en abolissant l'expression du gène FMR1, est responsable du phénotype X fragile [35], un chromosome normal porte cette séquence répétée (CGG)_n mais avec un nombre de répétition faible, de 6 à 54 selon les individus chez les sujets atteints, le nombre de répétition dépasse 200 et peut aller jusqu'à plus de 1000 (mutation complète). Entre 54 et 200 répétition, les porteurs sont

dits permutés : le gène FMR1 est exprimé normalement mais la séquence (CGG) n'a acquis par un passage à la mutation complète dans les générations suivantes [36].

Le gène FMR1 code une protéine cytoplasmique pouvant se lier à des ARN, elle est particulièrement abondante dans les neurones, mais également présente dans de nombreux tissus épithéliaux, cette protéine semble associée aux ribosomes, mais sa fonction exacte est inconnue (régulation de la traduction de certains messagers ?) [37]. Le syndrome de retard mental avec X fragile présente un mode très inhabituel de transmission, avec une augmentation du risque de développer la maladie au cours des générations successives dans une même famille (forme d'anticipation).

Les mutations complètes sont retrouvées chez les patients (hommes ou femmes) avec retard mental et correspondent à de larges expansions (200 à > 1000 CGG), associées à une méthylation anormale de la répétition CGG et des séquences d'ADN environnantes. La présence d'une mutation complète inactivant la transcription du gène FMR1, entraîne un retard mental chez 100% des hommes et environ 60% des femmes hétérozygotes. Les prémutations sont des expansions plus modérées (60 à ≈ 200 CGG) non méthylées, retrouvées chez des males dits normaux transmetteurs et chez la majorité des femmes vectrices sans retard mental. Un homme porteur d'une prémutation (homme normal transmetteur) transmet celle-ci pratiquement inchangée, à toutes ses filles (qui sont donc des vectrices cliniquement normales); le risque d'avoir des enfants atteints survient à la génération suivante.

Une femme avec une petite prémutation a des enfants cliniquement normaux, donc certains porteurs d'une prémutation un peu plus grande, qui peut être responsable de l'apparition de la maladie à la génération suivante (par une fille vectrice) ou chez ses arrière-petits enfants (par un homme normal transmetteur) [38] (Figure 13). Le retard mental peut être le seul symptôme du syndrome de l'X fragile, mais on peut trouver aussi des autres symptômes comme le retard de langage, une macrocéphalie, visage allongé et une macro-orchidie....etc. On peut

Méthylation de l'ADN



Cytosine
méthylée (C^m)

- Processus normal chez les Eucaryotes
- Affecte les doublets Cytosine - Guanine
- Moyen de régulation de l'expression des gènes
- Responsable de l'inactivation de l'X et des mutations d'empreinte

Dans le syndrome de l'X fragile, la méthylation est probablement une réponse à l'expansion des triplets (CGG)_n.

Figure 12. Méthylation de l'ADN, après l'apparition de répétition (CGG) au cours du syndrome de l'X fragile.

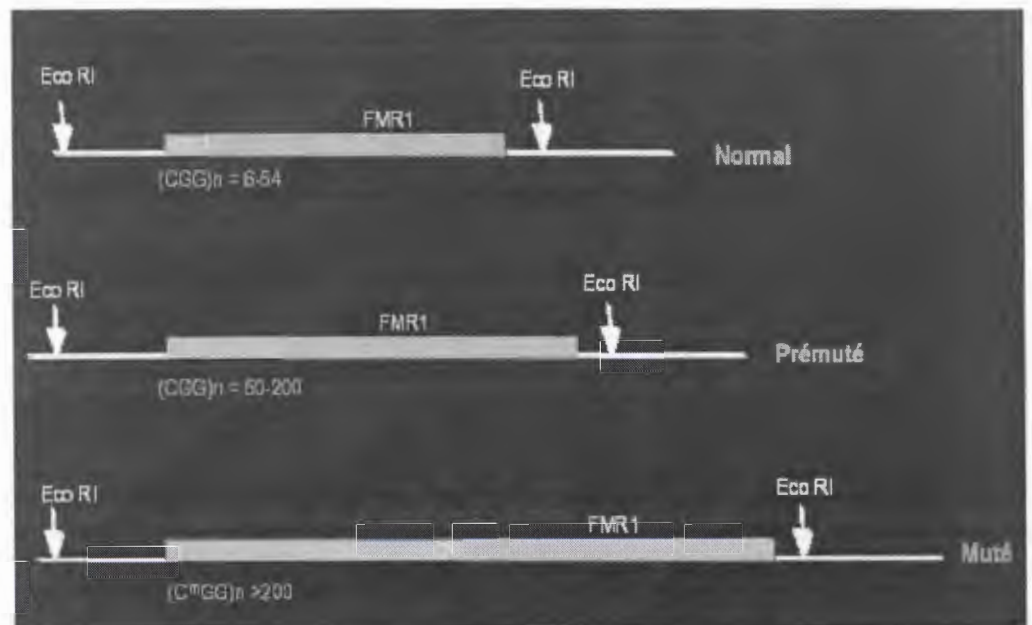


Figure 13. Base moléculaire du syndrome de l'X fragile. La répétition du triplet (CGG) est la cause de la maladie.

utiliser comme traitement des molécules agonistes des récepteurs AMPA et des molécules antagonistes des récepteurs glutaminergique [39].

II.2.2.2- Hémophilies A et B

Les hémophilies sont des affections hémorragiques héréditaires transmises selon un mode récessif lié au chromosome x, et dues à un déficit en facteur VIII de la coagulation (hémophilie A) ou en facteur IX de la coagulation (hémophilies B) [40], les gènes de ces facteurs sont portés par l'un des chromosomes sexuels : le chromosome X, chez les filles qui ont deux chromosomes X, l'anomalie du gène situé sur un chromosome X est en général compensée complètement ou partiellement par l'autre chromosome X sain. Elles ne seront pas malades mais conductrices de l'anomalie, qu'elles pourront transmettre à leur descendance. Les garçons ne peuvent pas compenser l'anomalie du gène situé sur le chromosome X, puisqu'il est Unique. Ils manifestant dans la maladie qui touche environ 1/5000, mais chez les filles, rare.

Un mécanisme mutationnel récurrent rend compte d'environ 45% des cas d'hémophilie A sévère. Il s'agit d'une inversion d'un segment du chromosome X comportant les exons 1 à 22 du gène F8. Cette inversion résulte de la recombinaison intra chromosomique entre deux séquences homologue, l'une située dans l'intron 22 du gène l'autre en amont du gène coté télomérique (figure 14) et semble survenir essentiellement lors des méioses masculines [41]. De très nombreuses mutations ponctuelles (environ 174 mutations ponctuelles) sont décrites, mutation non sens. À l'origine de formes sévères de la maladie, mutation faux sens à l'origine de formes plus modérées de la maladie (figure15) [42]. La majorité (95%) des mutations sont des mutations ponctuelle nom -sens faux-sens, ou des insertions/délétion de quelques paires de basses. plusieurs centaines de mutations sont actuellement répertoriées et sont réparties sur l'ensemble du gène. Les 5% restants sont dus à des délétions de plus grande taille (Figure 16).

La symptomatologie chimique est identique quel que soit le type d'hémophile (A ou B) et dépend essentiellement du taux du facteur déficitaire l'hémophilie sévère est une maladie grave par la fréquence et la récurrence des accidents hémorragique provoqués ou spontanés. Ceux-ci débutent par des ecchymoses ou des hématomes du front ou des fesses dans les premières années

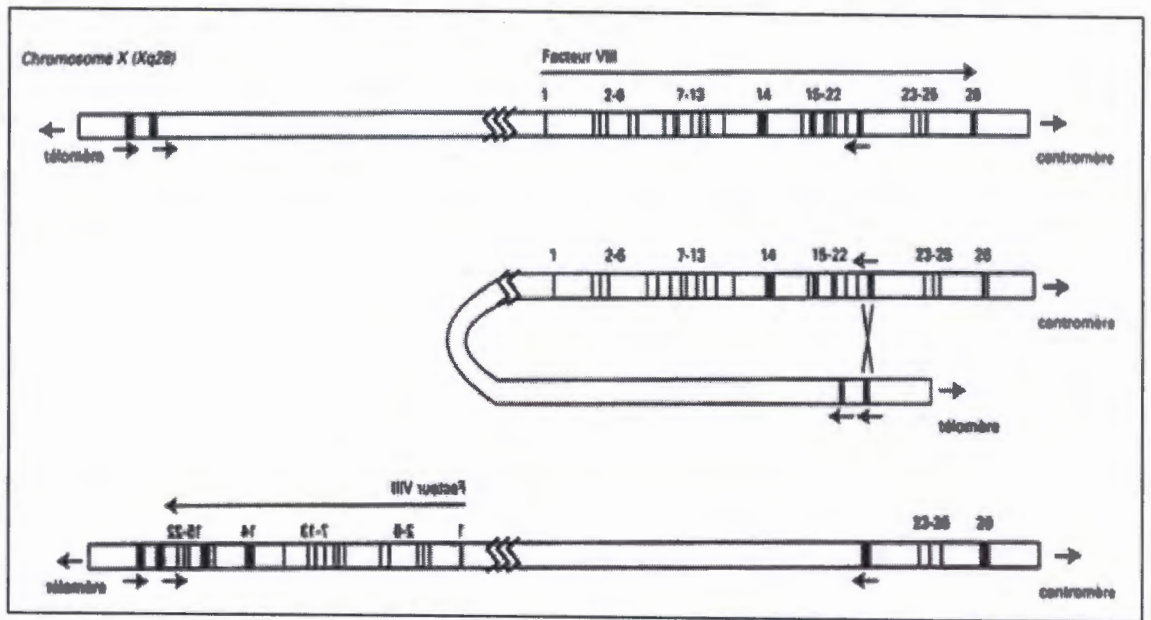


Figure14. Mécanisme de l'inversion dans le gène F8.

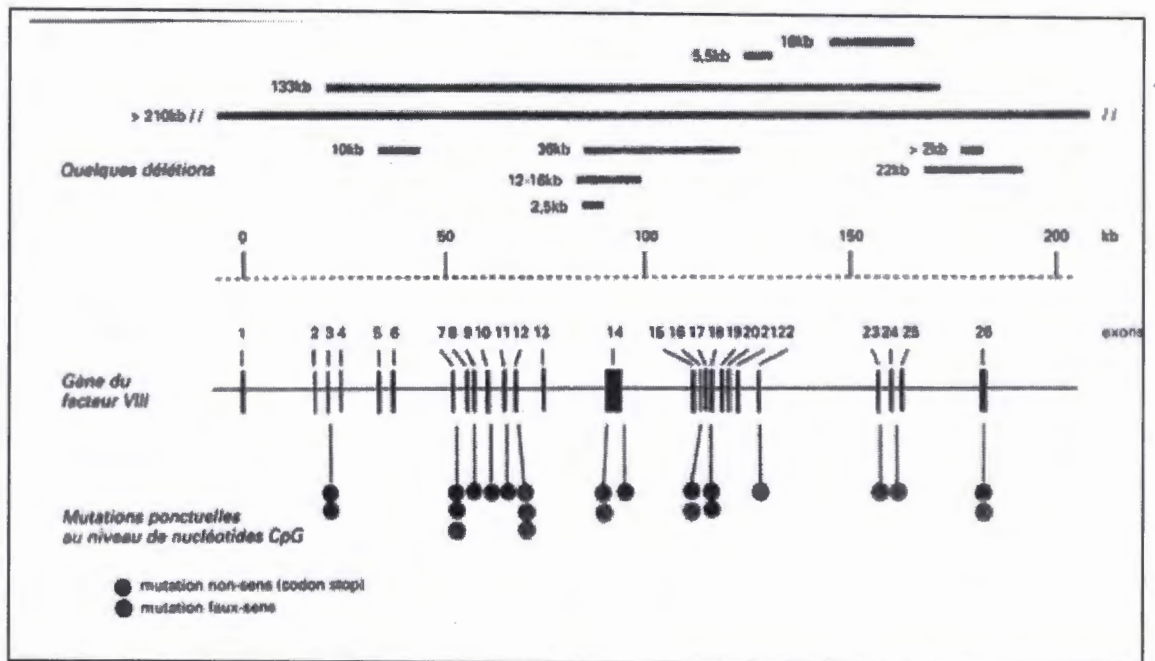


Figure15. Mutations ponctuelles du gène F8.

de vie, puis deviennent plus fréquents et touchent essentiellement les articulations (hémarthroses) et les muscles (hématomes). Ces accidents sont souvent douloureux [43]. La récurrence des hémarthroses va entraîner progressivement d'importantes séquelles articulaires avec douleurs chroniques et handicap locomoteur. Certains accidents hémorragiques sont graves et peuvent mettre en jeu le pronostic vital ou fonctionnel du fait de leur localisation (hémorragies, intracérébrale, intra-abdominale, digestive..) ou de leur importance (anémie, compression vasculo – nerveuse, etc.). Dans l'hémophilie modérée, les accidents hémorragiques sont beaucoup plus rares et essentiellement post- traumatiques. Dans l'hémophilie mineure, les accidents hémorragiques sont rares et uniquement post- traumatiques. L'extraction d'une dent ou une intervention chirurgicale peut entraîner une hémorragie difficile à contrôler [44].

Pour traiter cette maladie on utilise des médicaments de substitution qui permettent pendant un laps de temps limité d'avoir une coagulation normale en apportant le facteur de coagulation manquant le principal risque est de développer des anticorps anti- facteur de substitution, appelés inhibiteurs, qui rendent inefficace un traitement par ces mêmes facteurs de substitution comme étranger et cherchent à l'éliminer. L'apparition d'inhibiteurs est beaucoup plus fréquente dans les cas d'hémophilie A (15% des hémophilies A sévères, 5% des formes modérées ou légères) que dans l'hémophilie B (05% à 10% des hémophilies B sévères) [45]. Dans les années 90, la survenue d'un inhibiteur est devenue l'effet indésirable le plus fréquent et le plus grave chez les patients hémophiles. Certains de ces anticorps dirigés contre des épitopes du facteur de coagulation déficitaire entraînent une perte d'efficacité des traitements substitutifs. Dans cette situation, les traitements à visée anti-hémorragique font appel à des médicaments d'utilisation plus difficile, avec souvent une efficacité moindre et dans tous les cas un coût significativement plus élevé. Des traitements substitutifs intensifs appelés régimes d'induction de tolérance immunitaire peuvent être proposés pour les patients qui développent une réponse inhibitrice. En 2002, les spécialistes français regroupés au sein de la coordination médicale pour l'étude et le traitement des maladies hémorragiques (cometh) ont émis des recommandations thérapeutiques pour la prophylaxie primaire de longue durée débutée précocement et progressivement intensifiée pour les enfants hémophiles sévères [46]. Depuis 2004, l'institut de veille sanitaire (INVS) remplace l'Inserm dans sa coordination.

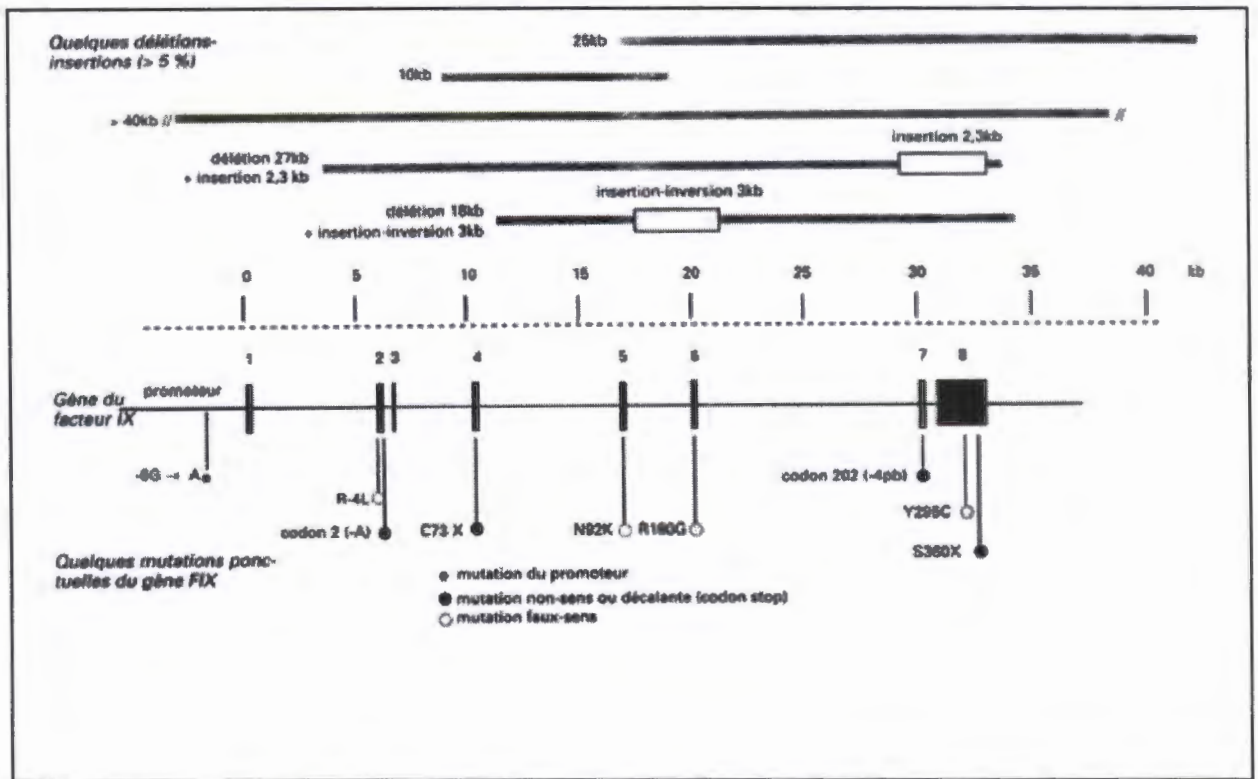


Figure16. Mutations ponctuelles du gène F9.



Figure17. Signe de Gowers : faiblesse musculaire au niveau des hanches et possibilité de couvrir et de manœuvres pour se relever de la position à genoux chez les enfants.

II.2.2.3- Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD)

La dystrophie musculaire de Duchenne est l'une des dystrophies les plus sévères, c'est une maladie musculaire progressive dont la transmission est récessive liée aux chromosome X. Seuls les hommes sont atteints à une incidence de un nouveau né tous les 3500 et les femmes véritablement atteintes de myopathie de Duchenne par homozygotie ou hémizygotie [47]. Cette myopathie a été décrite pour la première fois par Edward Meryon en 1952. Le physiologiste française G Duchenne de Boulogne a ensuite mieux caractérisé la maladie qui porte son nom, dont il attribua initialement la cause à un désordre cérébral et la nomma "paraplégie hypertrophique de l'enfance". Par contre, en 1868, il découvrit que ce trouble était relié aux muscles. Il proposa alors des critères diagnostiques basés sur des observations anatomiques et des stimulations –électriques. Il décrivit aussi le remplacement du tissu musculaire par le tissu fibreux ou conjonctif par biopsies musculaires. Finalement, il observa que l'hydrothérapie et des massages accompagnés des stimulations électriques pouvaient améliorer la condition des patients pendant les phases initiales du développement de la maladie [48]. En 1886, Gowers (William Richard Gowers, 1845-1915) observa que les cas isolés de dystrophie étaient plus rares que les cas familiaux avec des antécédents du côté de la mère. L'Allemagne s'intéressait aussi aux dystrophies musculaires et les travaux de Wilhem Heinrich Erb (1840-1921) sont dignes de mention. Il fut le premier à tenter une classification des différentes dystrophies.

Le caractère pathologique de cette myopathie se traduit par une dégénérescence du tissu musculaire. Durant la première de vie, les bébés ne présentent pas de symptômes évidents, mis à part un léger retard de croissance. Les signes sont visible vers l'âge de 4 à 5 ans, lorsqu'une faiblesse musculaire au niveau des hanches se manifeste chez les enfants atteints, ainsi qu'une possibilité de courir et des manœuvres successives caractéristiques pour se relever de la position à genoux (le signe de Gower); (Figure 17). Les mollets volumineux (une pseudohypertrophie) résultent de l'accumulation de collagène fibrose) et de graisse du fait de la dégénérescence musculaire [49]. En générale, les muscles des épaules et du bassin (les muscles proximaux s'affaiblissent avant ceux des bras et des jambes (les muscles distaux) dans la plupart des cas, les patients DMD sont dans un fauteuil roulant vers l'âge de 10 ans et l'âge moyen au moment du décès est de 17 ans. L'incapacité des muscles cardiaque et lisses survient chez environ 20% des patients. La mort survient en générale de la faiblesse des muscles de la cage thoracique et du cœur. Les biopsies musculaires et une désorganisation des muscles dans lesquels les longueurs des fibres restantes sont variables.

Une caractéristique biochimique de la DMD est une augmentation de la phosphocréatine kinase sérique (PCK) de 10 à 10000 fois. Le taux normal. La PCK est une enzyme qui joue un

rôle dans la libération de l'énergie stockée dans la phosphocréatine au cours de la contraction musculaire. La présence de PCK en grande quantité dans le sang est un indicateur de la dégradation du muscle mais ne correspond pas obligatoirement à la gravité de lésions musculaires. Les filles hétérozygotes (conductrices) pour le gène DMD ne manifestent pas de faiblesse musculaire en général. Même si l'on trouve dans leur sérum des niveaux légèrement élevés de PCK. Certaines conductrices présentent toute fois des douleurs musculaires, elles ont des crampes en faisant de l'exercice, des problèmes cardiaques et des mollets volumineux dans de rares cas [49].

Le gène causant la dystrophie musculaire de Duchenne a été identifié en 1986 et son produit [50], la dystrophine a été caractérisé par le groupe de Kunkel en 1987 [51]. Le gène est localisé sur le chromosome X au locus Xp21, ce qui en fait une maladie récessive liée au chromosome X. La dystrophine est exprimée par différents types cellulaires dans lesquels plusieurs isoformes sont retrouvées. Les mutations à l'intérieur du gène, qui produisent une dystrophine tronquée, se traduisent phénotypiquement par le développement d'une dystrophie. Cette maladie est donc héréditaire et affecte majoritairement les garçons. Le gène de la dystrophine est parmi les plus grands connus, contenant 2,4 mégabases d'ADN (acide désoxyribonucléique), ce qui comprend environ 1% du chromosome X. La partie codante (environ 14 kilobases) renferme 79 exons séparés par des introns pouvant atteindre 200 kilobases (KB). Seulement 0,6 % du gène code pour la protéine dystrophine.

La mutation du gène codant pour la dystrophine cause aussi des pathologies musculaires chez les animaux. En 1984, une souris dystrophique fut décrite (mdx pour muscular Dystrophy X-linked) [52].

La dystrophine est une protéine d'une masse moléculaire de 427 Kda. Elle est située sur la partie interne de la membrane de la cellule musculaire, à laquelle elle est encreée par un complexe de nombreuses autres protéines [39] (Figure 18). La présence de la dystrophine et de son complexe est importante pour la stabilité mécanique de la membrane cellulaire pendant la contraction musculaire et la résistance des fibres musculaires à l'étirement quatre domaines majeurs composent la dystrophine. D'abord, les 240 premiers acides aminés de la portion N-Terminale de la dystrophine constituent le domaine de liaison à l'actine. Le second domaine se compose de 24 répétitions en tandem qui donnent sa forme de bâtonnet à la dystrophine, une autre protéine du cytosquelette le troisième domaine est riche en cystéines et se lie à la β -dystroglycane, la pièce centrale du complexe multimérique de la dystrophine. En effet c'est la β -dystroglycane qui fait le pont transmembranaire entre les protéines intracellulaires et extracellulaires. Quatrième domaine, positionné en C-terminal, sert de domaine de liaison à

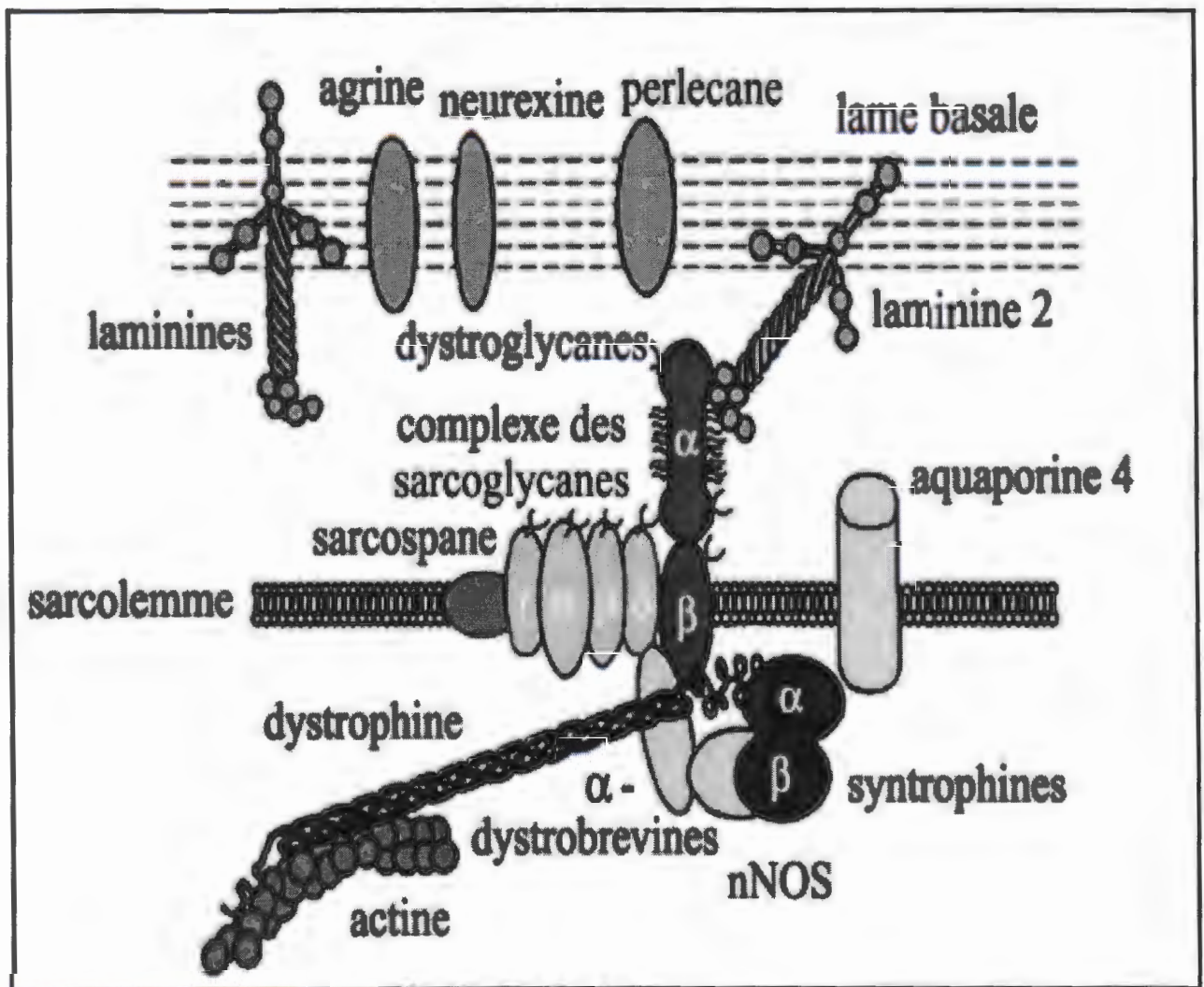


Figure 18. Le complexe protéique de la Dystrophine.

d'autres membres du complexe [51]. La région C-terminale de la dystrophine se lie aux autres protéines du complexe alors que la région N-terminale se lie à l'actine. La portion centrale forme une tige hélicoïdale élastique. Le complexe associé à la dystrophine agit comme une charnière trans-sarcolemmale liant le cytosquelette à la matrice extracellulaire.

On retrouve la dystrophine dans tous les types de tissus musculaires. L'absence de la dystrophine, et par conséquent du complexe protéique associé à la dystrophine provoque une instabilité membranaire des fibres musculaires. Ainsi, chez les patients Duchenne, le stress physique occasionné par la contraction ou l'étirement musculaire occasionne des ruptures membranaires. Celles-ci entraînent une succession de cycles de dégénérescence-régénération des myofibrilles qui épuisent rapidement le réservoir de cellules satellites, résultant en une dégénérescence musculaire progressive caractéristique de la maladie (Figure 19). Le gène de la dystrophine code pour plus d'un produit. On peut retrouver plusieurs des isoformes (de 70 à 260 Kda) dans d'autres tissus que le muscle. Le gène de la dystrophine code en effet pour au moins six produits additionnels : deux isoformes non musculaires sont transcrites sous les promoteurs localisés dans la région -5' du gène et quatre isoformes plus petites sont transcrites sous le contrôle de promoteurs internes plus loin en aval du site d'initiation utilisé pour les isoformes longues. La fonction précise des isoformes non musculaires de la dystrophine est encore mal caractérisée, mais l'absence d'une isoforme neurale chez les patients DMD pourrait potentiellement expliquer le retard mental parfois observé [39].

Plusieurs autres protéines associées à la dystrophine forment un complexe liant les filaments d'actine (filaments fins) avec la matrice extracellulaire, en traversant le sarcolemme. A ce jour, le complexe associé à la dystrophine (CAD) compte 18 protéines : la laminine- α 2 (mérosine), les dystroglycans (α , β), les sarcoglycans (α , β , ...etc.), la sarcospan, la dystrophine, les dystroglycans (α 1, β 1 et β 2), la "nitric oxyde synthase" (Nos), la MAST205 ("microtubule associated serine/threonine kinase 205 Kd"), la syncoilin, la calvéoline-3 et la Grb2 [53] (figure 20). Ce lien serré entre la dystrophine et son complexe permet de relier les myofibrilles au sarcolemme et la matrice extracellulaire. Dans le cas de la DMD, les protéines du CAD ne se localisent pas au sarcolemme, du à l'absence de dystrophine. Cette observation se produit aussi chez les souris mdx, le modèle animal de souris de DMD. De plus, des modifications dans les gènes de certaines protéines du CAD se traduisent en myopathie

Une prise en charge éducative et rééducative est indispensable et souvent lourde : kinésithérapie (dont balnéothérapie en eau chaude à 34°C); chirurgie des déformations (scoliose : arthrolyse vertébrale); kiné respiratoire aidée d'appareils de ventilation, dans une

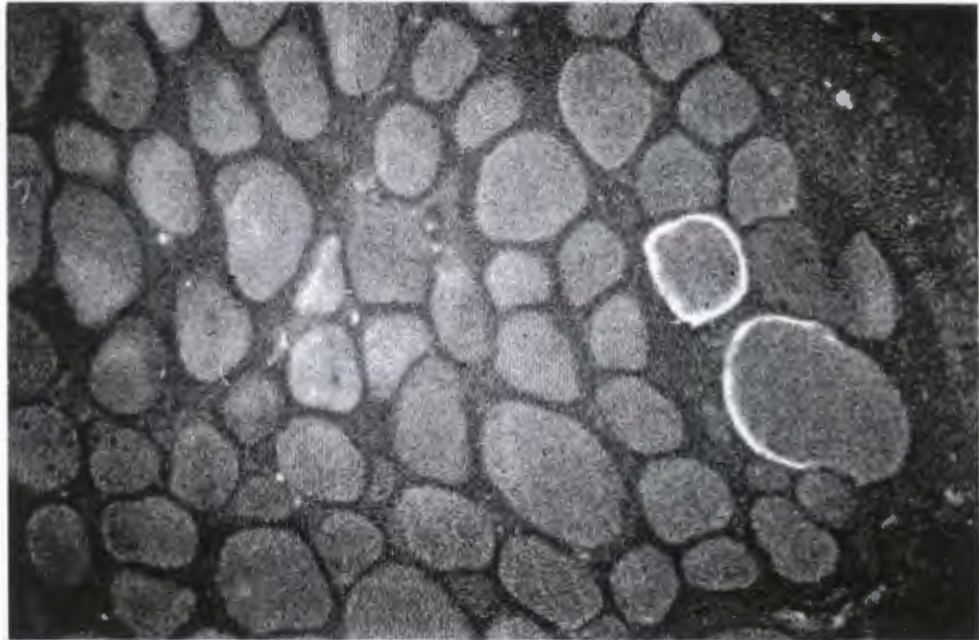
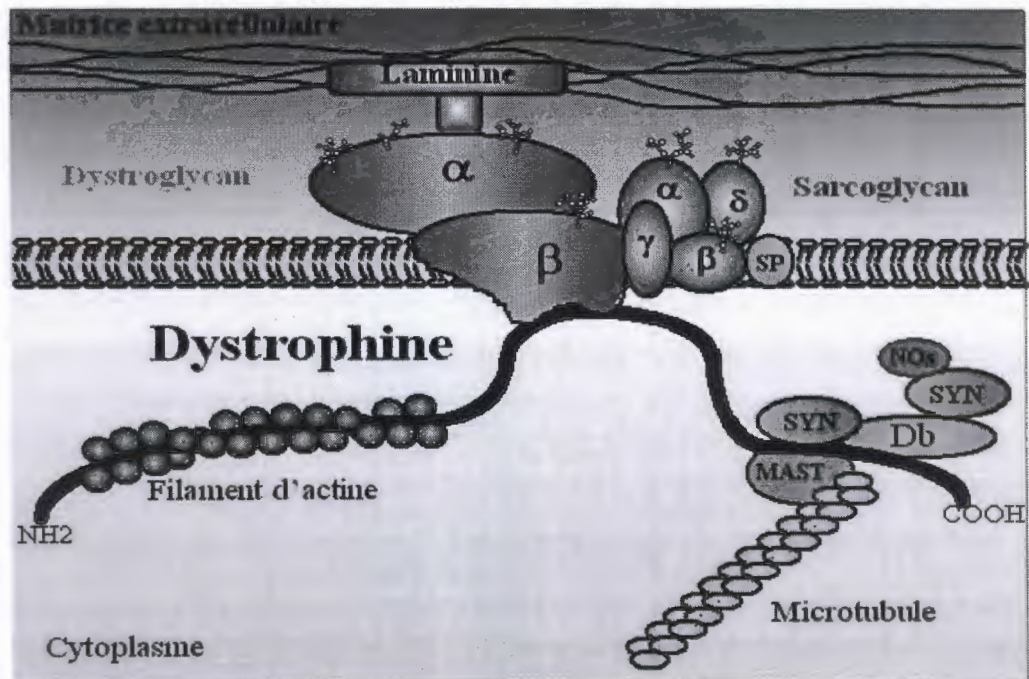


Figure 19. Absence de la dystrophine, sauf sur quelques fibres, dans un cas de myopathie de Duchenne.



SP : Sarcospan, SYN : Syntrophine, Db : Dystrobrevine, NOs : « Nitric oxyde synthase », MAST : « Microtubule-associated serine/threonin kinase ».

Figure 20. Représentation schématique du complexe glycoprotéique associé à la dystrophine.

premier temps pour préserver la souplesse de la cage thoracique et la capacité vitale puis d'assistance : ventilation intermittente ou permanente ; trachéostomie permettant de ventiler directement les poumons par la trachée grâce à un orifice pratiqué à travers la peau (sur le devant du cou); aides techniques, etc. S'il n'existe actuellement aucun moyen de ralentir l'évolution de la maladie, l'espérance de vie des personnes atteintes n'a considérablement augmenté. Ces dernières années grâce à des soins, notamment respiratoires, adaptés. Des recherches très importantes, fondées sur la génétique, sont actuellement en cours.

II.2.3-Maladies neurodégénératives

Une maladie neurodégénératives est une maladie qui affecte le fonctionnement du cerveau ou plus généralement le système nerveux de façon progressive au cours de son évolution. Celle -ci peut être plus ou moins longue (de quelques semaines à plusieurs années) le processus en cause consiste généralement en une détérioration du fonctionnement des cellules nerveuses, en particulier les neurones. La conséquence pour le malade est donc une altération progressive souvent irréversible des fonctions nerveuses qui peut conduire à son décès. En fonction des régions du système nerveux atteintes par la maladie , les troubles pourront affecter la motricité , le langage , la mémoire , la perception, la cognition....etc. On distingue donc les maladies atteignant le système nerveux central de celles touchant le système nerveux périphérique. Parmi ces maladies neurodégénératives on peut citer : la maladie d'Alzheimer la maladie de Huntington, la sclérose latérale amyotrophique, la maladie de Charcot- Marie -tooth, la schizophrénie et l'ataxie de Friedreich.

II.2.3.1- Maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (AD) tient son nom du neurologue allemand Alois Alzheimer (1864-1915) qui en a fourni la description clinique et neuropathologique en 1907. Les deux tiers au moins de l'ensemble des cas actuellement diagnostiqués de démence sont des maladies d'Alzheimer. Aux États-Unis en 1996, environ quatre millions de personnes souffraient d'Alzheimer, ce nombre va augmenter puisque la population générale vieillit chaque année, l'AD tue environ 100 000 personnes aux États-Unis, ce qui place cette pathologie au quatrième rang après les maladies cardiaques, le cancer et l'infarctus. La maladie d'Alzheimer touche à peu près 3%, 19% et 47% des tranches d'âge 65-74 ans, 75-85 ans, 86 ans et au-delà respectivement [54].

La maladie d'Alzheimer est une maladie du cerveau qui se traduit par une dégénérescence progressive des cellules nerveuses. Elle représente environ 65% des cas de démence dégénérative. Les lésions débutent au sein des zones du cerveau impliquées dans la mémoire, puis elles s'étendent progressivement à d'autres régions qui interviennent dans le langage, les capacités gestuelles et le raisonnement. La maladie d'Alzheimer se caractérise par une détérioration progressive des fonctions cognitives qui altèrent l'aptitude aux activités de la vie quotidienne. La phase de début se caractérise essentiellement par des troubles de la mémoire touchant les faits récents, du langage et par des symptômes psychocomportementaux (apathie, désintérêt, irritabilité) [55], on distingue aussi un changement d'humeur et d'autre dans la personnalité. A ce jour, il n'existe pas de traitement curatif pour la maladie d'Alzheimer, les médicaments actuellement sur le marché (les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase) ne font que ralentir la progression de la maladie. Pour soigner les symptômes accompagnant la maladie, tels que l'agitation, l'angoisse, etc., le recours à des neuroleptiques et à des antidépresseurs s'avèrent souvent indispensables [56]. Il existe deux types de lésions, à savoir, d'une part, la formation des plaques séniles extraneuronales constituées de dépôts de protéine beta-amyloïde d'autre part, une dégénérescence neuro-fibrillaire à l'intérieur des neurones [57].

La protéine β amyloïde ou peptide β est initialement isolée à partir de vaisseaux méningés provenant de cas de cas d'angiopathie amyloïde. Elle est connue sous une forme courte de 40 acides aminés ($A\beta_{40}$) et deux formes longues de 42 et 43 acides aminés ($A\beta_{42}$ et $A\beta_{43}$). Elle provient de clivage de son précurseur l'« amyloïde précurseur protéine » (APP), protéine bien plus longue, comportant de 698 à 777 acide aminés. L'APP est majoritairement clivée par une enzyme appelée l' α -sécrétase. Le produit de ce clivage est soluble [58]. Par contre, il existe une voie minoritaire, représentée par une β -sécrétase et une γ -sécrétase, dont l'activité sur l'APP donne naissance au peptide $A\beta$, produit de clivage non-soluble de l'APP, [59] (figure 21).

Les dépôts de peptide $A\beta$ contiennent deux types, les dépôts Diffus, sont volumineux (plusieurs centaines de micromètres de diamètre), mal limités. Ils contiennent essentiellement la forme longue $A\beta_{42}$ du peptide. Cependant, ces dépôts diffus ne sont pas liés à l'état intellectuel. Il n'est pas rare d'en trouver un grand nombre, sans traduction clinique, surtout

chez les personnes âgées. On les trouve volontiers dans les noyaux gris centraux, dans le cervelet. Ils ne sont à proprement parler des plaques séniles car ils ne comportent pas les prolongement nerveux qui en forment la couronne ; l'aspect des synapses au sein du dépôt ne semble que rarement modifié ; les neurones à leur contact paraissent normaux (figure 21). Les dépôts focaux, sont sphériques, bien limités, plus petits que les dépôts diffus (environ 150 μm de diamètre). On les voit dans le cortex cérébral, notamment dans le cortex associatif. Ils correspondent à un dépôt focal, dense, de la forme courte des peptides $\text{A}\beta$. Si ce centre, est entouré d'une couronne de prolongement nerveuse, alors il réalise la véritable plaque sénile (figure 21).

Les lésions de dégénérescence neuro-fibrillaire (DNF) sont intra- Neuronales. Elles sont formées par l'accumulation de neurofilaments anormaux dont le principal constituant est une protéine tau anormalement phosphorylée. Cette protéine est codé par un seul gène contenant 16 exons et situé sur le chromosome 17. La protéine tau est une phosphoprotéine avec de nombreux sites de phosphorylation identifiés à ce jour situés notamment du côté c-terminal. Ses phosphorylations anormales mènent à l'agrégation des protéines tau en paires de fragments en hélice (PHE) au lieu d'une association aux microtubules [54] (figure 22).

Le concept de « Tauopathies » existe depuis peu et désigne les maladies qui ont en commun le fait de comporter des agrégats intra- neuraux de protéines tau anormalement phosphorylées. Les maladies neurodégénératives avec tauopathie se chevauchent sémiologiquement : dégénérescence cortico-basale, paralysie supranucléaire progressive, démences frontales et fronto- temporales et maladie d'alzheimer. Aucune mutation du gène n'a été décrite dans la maladie d'Alzheimer, mais 3 protéines tau anormales ont été détectées : 60, 64 et 68 KD [60]. Ces lésions sont assez bien systématisées et leur topographie est corrélée la nature des signes cliniques. Cette topographie suit une chronologie récemment identifiée dans la maladie d'Alzheimer, 10 stades ainsi distingués.

Les 3 premiers sont communs avec l'histologie du vieillissement normal : le stade1 l'apparition d'une DNF dans la région transentorhinale, stade2 : Puis dans le cortex enthorinal lui- même, stade3 : Puis dans l'hippocampe jusque là, la présence d'une DNF dans

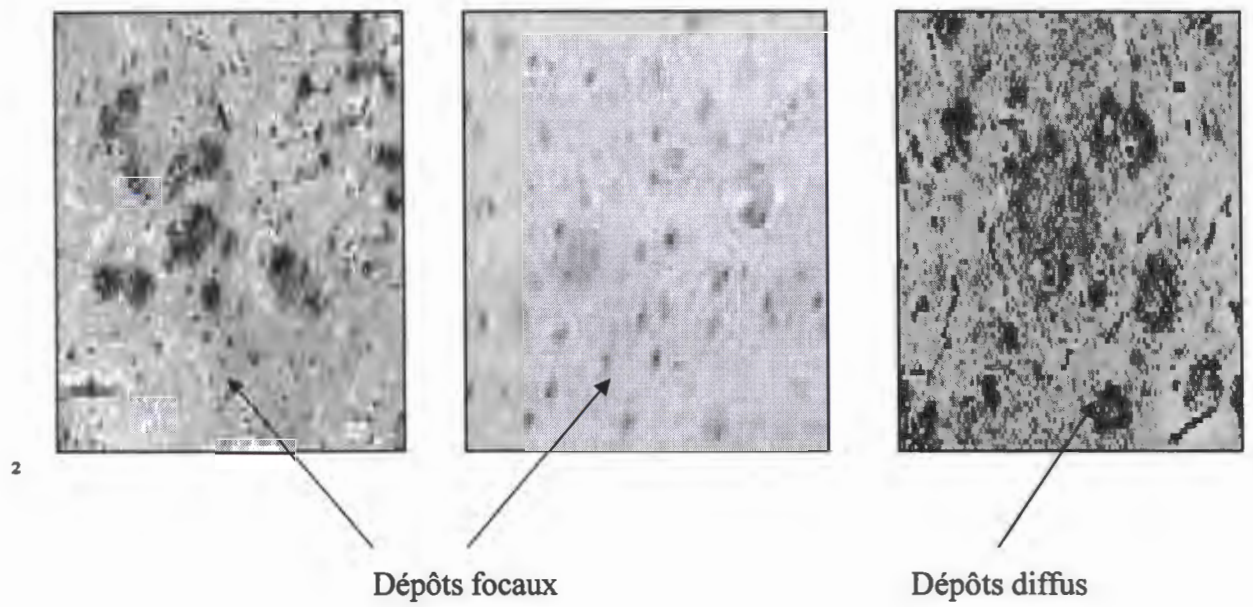


Figure 21. Les plaques séniles

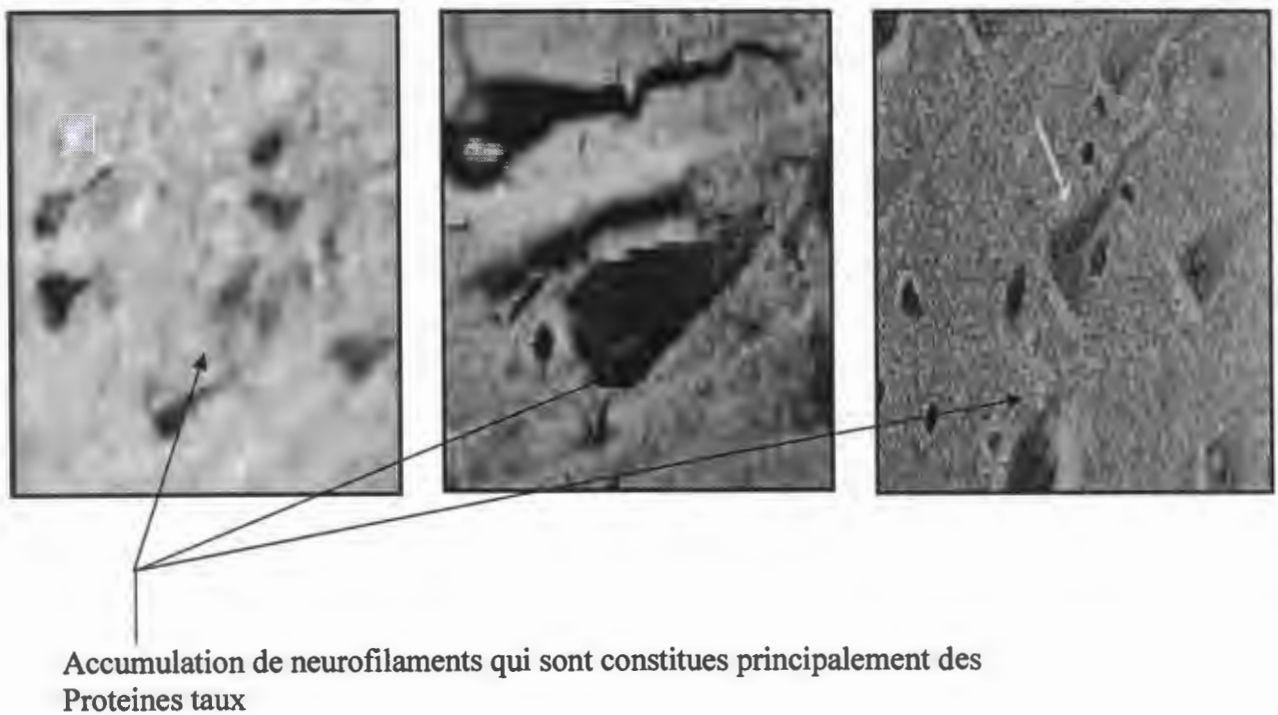


Figure 22. Dégénérescence neurofibrillaire

ces régions ne permet pas de différencier le vieillissement cérébrale normal d'une maladie d'Alzheimer à son tout début stade4 : La DNF atteint le cortex temporal antérieur, stade5 : Puis le cortex temporal inférieur, stade6 : Le cortex temporal moyen, stade7 : La DNF s'installe dans les régions associatives, dites « polymodales » : Frontale antérieure- Temporale supérieure- Pariétale inférieure, stade8 : Puis dans les régions unimodales (telle l'aire de Broca), stade9 : Dans les régions corticales primaires, visuelle et/ou motrices, stade10 : La DNF est présente de manière diffuse, y compris dans les noyaux gris centraux (Voire les figure 23, 24 et 25).

Dans la maladie d'Alzheimer, la perte neuronale ne s'élève pas à plus de 20% sur l'ensemble des régions corticales. Mais cette perte est concentrée dans les aires associatives (jusqu'à 50%) et dans les noyaux sous- corticaux (jusqu'à 60%). Pourtant, elle semble intervenir de manière tardive dans la détérioration intellectuelle [55] (voire les figure 26 et 27). La perte synaptique a été longtemps difficile à mettre en évidence du fait des techniques d'études peu faibles. Les premiers résultats contributifs ont établi une corrélation entre l'état intellectuelle et la densité synaptique. Mais cette corrélation est moins significative que celle qui unit dégénérescence neurofibrillaire et état intellectuelle. Dans les lésions vasculaires la présence d'infarctus cérébraux semble bien majorer le risque de démence. Une étude aux Etats-Unis a été réalisée sur des femmes âgées, qui avaient, à l'autopsie, des lésions typiques de la maladie d'Alzheimer. La maladie était beaucoup plus fréquente chez celles qui avaient, en association, des petits infarctus dits lacunaires, en particulier dans 3 régions précises du cerveau : le noyau codé, le thalamus et la substance blanche profonde.

Chez l'humain, on dénote deux présénilines connues sous les observations de PS1 et PS2, ces protéines serpentine possèdent 6 à 8 domaines transmembranaires situés à des membranes biologiques cibles. La préséniline 2 partage une homologie de 67% avec la séquence en acides aminés de PS1 et s'exprime principalement dans le muscle cardiaque, squelettique et le pancréas. Ils existe au moins 2 mutations du gène de la préséniline 2 impliquées dans la maladie d'Alzheimer, ce qui amena les chercheurs à consacrer davantage leurs recherches sur la préséniline 1 [61] (figure 28).

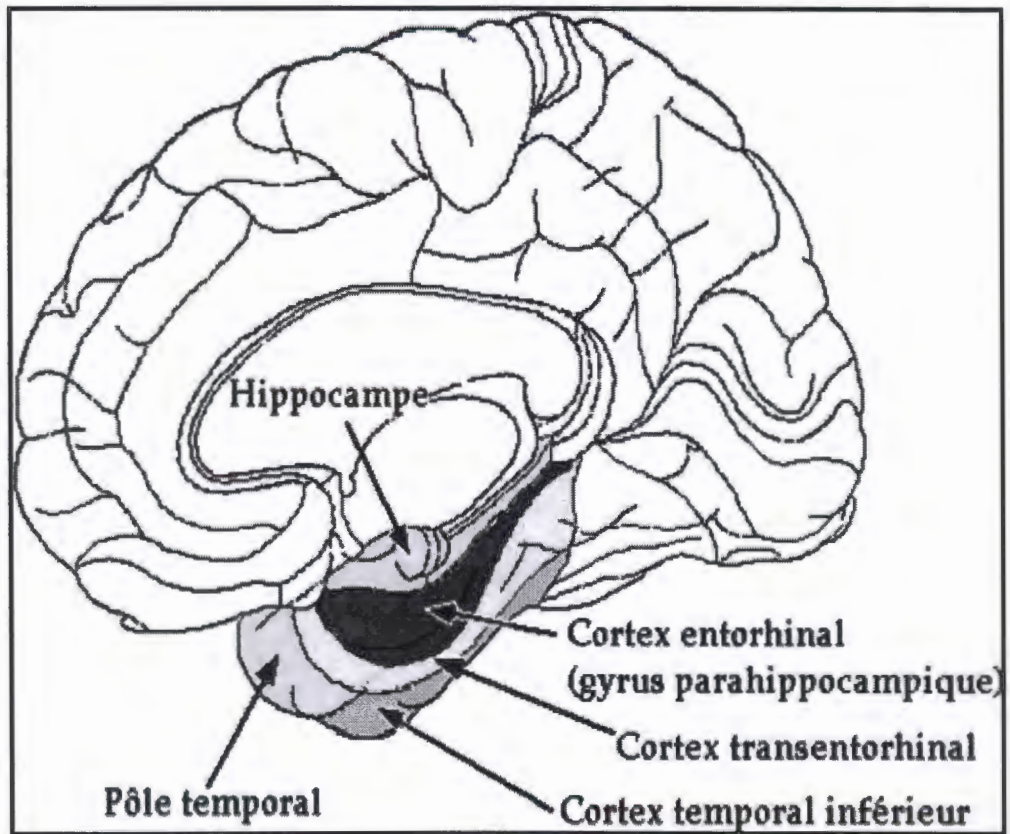


Figure 23. Représentation schématique de l'anatomie du cerveau humain.

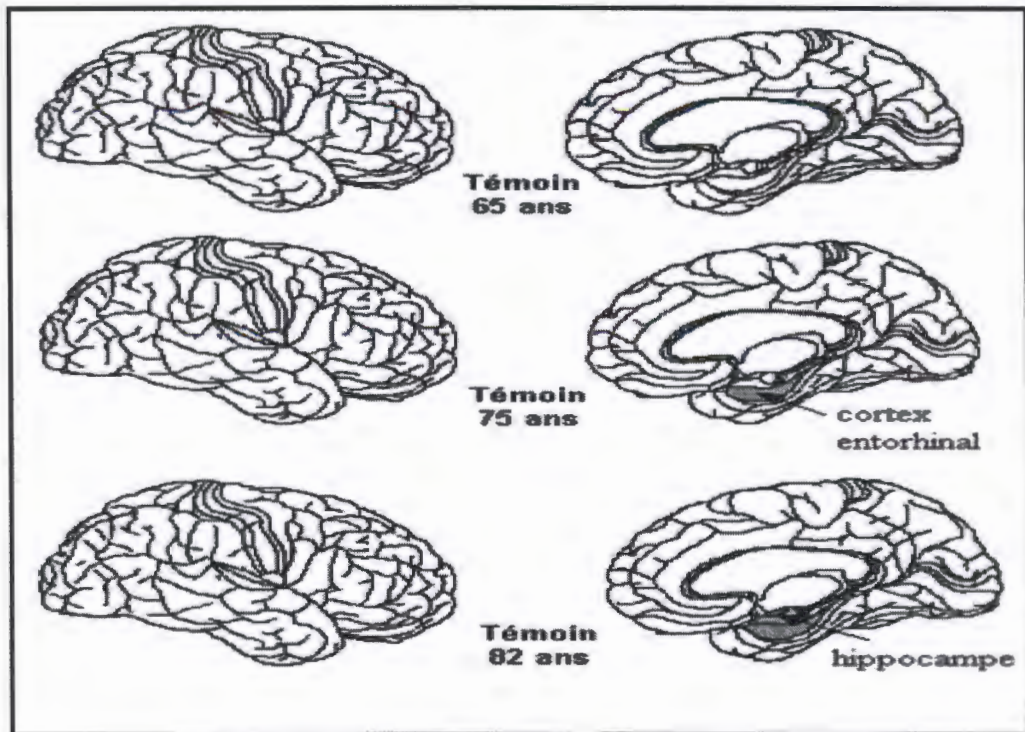


Figure 24. Distribution de protéine Tau dans le cas de vieillissement

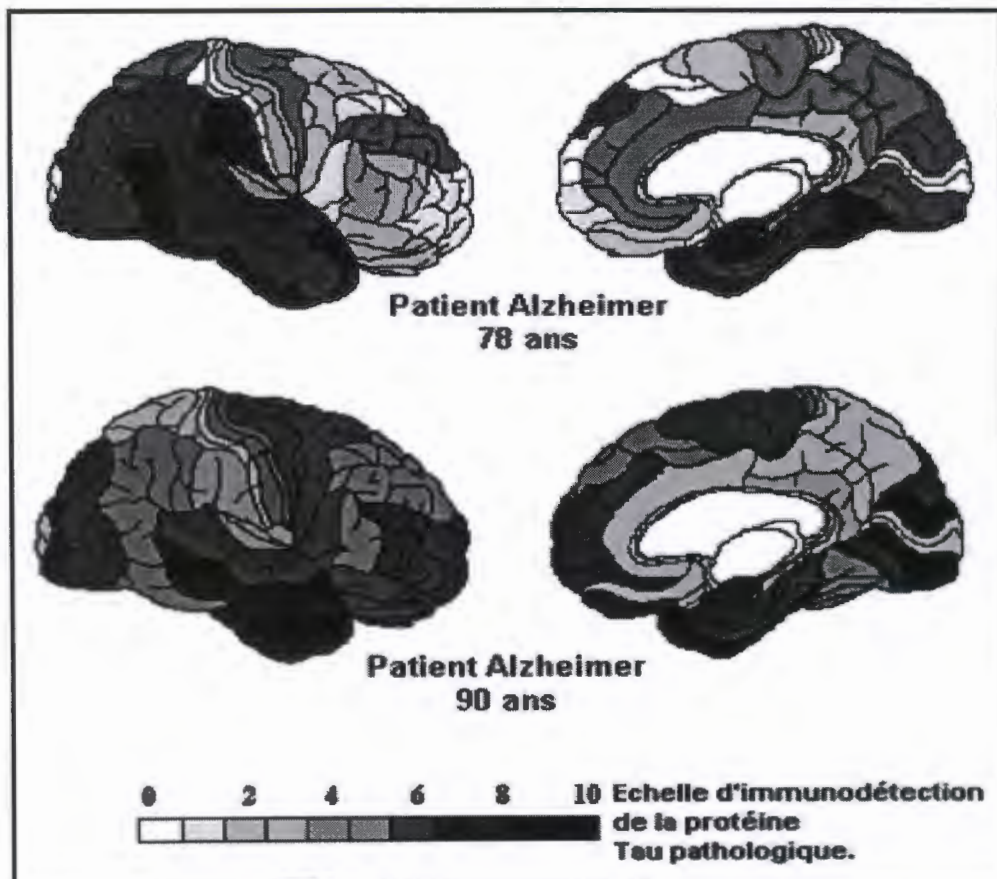


Figure 25. Distribution de la protéine Tau dans le cas de la maladie d'Alzheimer

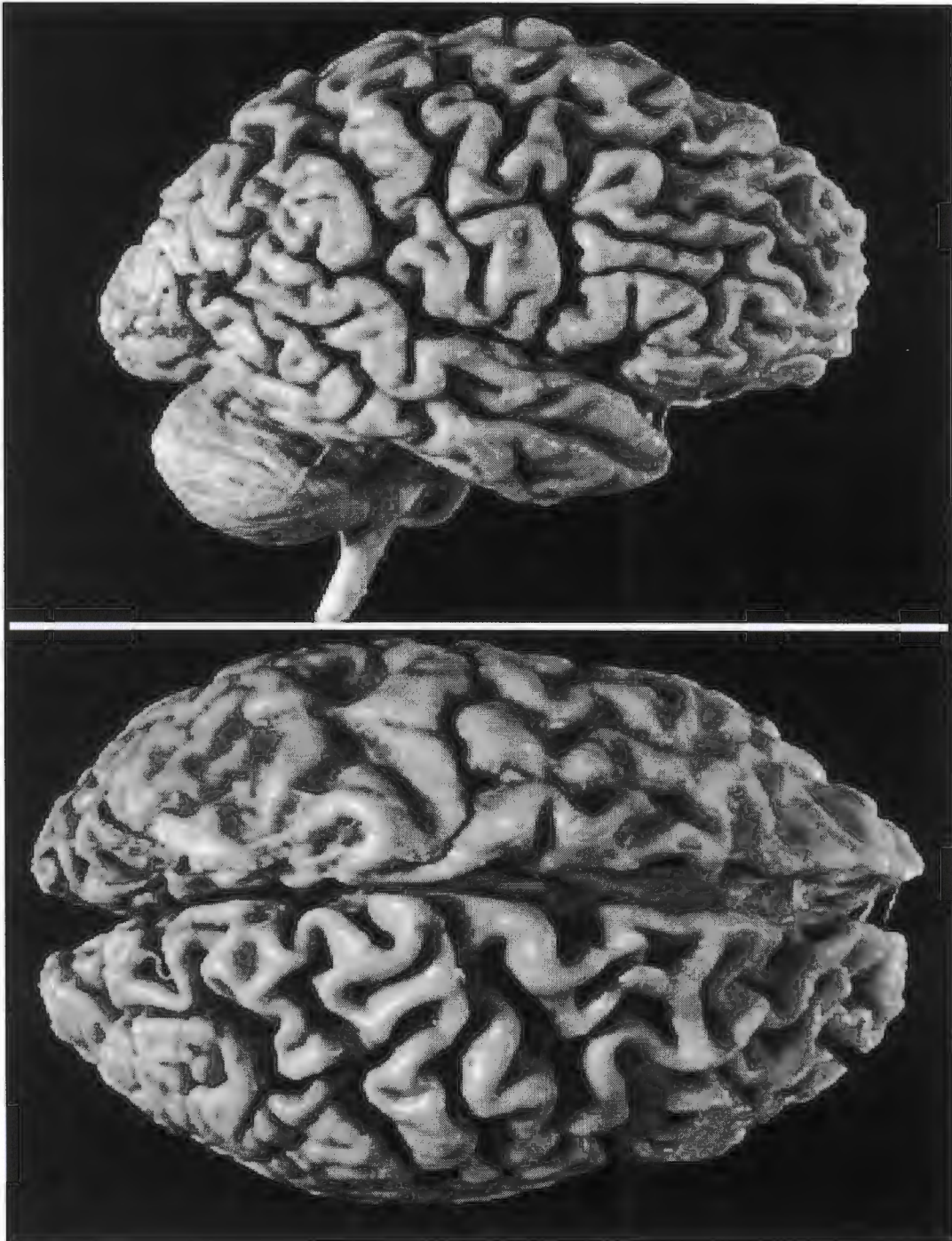


Figure 26. Atrophie cérébrale d'une maladie d'Alzheimer, intéressant les régions temporo-pariétales, avec ici, une extension en frontal.

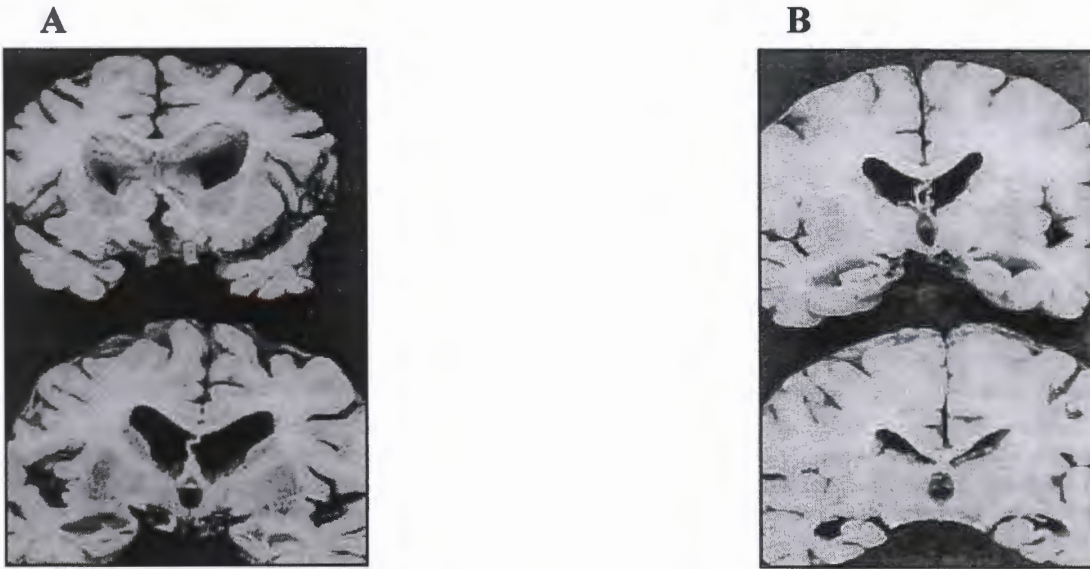


Figure 27. La perte des neurones.

A: atrophie cérébrale particulièrement nette dans un cas de démence de type Alzheimer. L'atrophie corticale est associée à une dilatation ventriculaire.
B: cerveau d'une personne du même âge, intellectuellement normale.

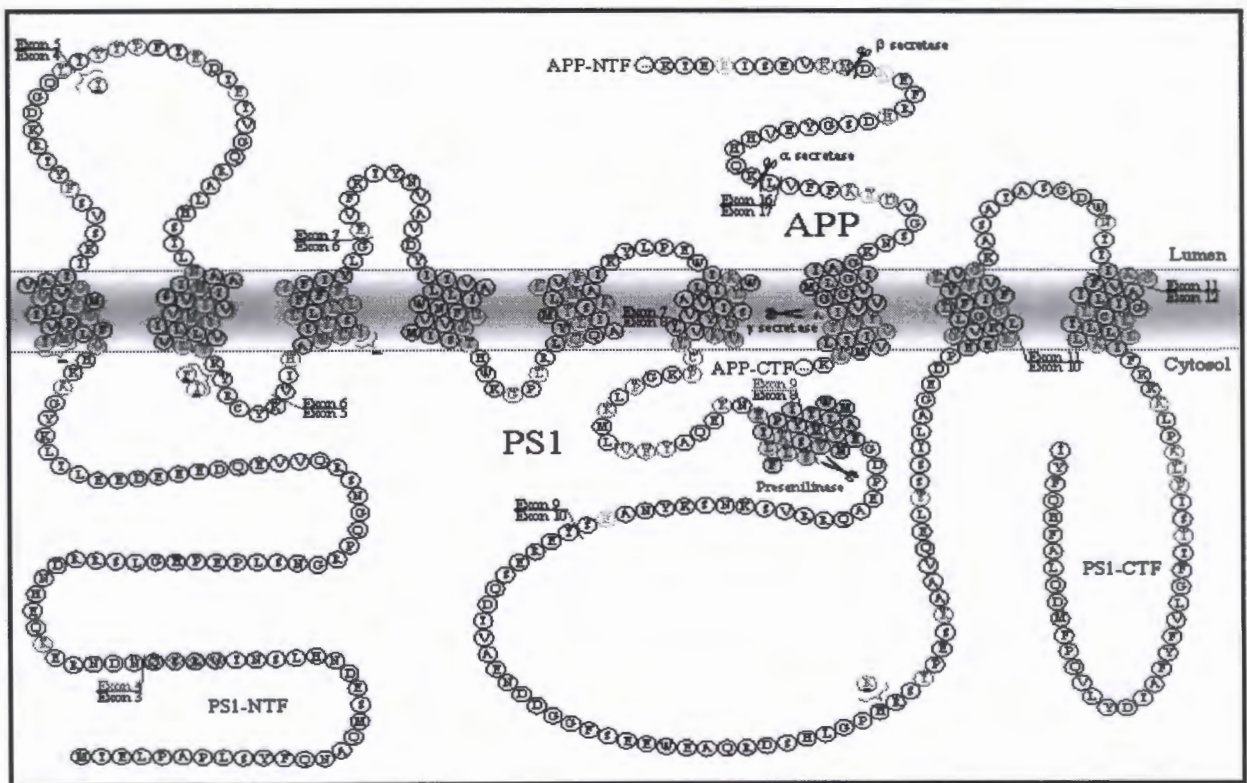


Figure 28. Structure putative de PS1

II.2.3.2-Ataxie de Friedreich

L'ataxie de Friedreich est une maladie neurologique, évolutive, rare et d'origine génétique. Ataxie signifie qu'il y a une incoordination des mouvements, due à l'atteinte du cervelet et de la sensibilité profonde et neurologique signifie qu'il y a incoordination des mouvements volontaires dans le temps et dans l'espace. Elle fut décrite en 1863 par le neurologue Allemand Nikolaus Friedreich (1825-1888) [62]. C'est une maladie autosomique récessive gravement invalidante, dont l'incidence est estimée à 1 pour 50000 dans les populations européennes, ce qui en fait la plus fréquente des ataxies héréditaires. La maladie touche indifféremment l'homme ou la femme [63].

De façon générale, il existe six situations possibles de transmission génétique (Figure 29); la couleur verte désigne l'absence d'anomalie, la partie rouge la présence d'une anomalie au niveau d'une paire chromosomique. La situation du schéma 3 est le cas le plus fréquent lorsque la maladie se déclare pour la première fois dans une famille; les parents sont dits « porteurs sains » (hétérozygotes) : chacun, sur la paire du chromosome 9, présente une partie saine et une partie touchée. Ils ne savent donc pas qu'ils sont porteurs car ils ne développent pas la maladie. Il y a donc 4 possibilités pour l'enfant : ou il hérite des 2 copies altérées du gène et il développera la maladie, il hérite d'une copie altérée du père et une copie saine de la mère, il est porteur sain, il n'a hérité d'une copie altérée de la mère et une copie saine du père, il est porteur sain, il n'a hérité d'aucun gène altéré il n'est ni malade ni porteur. Donc, à chaque grossesse, la probabilité d'avoir un enfant malade (homozygote) est de $\frac{1}{4}$, la probabilité d'avoir un enfant porteur sain est de $\frac{2}{4}$ (homozygote), celle d'avoir un enfant non porteur est de $\frac{1}{4}$. Dans la situation du schéma 1 aucun des parents n'est porteur, donc pas de risque. Dans la situation du schéma 2, un des parents est porteur, mais ne le sait pas ; à chaque grossesse, le risque d'avoir un enfant porteur est de 1 sur 2. Dans la situation du schéma 4 l'un des parents est malade puisqu'il a 2 parties touchées, et l'autre parent est sain ; à chaque grossesse, l'enfant sera porteur, mais pas malade. Dans la situation du schéma 5, l'un des parents est malade et l'autre porteur sain ; à chaque grossesse, il y a un risque sur 2 de développer la maladie et un risque sur 2 d'être porteur. Dans la situation 6, les 2 parents sont malades et chaque enfant le sera aussi.

Les premiers signes apparaissent en générale entre les âges de 5 et 15 ans qui sont généralement des pieds creux et des troubles de la marche. Cette pathologie touche d'abord le cervelet (un relais de transmission entre le cerveau et le corps) et les voies sensitives profondes [64] (Figure 30). Elle se caractérise donc par ataxie cérébelleuse avec instabilité à la marche et une difficulté de l'élocution (parole) appelé dysarthrie (91% des cas), une perte des réflexes ostéotendineux [65]. Ces signes, liés à une dégénérescence des fibres sensitives des cordons

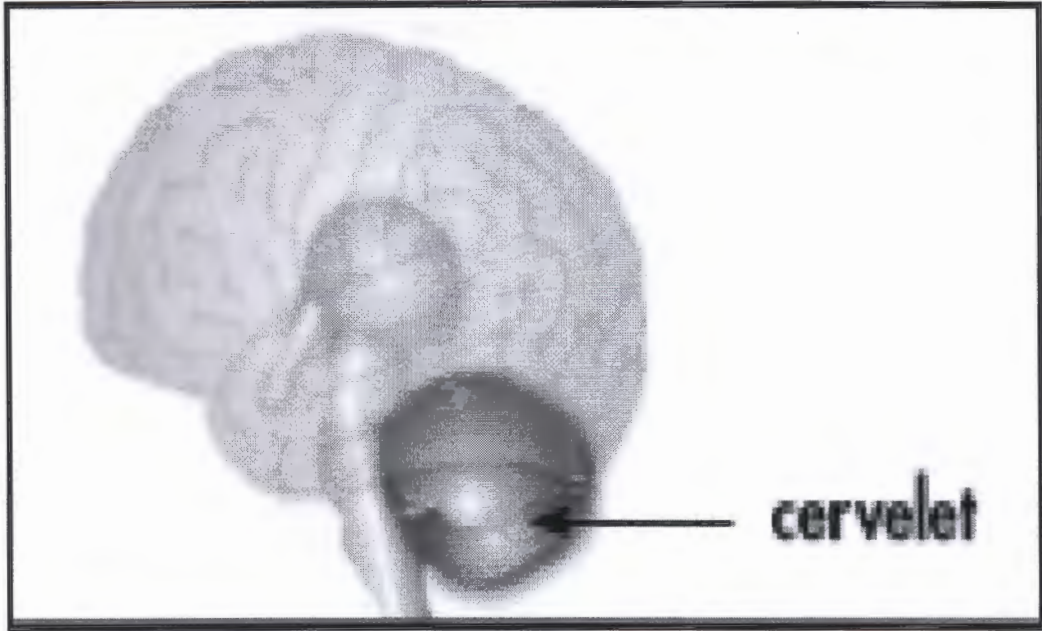


Figure 30. Ataxie de friedreich touche le cervelet (petit cerveau)

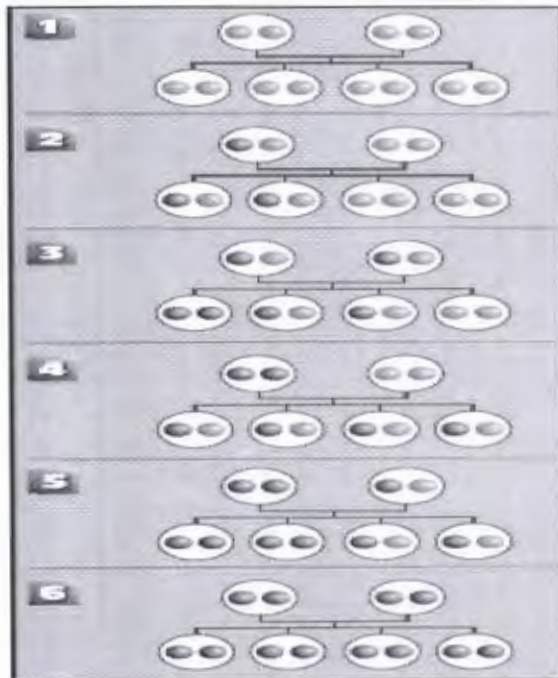
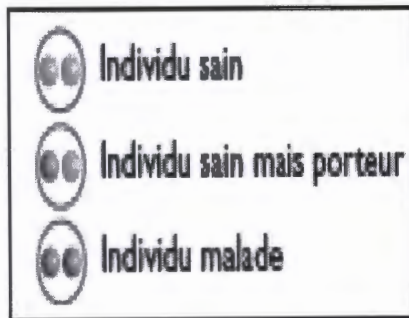


Figure 29. Différentes situations de transmission d'Ataxie de Friedreich.

postérieures de la moelle épinière, évoluent de manière progressive et entraînent la perte de la marche en moyenne vers l'âge de 20 à 30 ans (Hardy et al. 1981). Une cardiomyopathie hypertrophique (qui peut être discrète) est retrouvée dans la quasi totalité des cas; la scoliose est fréquente; enfin, les patients présentent un risque de diabète [66].

essive et entraînent la perte de la marche en moyenne vers l'âge de 20 à 30 ans (Hardy et al. 1981). Une cardiomyopathie hypertrophique (qui peut être discrète) est retrouvée dans la quasi totalité des cas; la scoliose est fréquente; enfin, les patients présentent un risque de diabète [66].

40 Kb, 5 exons) et code pour une protéine de 210 acides aminés, baptisée frataxine, donc l'ataxie de Friedreich est la conséquence d'une expansion anormale de triplets GAA dans le gène atteint qui cause une diminution très importante du transcrit de la frataxine [68].

Le rôle de la frataxine se précise mais n'est pas encore totalement connu. Elle est localisée au niveau de la membrane interne des mitochondries. Ces dernières sont présentes dans chaque cellule et sont le lieu de fabrication de carburant énergétique de la cellule, à partir de l'oxygène. Le manque de frataxine entraîne la perturbation d'une structure appelée noyau fer / soufre indispensable au bon fonctionnement de la mitochondrie, et tardivement une accumulation de fer ; tout cela entraîne la production de produits toxiques pour la cellule, appelés radicaux libres, eux-mêmes altérant le noyau fer / soufre. Une des conséquences est donc la présence trop importante de ces radicaux libres qui oxydent la cellule qui rouille et meurt. Il semble qu'une autre chaîne respiratoire extérieure à la mitochondrie soit touchée avant l'accumulation du fer dans la mitochondrie. En plus qu'il y a certains organes seraient touchés en raison probable de la richesse en mitochondries (tissu musculaire cardiaque, muscle, pancréas) [69].

Pendant longtemps, malgré les efforts fournis au niveau de la recherche médicale et la collaboration internationale des scientifiques, il n'y avait aucun moyen de traiter réellement les patients. Mais « pas de traitement curatif » ne signifiait pas « ne rien faire ». Donc l'accent doit être mis sur les traitements symptomatiques visant à éviter les complications notamment cardiaques et à conserver une qualité de vie la meilleure possible. Une prise en charge par kinésithérapie, orthophonie et ergothérapie permet d'utiliser au mieux les potentiels existants. Lutter contre la scoliose est indispensable afin de préserver la position assise et la fonction respiratoire. Le diabète nécessite un traitement spécifique. Certains traitements pharmacologiques permettent de lutter contre les contractures. Les exarques, la constipation, les infections urinaires, les précurseurs de la sérotonine ont été proposés pour améliorer l'ataxie

cérébelleuse .L'usage de certains antibiotique est déconseillé (pénicilline, phénicolé aminosides, sulfamides), de mémé que les curarisant. Des aides technique performants sont utilise pour assurer une autonomie relative fauteul roulant électrique. Verticalisateur, appareils d'aide à la communication.

II.2.3.3- Maladie de Huntington

Traditionnellement la maladie de Huntington a été appelée « la chorée de Huntington ». Cette maladie a été décrite pour la première fois en 1872, par le Dr George Huntington. Cette découverte est devenu notoire et est connu sous le nom de chorée de Huntington. Le mot chorée provient d'un mot grec signifiant « danse », en référence aux mouvements non contrôlés de la maladie. Le gène responsable de la maladie a été localisé sur le chromosome 4 en 1983 et cloné en 1993. La maladie de Huntington est une maladie héréditaire (génétique) se transmet de façon autosomique dominante, due à une dégénérescence entraînant une atrophie du cortex cérébral et des ganglions de la base (zone située à l'intérieur de la substance blanche du cerveau) [70], elle infecte environ une personne sur 10 000. Les premiers symptômes neuropathologiques apparaissent vers 30 à 50 ans, les neurones dégènèrent de façon irrémédiable, ce qui se traduit par des mouvements anormaux, accompagnés de troubles pseudo- psychiatrique, avec tendance suicidaire, puis la démence s'installe dans un délai de dix à vingt ans [71].

La maladie se développe si une anomalie du gène IT-15 se produit, si une partie particulière de la séquence de l'ADN du gène se répète un nombre de fois d'une façon anormale, une personne développera la chorée de Huntington [72]. La séquence répétée responsable de la maladie (CAG) apparaît 35 fois ou moins chez individus normaux et plus de 40 fois (Figure 31) chez les personnes atteintes du gène de Huntington (IT-15) est lié à l'âge (Figure 32). Plus le nombre de répétitions est élevé, plus la maladie commencera à un plus jeune age [73]. Des mutation du gène HDL-2 (Huntington Disease Like 2) ou du gène PRP (Prion Related protein) sont responsables de l'anomalie d'une protéine : La Huntingtine [74]. Un exemple de transmission de CH cette protéine anormale s'accumule dans le noyau des cellules nerveuses, entraînant leur mort prématurée (Figure 33).

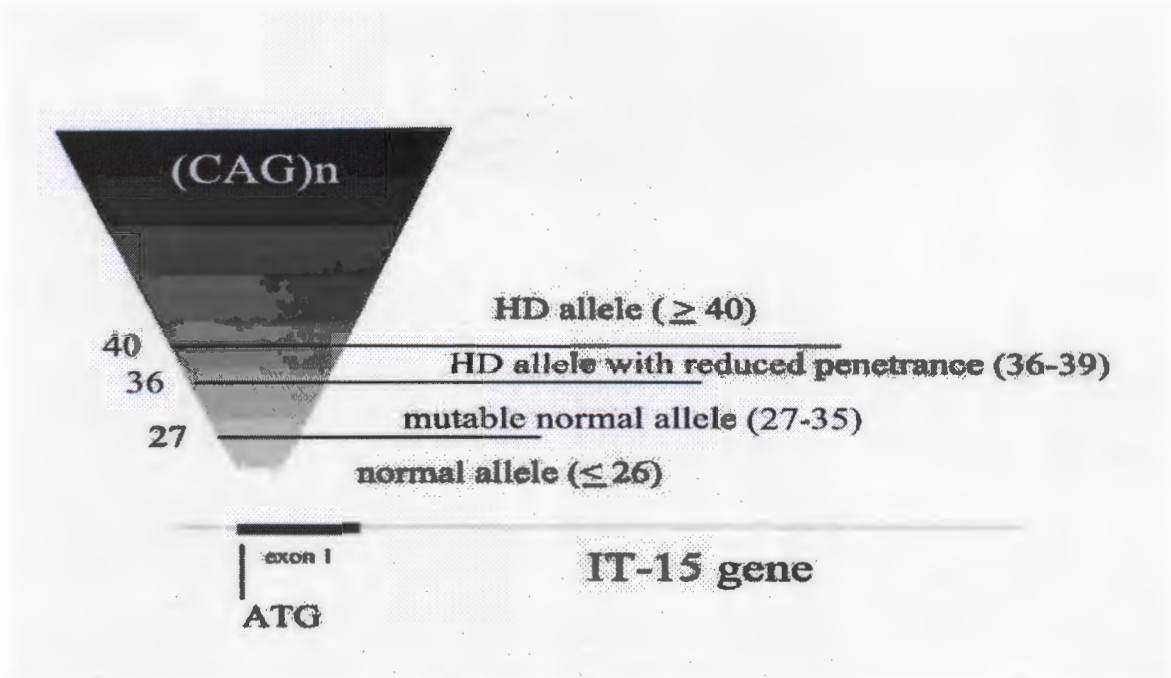


Figure 31. Diagramme du gène *IT-15* et l'endroit de la répétition polymorphe de CAG dans l'exon 1. Les frontières dénotent des catégories et des descripteurs de longueur de répétition de CAG.

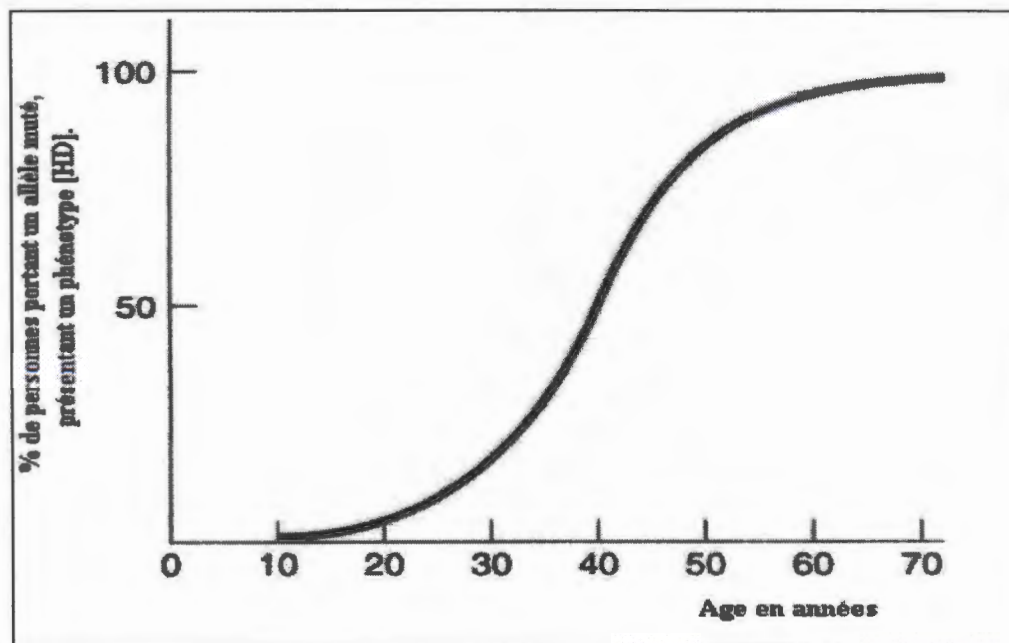


Figure 32. Age où la maladie se déclare chez un sujet porteur d'un allèle défectueux : plus le nombre de répétition est élevé plus la maladie commencera à un plus jeune âge.

La Huntingtine normale possède des propriétés anti-apoptotiques et de l'émergence du rôle de la huntingtine dans le transport intracellulaire, elle pourrait avoir une fonction importante dans le contrôle du trafic intracellulaire de facteurs neurotrophiques, elle est intéressée au BDNF « brain-derived neurotrophic factor », la huntingtine stimule le transport des vésicules contenant du BDNF. La stimulation du transport de BDNF par la huntingtine fait intervenir un complexe constitué de la huntingtin-associated protein-1 « HAP1 » et de la sous-unité P150^{Glued} de la dynactine. Cette fonction de la huntingtine est perdue lorsque celle-ci contient une expansion anormale de glutamines, cette perte de fonction est associée à un détachement des microtubules d'un complexe contenant la huntingtine-polyQ, HAP1 et P150^{Glued}.

Les personnes atteintes de la maladie présentent des symptômes d'ordre phénotypique, (c'est à dire au niveau de l'organisme) quelques années après le début de la maladie. Les malades ont des mouvements involontaires, les malades donnent l'impression de danser, d'où l'appellation : « chorée de Huntington », il y a d'autres signes d'ordre neuropsychiatriques, les malades présentent des troubles caractériels, touchent l'humeur et la personnalité. Au niveau organique, la maladie agit de manière dégénérative sur les cellules du système nerveux central. Cela se traduit par une perte neuronale (des neurones) dans des zones cérébrales précises, notamment le striatum (putamen), il s'agit de la zone vide dans la coupe du cerveau dans la (figure 34). La dégénérescence des cellules nerveuses est due à un désordre moléculaire, le gène responsable de la maladie de Huntington a une région dans laquelle une séquence de trois bases (triplet CAG) est répétée de nombreuses fois.

Le triplet CAG code la glutamine, normalement, ce triplet est répété 6 à 31 fois, on sait qu'au delà de 35 répétition la maladie sera contractée, mais chez la plupart des malades, on observe beaucoup plus de répétition de ce même triplet (chez les personnes atteintes de la maladie de Huntington, le triplet est répété 36 à 121 fois) [75]. Pour le traitement, il comporte des neuroleptiques (dérivés de la phénothiazine, butyrophénones) pouvant être utilisés chez les patients très agités, très récemment, la greffe de neurones semble apporter un espoir de traitement en ce qui concerne la maladie de Huntington.

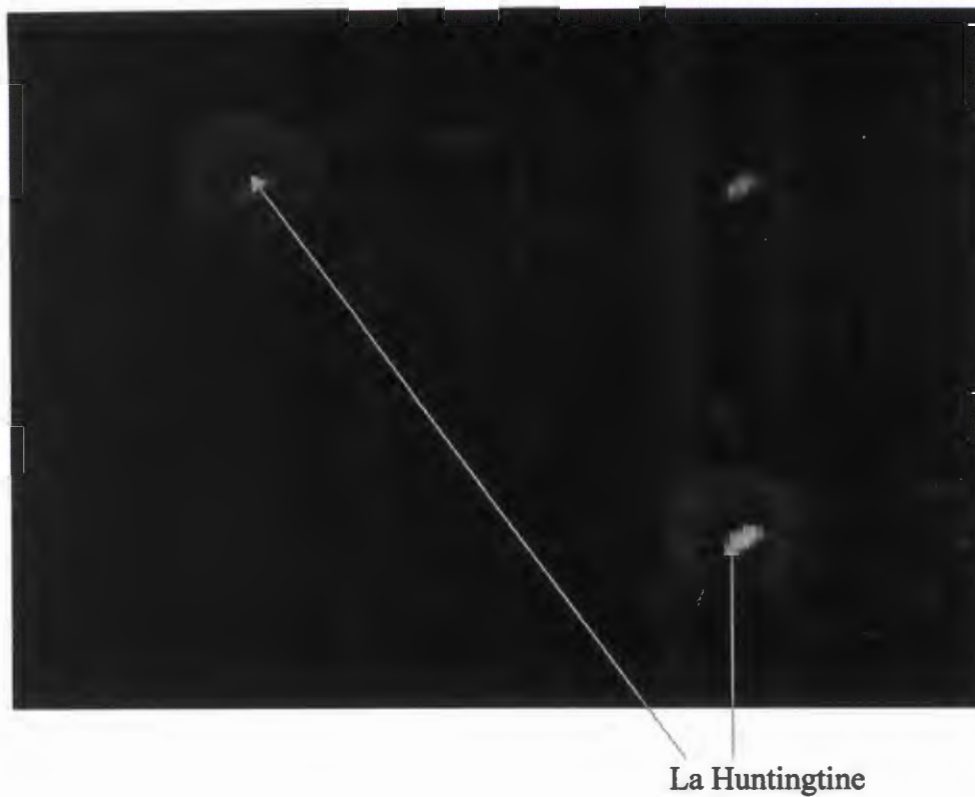


Figure 33. L'accumulation de la Huntingtine dans les noyaux des neurones sous-formes d'inclusions intranucléaires.

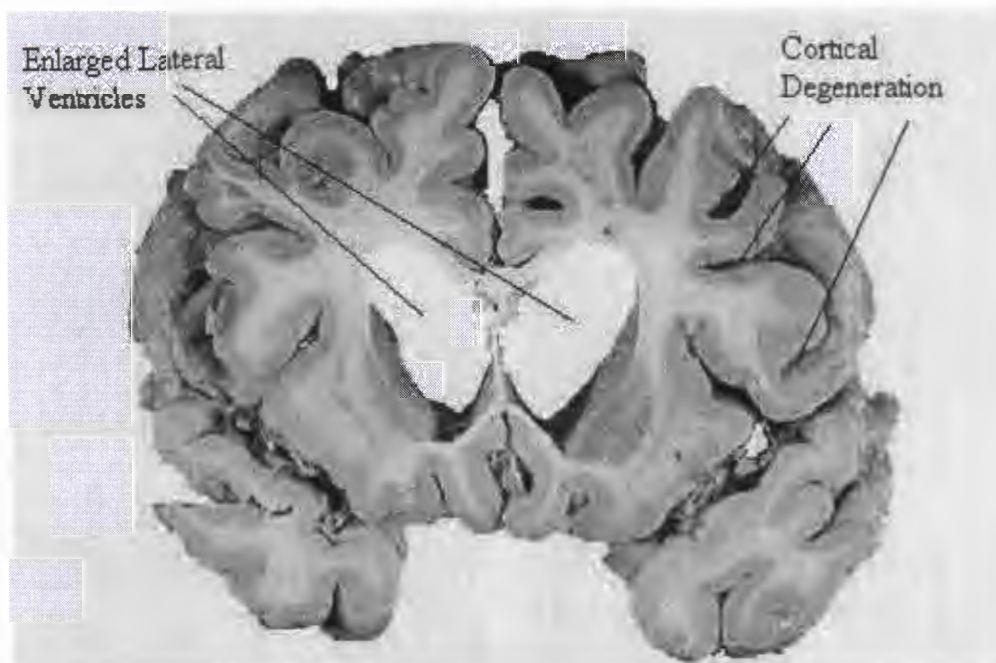


Figure 34. La perte des neurones dans la maladie de Huntington.

Chapitre III

Diagnostic moléculaire des maladies héréditaires

III.1- Introduction

Le traitement des maladies héréditaires a longtemps été le parent pauvre du reste de la médecine à cause des difficultés d'analyses, de diagnostic (dans certains cas) et du peu de solution à offrir aux patients (pour beaucoup des pathologies). Pendant longtemps, la médecine n'a pas disposé de moyens d'analyse et de diagnostic en dehors des symptômes extérieurement observables (quoique parfois très visibles). Le XX^e siècle a apporté la capacité relativement accessible d'analyser ces maladies sur leurs causes par la connaissance pratique du génome. L'identification progressive de gènes impliqués dans le déclenchement ou la transmission des maladies héréditaires a offert à la médecine la possibilité de fournir un diagnostic précoce et fiables (éventuellement avant la naissance d'un enfant ou antérieurement à l'implantation lors d'une fécondation in vitro, par exemple) cette capacité de diagnostic a profondément transformé la manière d'envisager de donner la vie pour des couples susceptibles de transmettre une affection à caractère héréditaire. Dans la plupart des cas, la détection précoce et rapide de la maladie augmente les chances de réussite du traitement avant la phase de l'apparition des symptômes. Si de nombreuses maladies héréditaires disposent d'un traitement approprié des symptômes, ce n'est pas le cas de toutes. Dans le cas général, la présence de la cause dans le génome complique singulièrement la tâche du praticien.

On offre la possibilité de procéder à un diagnostic génétique prénatal lorsque les parents sont des porteurs connus, diagnostiqués ou malades : l'analyse de l'ADN des cellules fœtales, suivant l'application de plusieurs techniques de l'amplification de cet ADN ces techniques sont fondées sur la technologie de PCR (Polymerase Chain Reaction) puisque celle-ci est la plus efficace et la plus avancée pour être cette méthode de l'amplification de l'ADN, de sorte à identifier les altérations (mutations) de la séquence d'ADN liées à la maladie ou à l'augmentation des risques de développement d'une maladie. La PCR est spécialisée dans le diagnostic d'un bon nombre des maladies héréditaires à forte incidence et /ou à pronostic grave.

III.2- Technique de PCR (Polymerase chain reaction)

La PCR (polymerase chain reaction) a profondément marqué la biologie moléculaire, cette réaction est simple à réaliser et très rapidement dans les laboratoires [29]. Avant la découverte de la méthode de PCR, l'amplification de l'ADN est effectuée par le clonage, en utilisant donc des bactéries. Dans la méthode de la PCR, il s'agit d'une implication enzymatique in vitro [76]. Elle permet d'amplifier une courte séquence d'ADN spécifiques un nombre considérable de fois [29]. Cette séquence d'ADN est appelée séquence cible, à partir d'une infime quantité d'ADN génomique. Elle est même possible à partir de l'ADN génomique issu

d'une cellule unique, ce qui rend possible le diagnostic pré-implantatoire. Elle est réalisée dans un tube à essai en quelques heures. Publiée en 1985 par R.Saiki, elle a révolutionné le diagnostic moléculaire des maladies génétiques comme bien d'autres domaines.

Le taux de multiplication (ou taux d'amplification) est tel que la réaction revient à rendre négligeable le reste du génome qui n'a pas été amplifié car le produit de PCR contient presque exclusivement des millions d'exemplaires de la séquence cible. Il est donc facilement analysable par exemple sur un gel d'électrophorèse en fluorescence UV sans avoir à rechercher spécifiquement la séquence cible par hybridation moléculaire comme c'était le cas auparavant (technique de southern). La PCR est utilisée dans la très vaste majorité des diagnostics moléculaires.

L'identification des séquences a été considérablement facilitée par l'introduction de la PCR, celle-ci permet d'amplifier de manière spécifique un fragment d'ADN, à condition que l'échantillon initial contienne au moins une copie de la séquence recherchée. Si les amorces utilisées sont suffisamment spécifiques de la séquence considérée, l'amplification par PCR, qui produit en outre un fragment caractérisable par sa taille, équivaut en général à une identification. Il n'y a donc plus nécessité de disposer d'une sonde clonée. Comme le contenu du produit d'amplification peut être caractérisé par des critères additionnels (hybridation, analyse de restriction), d'éventuels problèmes de spécificité sont pratiquement toujours surmontés [77].

III.2.1- Principe et étapes de PCR

La séquence cible est multipliée par synthèses successives à l'aide d'une enzyme, l'ADN polymérase thermostable qui ne pouvait pas synthétiser un brin complémentaire d'ADN qu'à partir d'une amorce, et deux types d'amorces (oligonucléotides) spécifiques aux extrémités 5' (sens) et 3' (antisens) [77] longues de 17 à 30 nucléotides, qui encadrent la séquence à amplifier. Les amorces s'hybrident avec les brins complémentaires de l'ADN après qu'il ait été dénaturé, et elles sont orientées de telle sorte que l'ADN polymérase synthétise la région d'ADN qu'elles encadrent [29]. La PCR repose sur une réaction d'amplification cyclique et chaque cycle est réalisé en trois étapes indispensables pour toute synthèse d'ADN (figure 35), ces étapes sont la dénaturation, l'hybridation et la synthèse. Ces trois étapes représentent un cycle et on peut répéter autant de fois que nécessaire ce cycle. La répétition des cycles, assure une duplication exponentielle de chaque brin (le cycle dénaturation / hybridation/ synthèse et en général répété de 20 à 40 fois, ce qui correspond en principe à une amplification par un facteur de 2^{20} à 2^{40}) (Figure 36).

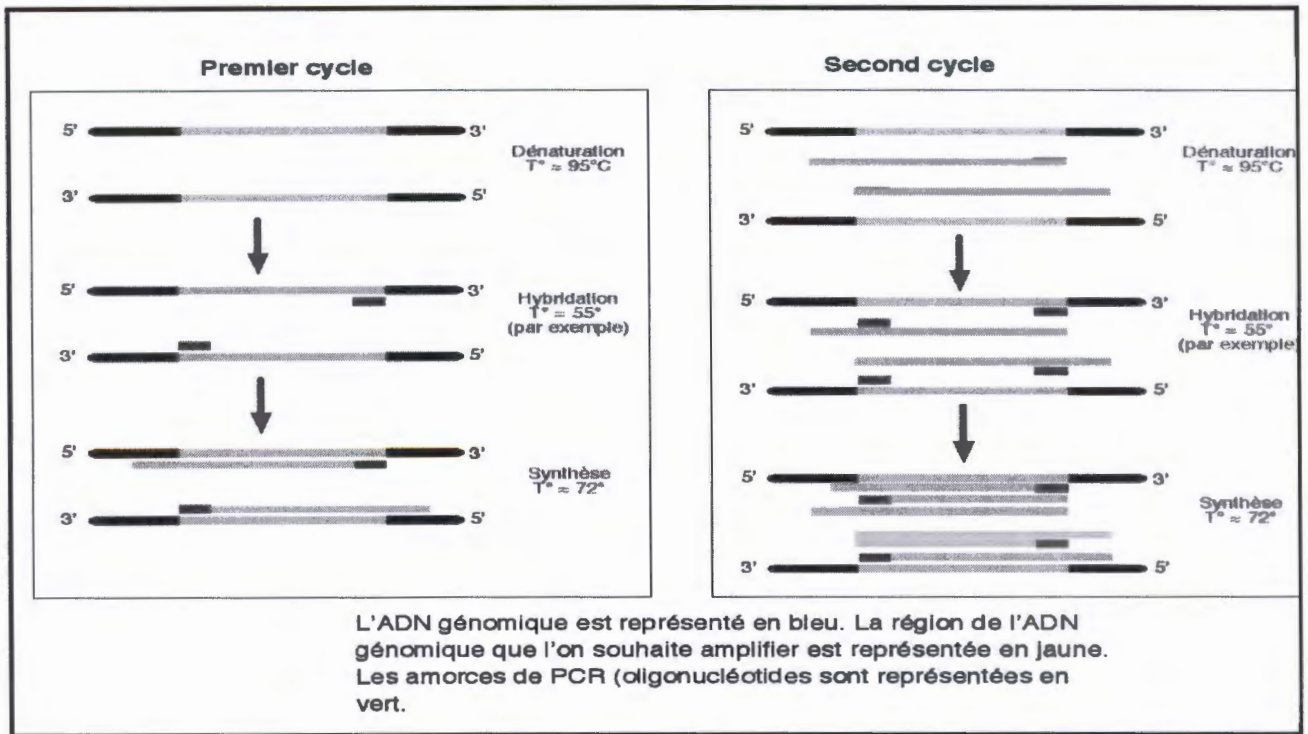


Figure 35. Principe de la PCR .

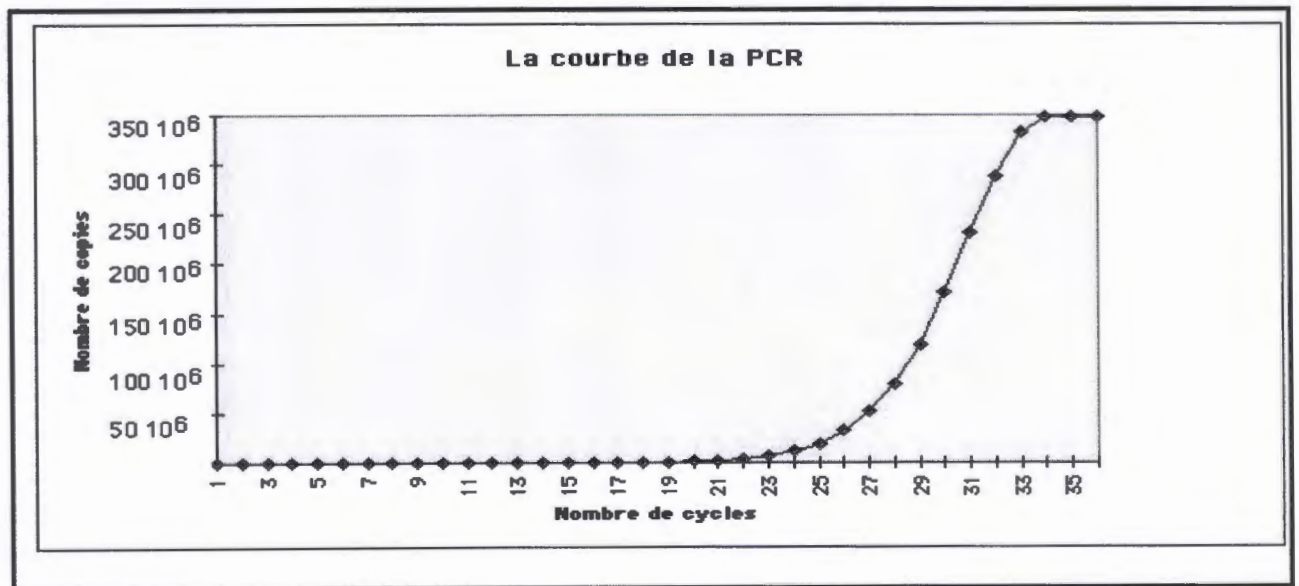


Figure 36. La courbe de la PCR : la courbe de la PCR, la répétition des cycles assure une duplication exponentielle de chaque bras (en générale répété 20 à 40 fois ce qui correspond en principe à une amplification par un facteur de 2^{20} à 2^{40} .

III.2.2- Réalisation d'une réaction de PCR

Le milieu réactionnel doit contenir : L'ADN contenant la séquence à amplifier ; il peut s'agir de l'ADN génomique d'un patient pour lequel on cherche à réaliser le diagnostic moléculaire d'une maladie génétique d'ADN plasmidique contenant une séquence d'intérêt, les deux amorces oligonucléotidiques mono-brins complémentaires chacune des extrémités du fragment à amplifier, des désoxynucléotides libres d'ATP, dCTP, dGTP, dTTP qui sont incorporables pour former le brin d'ADN néosynthétisé, l'enzyme permettant la synthèse d'un néobrin à partir des amorces; il s'agit d'une ADN polymérase thermostable, par exemple la Taq ADN polymérase issue du micro-organisme thermus Aquaticus, du MgCl₂ et une solution donnant au milieu réactionnel un PH et une concentration saline optimale pour le fonctionnement de l'enzyme.

Le tube contenant le milieu réactionnel est placé dans un appareil appelé « thermocycleur », sorte de plaque chauffante programmable en temps et en température et disposant de montée et de descente en température extrêmement courts. Il délivre à chaque instant au milieu réactionnel une température donnée permettant la réalisation de l'une des trois étapes du cycle de PCR : dénaturation hybridation ou synthèse. La PCR suppose la synthèse chimique de deux oligonucléotides utilisés pour l'amorçage. Il est néanmoins possible de contourner le problème en clonant le fragment dont la séquence est totalement inconnue dans un vecteur (plasmide, bactériophage...) afin d'utiliser la séquence (connue) du vecteur pour amorcer la réaction de PCR. L'avantage de cette méthode par rapport à la multiplication par clonage est sa simplicité et sa rapidité. La taille du fragment à amplifier ne peut pas dépasser quelques Kilo bases, au-delà, il se produit des phénomènes qui empêchent la réaction de se faire normalement : interruptions prématurées dues à la formation de structures secondaires, rapprochement des fragments néosynthétisés entre eux ...etc.

Pour un certain nombre de cycles, le taux d'amplification baisse progressivement pour tendre vers 1, ceci est dû à une diminution de la concentration des désoxynucléotides et des oligonucléotides et à l'augmentation de la concentration du produit de PCR [76]. La spécificité de la PCR dépend de façon critique des amorces, ces dernières doivent avoir une longueur comprise entre 17 et 30 nucléotides, un contenu en GC de 50% est idéal pour éviter des températures de fusion trop basses, des séquences contenant de longues répétitions d'un même nucléotide (c'est-à-dire plus de trois ou quatre d'affilée) doivent être évitées, des amorces susceptibles de former des structures secondaires sont inutilisables, les deux amorces ne doivent pas présenter de complémentarité de séquence.

Une PCR commence généralement par un démarrage à chaud (hot start), Ce la veut dire que l'ADN polymérase est ajoutée après l'étape de dénaturation thermique du premier cycle, à une température correspondante à celle l'hybridation voire supérieure à celle-ci, et juste avant l'étape d'hybridation. Le démarrage à chaud évite le problème qui pourrait résulter de l'addition de l'ADN polymérase quand le mélange réactionnel se trouve à une température plus basse. En effet, à des températures inférieurs à la température d'hybridation de l'amorce (typiquement entre 45 et 60°C), des appariements incorrects peuvent se produire et amorces l'élongation par la polymérase. Une autre approche consiste à rendre la polymérase inactive à température ambiante, par exemple en utilisant des anticorps contre la polymérase Taq, qui sont inactivés quand la température s'élève, ou encore à utiliser l'Ampli Taq Gold™, une polymérase Taq modifiée qui n'est active qu'après chauffage à 95°C [29].

III.2.3- Variantes de PCR

La PCR a plusieurs variantes, on peut cité : La technique de RT- PCR, celle-ci est une technique qui associe une RT suivie d'une PCR. Elle permet de pouvoir séquencer, cloner ou mesurer un transcrit généralement très faiblement représenté. La RT est un enzyme qui va transcrire l'ARN en ADN afin d'utiliser ce dernier en PCR. On a aussi la PCR multiplexe (multiplex PCR), c'est un protocole destiné à amplifier plus d'un amplicon à la fois, généralement en ajoutant un couple d'amorces par type désiré, les produits de PCR ne seront alors compétitifs que pour la polymérase, les dNTP et éventuellement, le marqueur d'ADN, il est également possible d'amplifier différents types d'ADN reconnus par un même couple d'amorces, tels les mimics. La PCR multiplexe peut se faire en point final (les produits de PCR étant usuellement différenciés par leur taille ou la présence d'un site de restriction) ou en temps réel (chaque produit étant mesuré par une sonde spécifique couplée à un fluorophore dont le spectre d'émission est différent des autres). Ses applications qualitatives sont nombreuses (détection de souche virale, de mutation,...) mais son aspect quantitatif ne fait pas l'unanimité, malgré de fortes pressions industrielle pour ce marché très lucratif. Il y a la PCR quantitative (q-PCR quantitative PCR), permet d'obtenir des résultats quantitatifs sur la quantité d'ADN initiale. Ce terme est aussi employé de manière abusive pour désigner la PCR en temps réel, car il est très difficile de pouvoir obtenir un résultat autre que qualitatif ou semi-quantitatif en PCR en point final, mais c'est faire abstraction de certaines expériences en PCR compétitive ou PCR radioactive. On peut cité encore la Gap – PCR, elle est utilisée dans la détection des gènes alpha et bêta.

III.3- Quelques exemples de diagnostic des maladies héréditaires

III.3.1- Mucoviscidose

En 1999 plus de 800 mutations ont été isolées, mais la plus fréquente delta F 508 (DF508) qui présente chez 70 % des malades, cette mutation due à une délétion de 3 nucléotides aboutissant à l'élimination de la phénylalanine en position 508 [78].

Les anomalies ont des conséquences variables sur la protéine CFTR et sa fonction. Une classification de ces anomalies par rapport à la fonction canal Cl^- a été proposée dont il y a plusieurs classes (Figure 37) : mutations altérant la production de la protéine, mutations perturbant le processus de maturation cellulaire de la protéine, mutation perturbant la régulation du canal Cl^- , mutation altérant la conduction du canal Cl^- , mutation altérant la stabilité de l'ARN_m CFTR et mutation altérant la stabilité de la protéine mature.

A partir de ces mutations la mucoviscidose va résulter, pour cela on fait le diagnostic, c'est possible pour les couples hétérozygotes repérés par la naissance d'un enfant atteint ou le risque de récurrence est alors de $\frac{1}{4}$ (affection autosomique récessive). Néanmoins, le généticien est de plus en plus conforté à la demande de couples à risque faible, notamment lorsqu'il s'agit de fratrie de parents d'enfants atteints. Actuellement, compte tenu de sa précocité, mais aussi de sa meilleure fiabilité, le diagnostic anténatal par procédés de la biologie moléculaire à partir d'un prélèvement de villosités chorales à la 10^e semaine d'aménorrhée est utilisé de préférence à celui par l'étude des enzymes digestives dans le liquide amniotique à 18 semaines d'aménorrhée. L'identification des mutations les plus couramment rencontrées permet le plus souvent un diagnostic direct. Le diagnostic anténatal par biologie moléculaire à l'aide de la technique OLA doit être alors précédé d'une étude familiale de l'ADN, celle-ci devant avoir lieu avant la grossesse ou à son tout début pour en connaître les résultats avant la date du diagnostic foetal; la recherche des mutations est effectuée parallèlement chez le fœtus [79].

La technique d'OLA est plus récente permet de tester simultanément un plus grand nombre de mutations du fait de la lecture automatisée de la taille des fragments obtenus par lecture à travers une fenêtre de passage dans séquenceur automatique. Dans une première étape, on réalise une PCR multiplexe de plusieurs segments du gène sur lesquels on souhaite tester la présence d'une mutation (15 segments dans le gène impliqué dans la mucoviscidose). Dans une deuxième étape, au sein du tube de PCR, on réalise plusieurs cycles de ligation avec une ligase thermostable et des amorces permettant de tester l'absence ou la présence de la mutation.

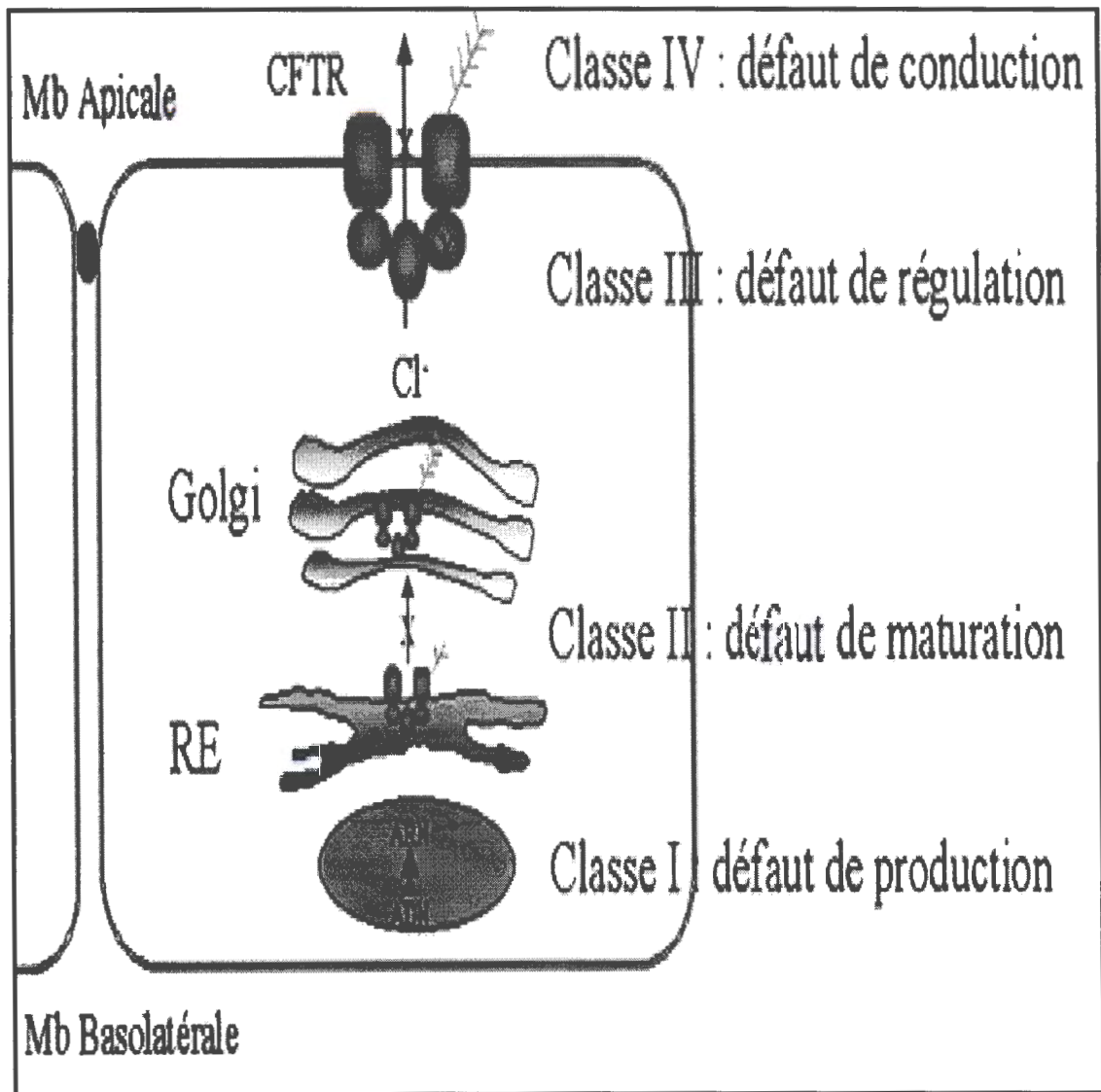


Figure 37. Classification des mutations du gène CFTR.

Le principe du test de ligation est le suivant : pour toute mutation ponctuelle testée on définit pour un même brin, d'un côté une amorce commune (porteuse d'un fluorochrome) et, de l'autre côté, deux amorces capables de s'hybrider sur brin, de manière adjacente à l'amorce commune. ces deux amorces diffèrent par leur nucléotide en 5' , l'un correspondant au site standard et l'autre au site e muté ; par ailleurs, les deux amorces adjacentes, standard et mutée, sont respectivement porteuses d'une queue polyN et d'une queue polyN' de taille différente.

Si la séquence du brin testé est standard (non muté), l'amorce standard pourra s'hybrider normalement alors que l'amorce mutée ne pourra le faire et la ligase pourra lier les deux amorces et former un brin d'une certaine longueur. Si le brin est muté, l'amorce commune sera liée à l'amorce mutée générant un brin d'une longueur différente. Une série de n cycles dénaturation/ amorçage/ ligation permettra d'obtenir une grande quantité de fragments de ligation. L'ensemble sera mis en électrophorèse, en général dans un capillaire, et les fragments migreront en fonction de leur taille pour passer devant une fenêtre laser qui captera l'émission du fluorochrome; la comigration d'un marqueur de taille porteur d'un marquage spécifique permet de déduire la taille des fragments fluorescents se présentant devant la fenêtre laser, puis d'en déduire, en fonction de cette taille, l'absence ou la présence de la mutation testée (fragment de ligation dont la taille est égale à la somme des tailles de l'amorce commune et de l'amorce adjacente standard ou mutée). Tous les fragments standard et tous les fragments mutés ont évidemment des tailles différentes (Figure 38).

III.3.2- Hémochromatose

Il est possible d'identifier facilement les mutations C282Y et H63D du gène HFE. Bien que plusieurs méthodes existent, la plus fréquente consiste à isoler l'ADN soit à partir d'un prélèvement sanguin ou d'un frottis buccal. L'ADN isolé est soumis à la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) qui permettra l'amplification des régions où sont situées les mutations du gène HFE [25]. Par la suite, la détection de la mutation se fera par la digestion enzymatique de l'ADN amplifié avec des enzymes de restriction qui couperont l'ADN en fonction de la présence ou de l'absence de la mutation. La migration sur gel d'agarose de l'ADN amplifié et digéré générera un patron de bandes de différents poids moléculaires à partir duquel il sera possible d'établir le génotype HFE. Cette analyse est peu coûteuse et est disponible à la fois dans le réseau public et privé. Les laboratoires réalisant ces tests doivent détenir les licences et brevets appropriés [25].

La mutation C282Y localisée dans l'exon 4 du gène HFE, elle crée un site de coupure pour l'enzyme de restriction Rsa. Une séquence de l'exon 4 recouvrant le site de la mutation est amplifiée par PCR à l'aide d'amorces situées de part et d'autre de cette région d'intérêt.

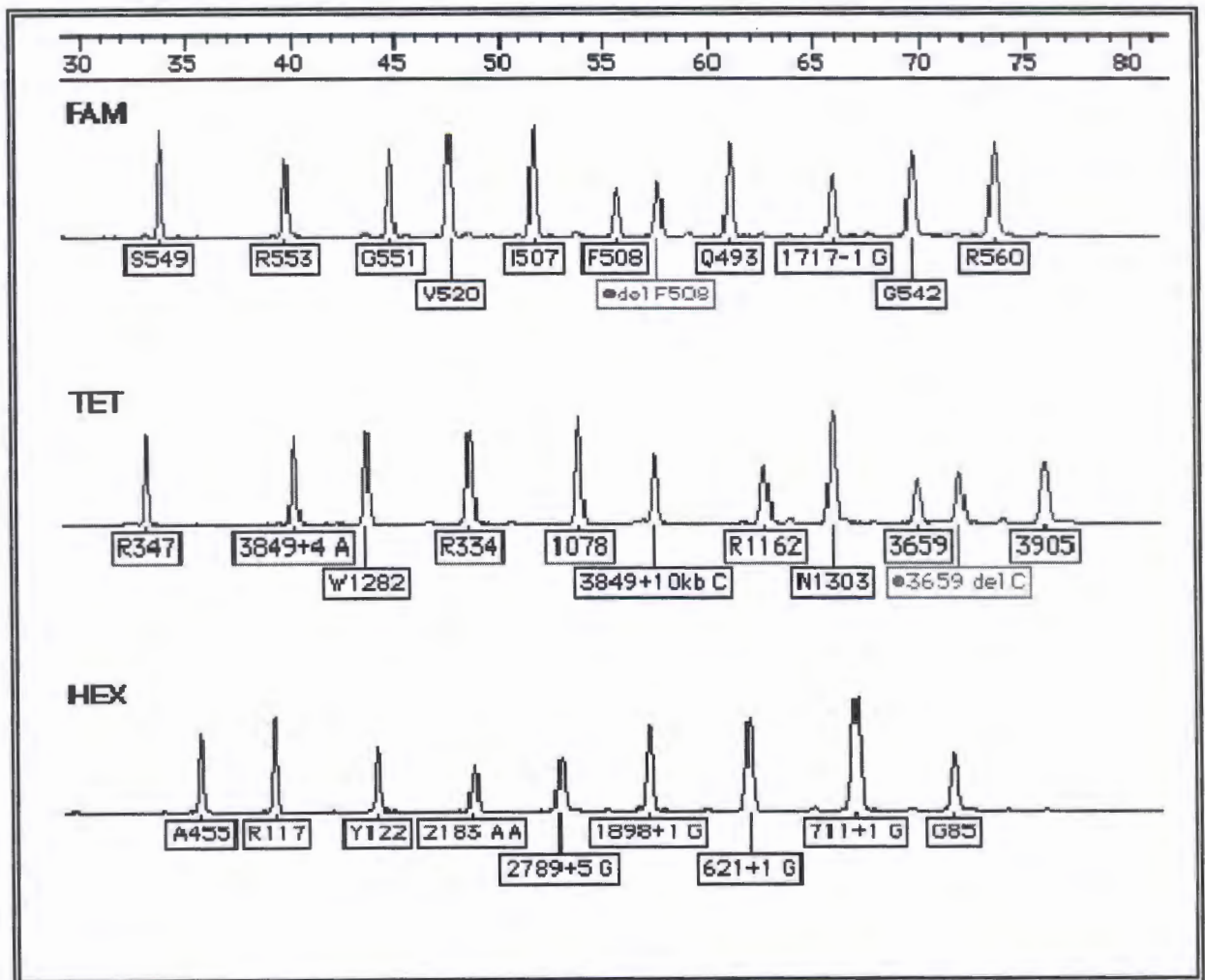


Figure 38. Application de la technique OLA pour la recherche des principales mutations du gène CF de la mucoviscidose.

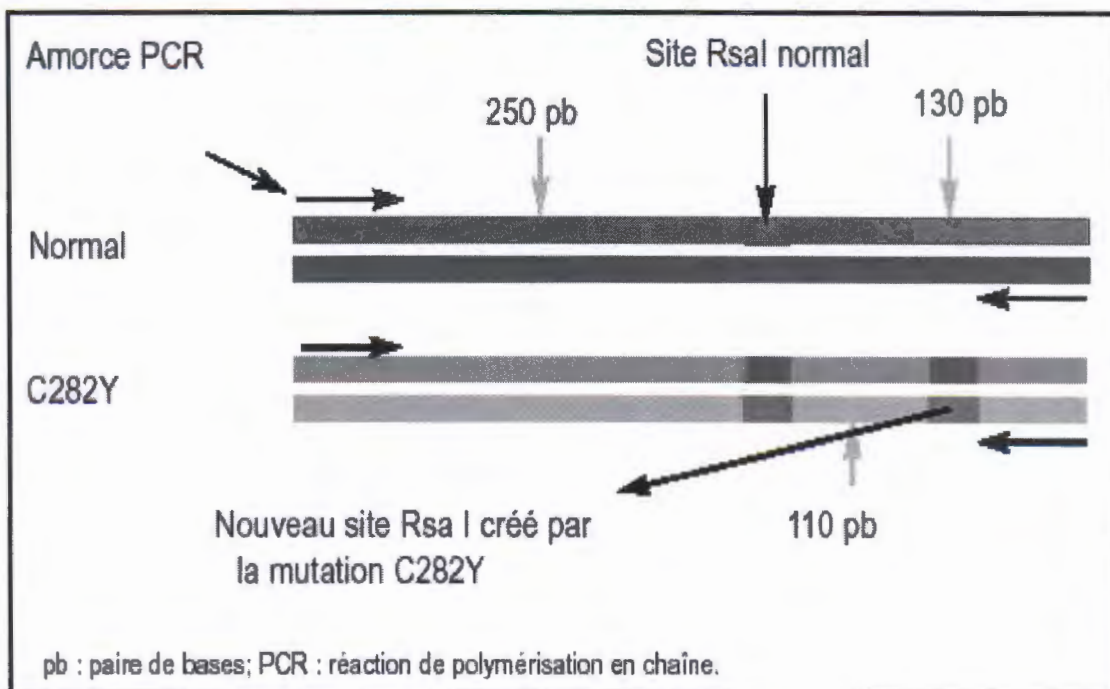


Figure 39. Le génotypage HFE par la réaction de polymérisation en chaîne, mutation C282Y. Le principe est l'amplification de la réaction de polymérisation en chaîne d'une région de 380 pb qui inclue le site de la mutation à la position 845. Digestion enzymatique des amplicons avec le RsaI.

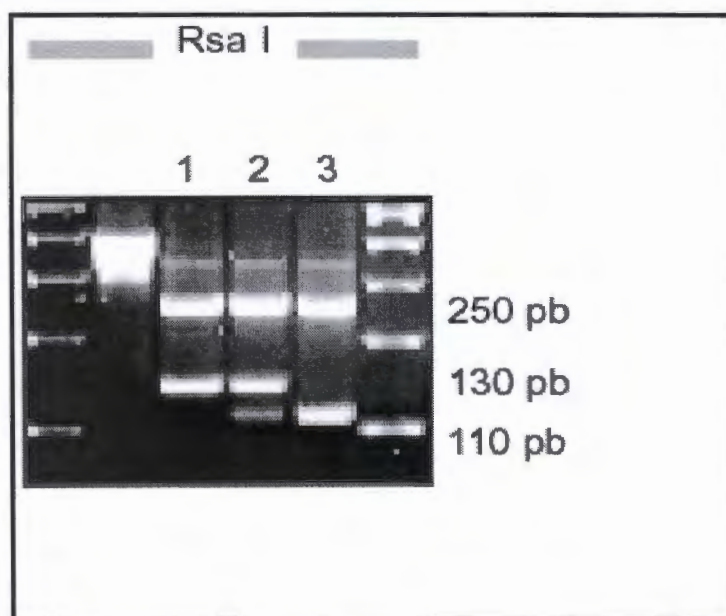


Figure 40. Electrophorèse sur gel d'agarose de la mutation C282Y (HFE). Le patron de la bande indique le génotype de la maladie. La piste 1 : génotype normale ; la piste 2 : état hétérozygote C282Y (porteur) ; la piste 3 état homozygote C282Y (hémochromatose).

L'amplimère correspondant à l'allèle normal (387 Pb) présente un site de restriction unique pour l'enzyme de restriction Rsa en position en position 247 ; l'allèle muté présente un site Rsa supplémentaire .après PCR, l'amplimère généré est soumis à l'action de Rsa et l'analyse du profil de restriction définir le génotype du sujet [80] (Figure 39 et 40). La mutation H63D est localisée dans l'exon 2 du gène HFE, aboutit un site de restriction pour l'enzyme Mbo. Une séquence génomique de 208 Pb recouvrant le site de la mutation est amplifiée par PCR et soumise à une digestion par l'enzyme Mbo 1. Un allèle normal donnera deux fragments de 138 et 70 Pb, alors que l'allèle muté aura la même taille que l'amplimère, soit 208 pb [80].

III.3.3- Drépanocytose

La mutation drépanocytaire conduit à la suppression d'un site de l'enzyme de restriction BsuI. il est donc possible de détecter la présence ou l'absence de la mutation par l'utilisation de cette enzyme. En pratique, la région contenant ce site de restriction est amplifiée par PCR à partir de l'ADN génomique du patient à tester. Le produit de PCR est ensuite mis en présence de l'enzyme BSuI [81]. Le produit de digestion est finalement déposé sur un gel d'électrophorèse afin de séparer les fragments selon leurs tailles. Dans le cas où la mutation est présente (allèle β^S), le site de restriction est supprimé et le fragment d'ADN donc plus long [82]. Un second site de restriction BSUI, constant, sert de contrôle de digestion : l'absence du fragment C ou la présence d'un fragment de taille inattendue signifie que l'enzyme n'a pas fonctionné ou a fonctionné incomplètement, ce qui évidemment peut fausser le résultat du diagnostic (Figure 41) [81].

En fin la technique de la "gap-PCR" sert à identifier des mutations ou provoquées par des délétions plus ou moins étendues de β -thalassémie. Les sondes sont construites de façon à être complémentaires des frontières de la délétion et d'amplifier ainsi un fragment spécifique à la délétion. Plusieurs délétions β - thalassémiques sont aujourd'hui détectables par cette méthode (Figure 42).

III.3.4- Syndrome de l'X fragile

La découverte de la mutation responsable du syndrome X fragile a profondément transformé les possibilités du diagnostic de la maladie et son conseil génétique, en permettant une détection totalement fiable des personnes à risque de la transmettre et le diagnostic prénatal

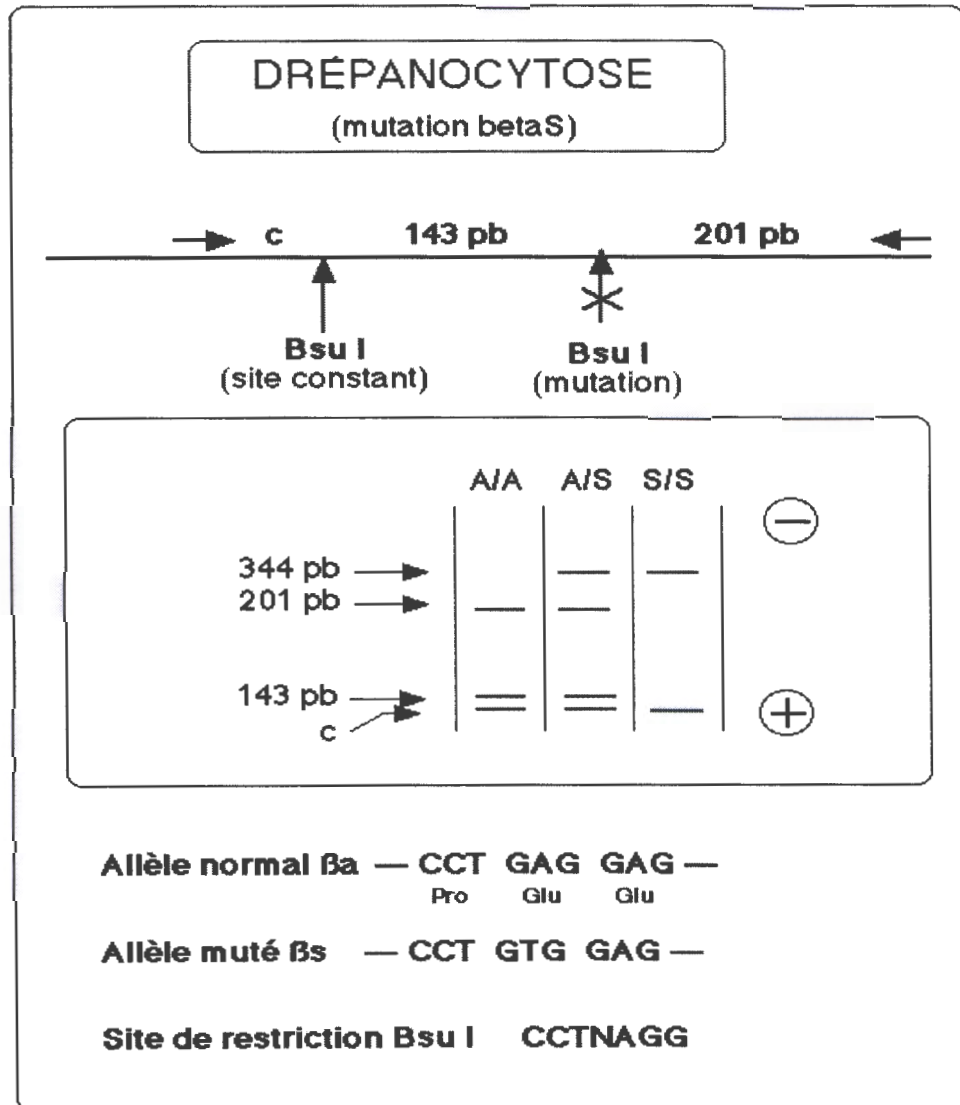


Figure 41. Diagnostic de la drépanocytose par PCR et Restriction.

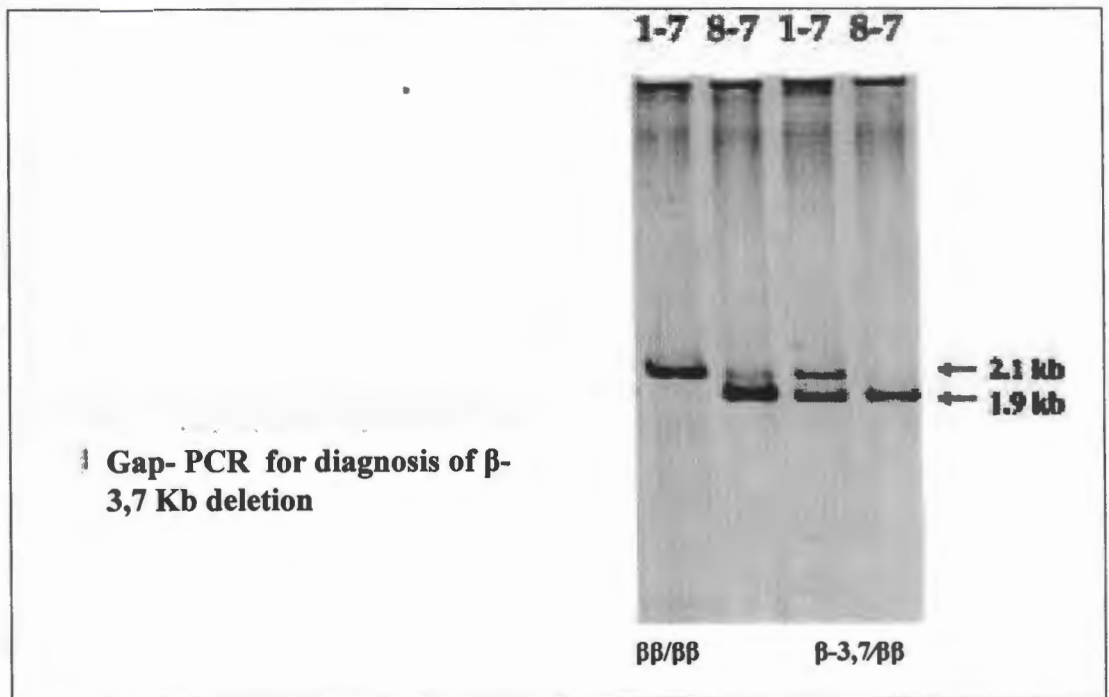


Figure 42. Diagnostic de la β -thalassémie en gap-PCR.

pour simplifier le traitement avant la phase des symptômes. Initialement, le diagnostic était uniquement fait en cytogénétique par la mise en évidence après culture des lymphocytes sanguins dans un milieu pauvre en acide folique, d'une cassure de l'extrémité distale des bras longs du chromosome X (en xq27.3) chez les sujets atteints. Cependant cette technique ne permettait ni de reconnaître tous les sujets porteurs d'une mutation complète, ni d'identifier les sujets porteurs d'une prémutation. C'est pourquoi l'étude du gène FMR1 par Biologie Moléculaire est devenue la méthode de choix du diagnostic du syndrome de l'X fragile.

Puisque l'expansion d'une séquence répétée est associée au syndrome X-fragile, plusieurs laboratoires ont tenté de mettre au point un protocole pour amplifier les répétitions à l'aide de la réaction PCR. En comparant les produits PCR (radioactif ou non) à une échelle de référence, il est possible de calculer exactement le nombre de triplets composant la répétition. Par contre, le contenu riche en cytosine et guanine (G) de cette région (presque 100%) rend techniquement difficile, pour ne pas dire impossible, d'amplifier suffisamment de fragments pour permettre la visualisation directe des mutations complètes. Pour contourner ce problème, un protocole incluant une étape de transfert sur nitrocellulose et d'hybridation avec une sonde (CGG) non marquée a été mis au point et permet de détecter et mesurer les allèles mutés. Ces étapes supplémentaires ont toutefois des répercussions sur le coût et le temps alloués au diagnostic ainsi que sur la précision de la mesure du nombre de triplet. De plus, cette technique ne permet pas de déterminer le statut de méthylation. Récemment, deux méthodes permettant d'amplifier uniquement les CPG méthylés chez les males atteints ont été publiées pour le diagnostic.

Au cours des dernières années, deux polymérases permettant « supposément » d'amplifier les mutations complètes sont devenues disponibles commercialement (HerculaseTM et expandTM long PCR). Au cours de la réaction PCR, l'amplification préférentielle des petits fragments peut générer un résultat faux-négatif pour le diagnostic. Chez plus de 10% du patient ayant une mutation complète, la PCR a généré un produit de longueur normale ou prémutée [83] (Figure 43 et 44).

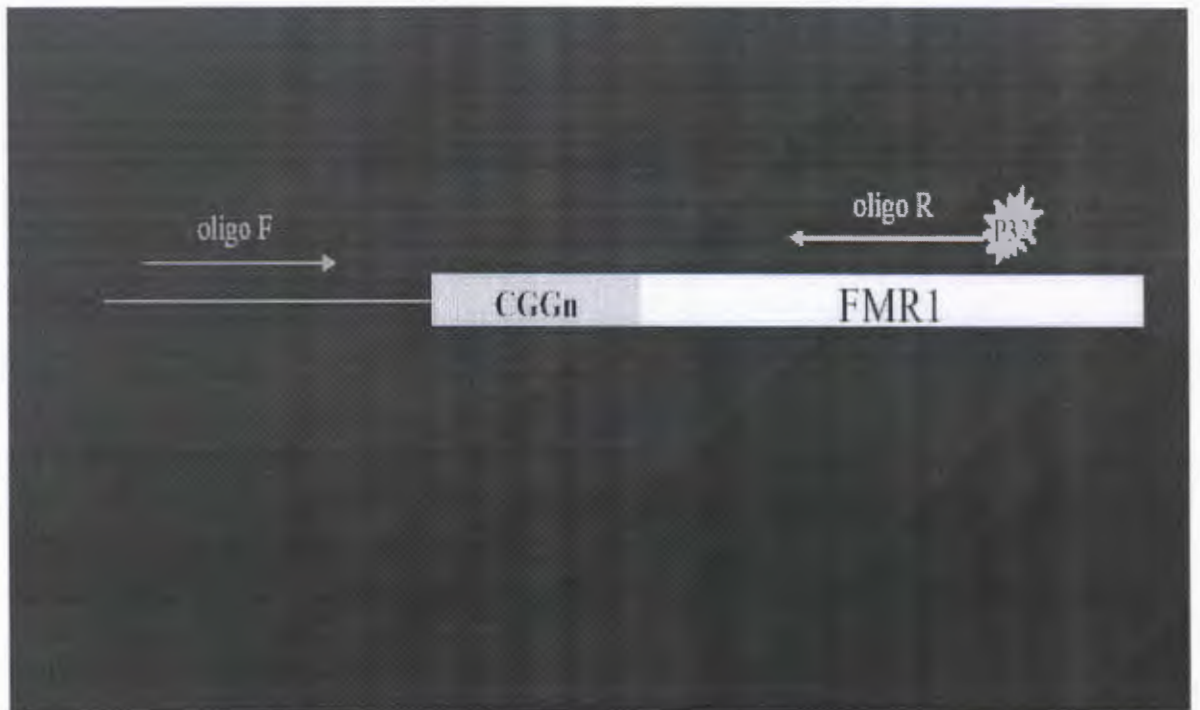


Figure 43. Le diagnostic de la maladie de l’X fragile est possible par la PCR (oligo R et F sont des amorces et le P32 est la florescence.

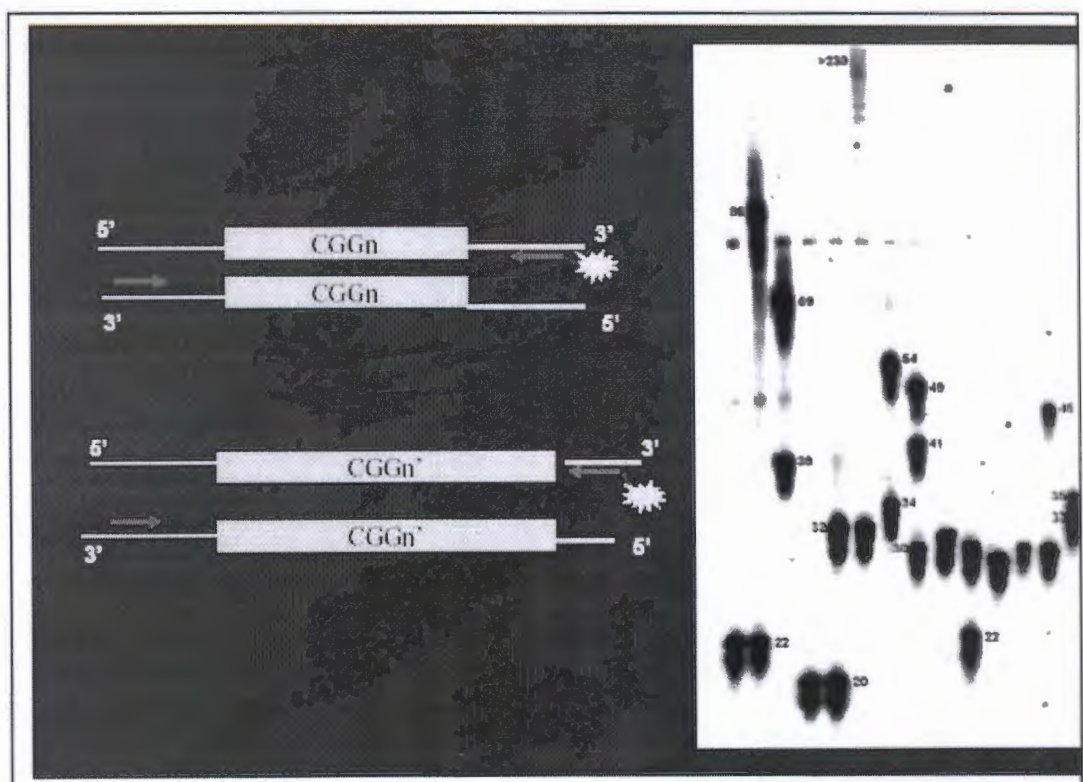


Figure 44. Diagnostic du syndrome de l’X fragile par PCR.

III.3.5- L'hémophilie A

La population étudiée et échantillon d'ADN des échantillons provenant de 2 groupes d'individus ont été étudiés. Un groupe était précédemment Inv22 génotype par analyse méridionale de tache et a inclus 16 cas, 8 femmes (3 Inv 22 porteurs, 2 avec le modèle proximale et 1 distal et 5 non – Inv22) et 8 hommes (5 Inv22 (3 distaux et 2 proximaux) et 3 non-Inv22). L'autre groupe n'avait pas été étudié précédemment et n'avait pas été inclut 12 individus, 9 hommes qui étaient les probands graves d'ha et 2 mère et 1 parent féminin des probands. L'ADN de genomic a été obtenue à partir des leucocytes périphériques de sang par la précipitation du phénol chloroforme ou de l'extraction et de l'éthanol de salage. La pureté, la qualité, et la concentration d'ADN ont été évaluées par la spectrophotométrie ultraviolette (260 et 280 nanomètre) et l'électrophorèse de gel d'agarose.

Des produits de PCR (5-10 µl) ont été analysés au moyen de 5 U de l'enzyme de restriction en volume total de 15µl dans des condition recommandées par les fabricants (promega, Gibco BRL, et nouvelle Angleterre biolabs) [42]. Des produits de PCR et leur sommaires de restriction ont été analysés par l'électrophorèse rapide du gel (45 -50 minutes) sur bromure d'éthidium, ont souillé les gels 1.5 % d'agarose avec une échelle d'ADN de 50 points d'ébullition en tant que marqueur moléculaire de taille. Des image de gel ont été documentées au moyenne d'un appareil – photo numérique (HP Photo Smart 735) équipé des filtres ultra –violets, et le »s intensités des signaux électroniques. Des produits de PCR on été préparée pour l'ADN ordonnançant par la purification en utilisant des colonnes de rotation de GFX (Amersham). Les amorces de ordonnancement étaient ceux utilisées pour les amplifications de PCR (unité internationale, identification et ED) l'ordonnancement manuel d'ADN a été effectué sur le cycle d'ADN de mol ordonnançant le système (promega) avec 5'-finir les amorces 32P- radioactive, dans des conditions recommandées par le fabricant. Des ordres d'ADN ont été évolués dans les deux orientations.

La conception de stratégie multiplex d'I-PCR pour INV22 génotypique, en utilisant les dossiers génomiques humains d'ordre d'ADN enjamber dont une partie appropriée ou le fragment entier de restriction de BcLI obtenu par analyse méridionale classique de tache pour INV22 (21.5 et 20.0 KBs). L'ordre complet de nucléotide du segment de 21,5 KB enjamber int22-1 a été trouvé dans l'entrée BX.842559 de banc du gène (complémentaire) et des ours que le BcLI approprié situe aux bases 36204 (unité internationale) et 14595(indentification ; LA). Sur le croisement d'int22-mediated plus de,le fragment d'Inv22 – associatif ou de 20,0 KBs BcII représente une chimère entre une bras d'unité internationale, une copie réarrangée

d'int22h (int22h-1 et int22h-2 ou-3) et un bras d'ED (distal ou proximal , LA). Ces les régions proximales et distales d'ED ont montré des ordres pratiquement identique parce que l'homologie d'ordre d'ADN des ces lieux extra génique avance à travers les limites descendant d'int22h. Ce segment de l'homologie prolongée enjamber au moins 2.2 Kbs d'int22th et inclut l'emplacement d'ED BcLI. Les ordres de genomic de Xq28 copie servi à localiser avec précision l'emplacement d'identification d'ED BcLI de tous les deux copie distal (int22h-3 ; nucléotide 1473 ; entrée BX276110 de banc du gène), et la copie proximal (int22h-2 ; nucléotide15265 ; banc du gène entrée BX 682237 complémentaire).

Dans le schéma, deux appropriés apporte (les fragments individu- ligaturés de BCLI) sont dépeint : la gauche, un anneau de 21.5 Kbs qui correspond à la copie d'Int 22 h-1 (la normale apportent) ; redresser, des 20 Kbs Inv 22 – spécifique apportent que des envergures une copie chimérique d'Int 22h composé par une d'Int 22h-1 (intragénique) et une partie d'Int 22h-2 (proximal) ou d'Int 22-3 (distal) chaque anneau est spécifiquement identifié par un amplification spécifique de PCR. La normale apporte des produits de rendement du point d'ébullition 487 avec les amorces Unité internationale et identification ; Inv22 apporte des produits de rendement du point d'ébullition 559 avec les amorces unité internationale et ED. Des emplacements mieux habillés de cible, les emplacements de la BCLI, et des tailles du produit de PCR sont indiqués (voir Figure 45 (a)).

(a) Analyse d'électrophorèse de gel d'agarose montrant les 3 génotypes possible : un no- Inv22 (normale, deuxième individu de ruelle), une femelle de porteur d'Inv22 (normale, troisième de ruelle), et un patient d'Inv 22- positive présentant hémophilie A (ha) grave (quatrième ruelle)- (Figure 45 (b)) [84].

(b) Génotype Inv22 de 2 familles affectées par l'hémophilie A grave. La gauche, le probant (premier ruelle) montre le signal de 559 points d'ébullition indiquant que la famille est instructive pour la mutation Inv22, et son cousin féminin (deuxième ruelle) montre un signal simple de 487 points d'ébullition et point d'ébullition et a été donc diagnostiquée entant que non- porteur- redresser, le proband (troisième ruelle) est le positif Inv 22, et sa mère (quatrième ruelle) est un porteur Inv22 Marqueur de ruelle, modèle d'échelle de 50 points d'ébullition. Des tailles moléculaires appropriées sont indiquées [85]. L'électrophorèse de gel d'agarose

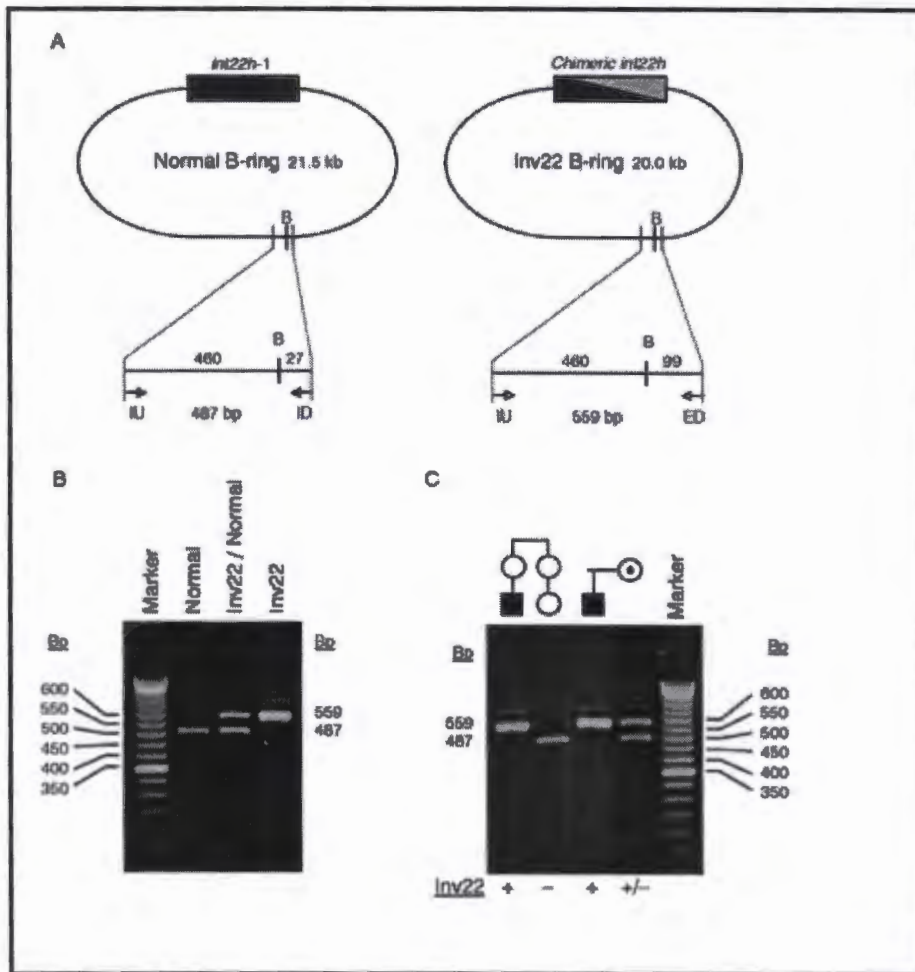


Figure 45. Diagnostic d'hémophilie A par I-PCR.

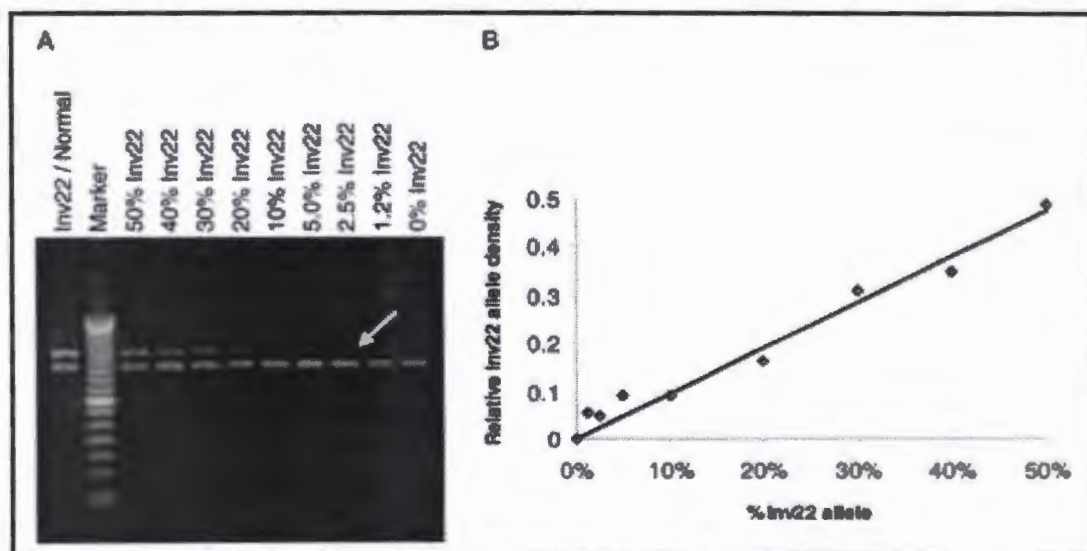


Figure 46. Résultat du diagnostic d'hémophilie

d'ethidium bromure – a souillé des produits des mosaïcismes artificiellement construits de porteur de la mutation Inv22.

Inv 22/ normale indique un modèle typique et des intensités relatives de signal d'un porteur Inv 22. composition en mosaïque : 50% Inv 22 simule un porteur non- mosaïque Inv22, de la mutation Inv 22 , qui correspond aux cellules hétérozygotes de 100% ; 40% Inv 22, cellules hétérozygotes de 80% ; 30% Inv 22, cellules hétérozygotes de 60% ; 20% Inv 22, cellules hétérozygotes de 40% ; 10% Inv 22, cellules hétérozygotes de 20% ; 5% Inv 22, cellules hétérozygotes de 10% ; 2.5% Inv 22, cellules hétérozygotes ; 0% Inv 22, aucunes cellules hétérozygotes [84] (Figure 46 (a)). La régression linéaire des densités relative de l'allèle Inv 22 est calculée comme : de signal (Inv 22)/ (signal –non- Inv 22). Equation pour la ligne de régression ; $y = 0.956X$. les paramètres R2 (0.9692) et la pente de la ligne (0.956) indiquant les deux bons justement et corrélation linéaires entre la composition de cellules d'Inv 22- positive des mosaïcismes certains de porteur et les densités relatives de signal d' I-PCR (Fig 46 (b)).

III.3.6- Dystrophie Musculaire de Duchenne

Les altérations du génome peuvent être détectées par PCR en utilisant plusieurs amorces, ce qui permet l'amplification simultanée de plusieurs régions (multiplex PCR). Cette méthode a été employée pour la première fois par Chamberlain et coll en 1988 pour détecter les mutations de la dystrophine responsable de la maladie de Duchenne. PCR oligonucléotide allèle spécifique, PASA (PCR (Amplification of Specific Alleles). En PCR, la polymérase ne peut polymériser que si la dernière base en 3' est stabilisée par des liaisons hydrogènes, si la dernière base est hybridée. La plupart des polymérases ont une activité 3'-5' exonucléase, mais certaines d'entre elles comme l'ADN polymérase Taq en est dépourvue. En prenant deux oligonucléotides, un spécifique de la mutation et un autre spécifique du témoin (sauvage) on peut faire deux PCR à l'aide d'un troisième oligonucléotide situé en 3' (en aval) à environ 1 Kb. On aura amplification uniquement qu'avec un des deux couples.

L'absence de bande ne signifie pas toujours l'absence d'hybridation en 3' mais peut résulter d'un défaut lors de PCR, d'une erreur de manipulation. Un témoin peut être ajouté, c'est un oligonucléotide qui hybride sur tous les allèles (connus) en amont de l'hybridation permettant de voir la mutation. On obtient donc deux bandes, une bande haute permettant de voir si la polymérisation a bien eu lieu et une bande basse permettant de voir la présence ou non

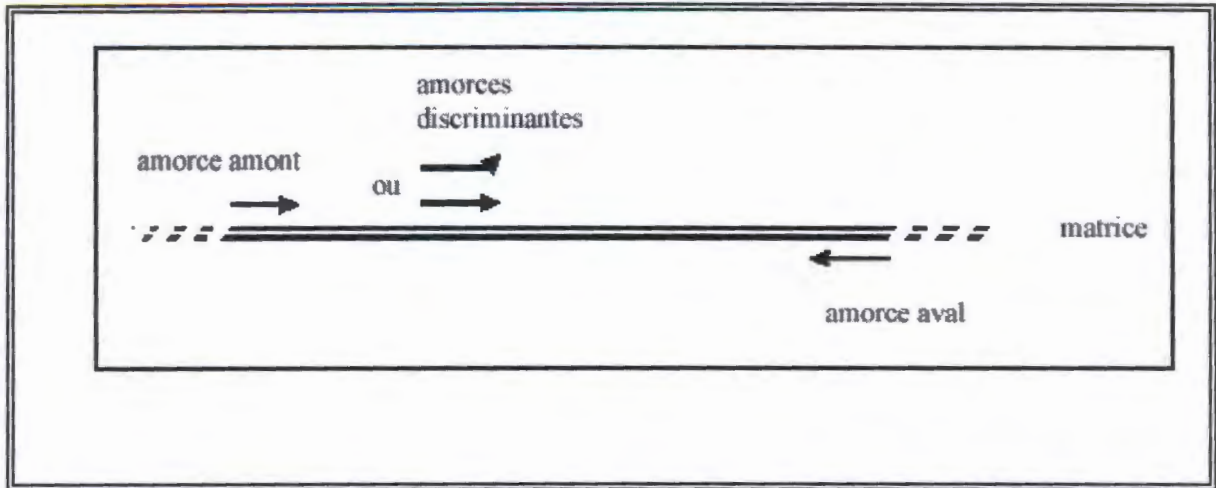


Figure 47. Détection des mutations de la dystrophine responsables de la myopathie de Duchenne.



Figure 48. Exemple de PASA(PCR Amplification of Specific Alleles) permettant de distinguer des individus avec (RR), des individus (SS), sauvages (S) et des hétérozygotes (RS).

de la mutation, suivant l'oligonucléotide qui a été utilisé (figure 47). Les deux réaction de PCR (entre l'amorce amont et l'amorce aval et entre l'amorce discriminante et l'amorce aval) entrent en compétition, et l'amplification la plus petite est favorisée, d'une part parce qu'elle est plus petite et d'autre part parce que le produit de la réaction la plus longue peut servir de matrice à la réaction la plus petite et non inversement. Aussi si la réaction de PCR discriminante a lieu, l'amplification témoin est faible.

Ce système a deuxième avantage. En effet, dans de rares cas, l'amplification avec l'amorce discriminante peut avoir lieu. Plus il y a de cycle de PCR, plus elle a de chance d'avoir lieu, cette erreur est due à la probabilité qu'à la dernière base de l'oligonucléotide d'être bien positionnée en l'absence d'hybridation. Le fait d'utiliser une amorce amont, permet d'utiliser dès les premiers cycles les substrats (DNTP) et de fabriquer une grande quantité de matière [86] (figure 48).

III.3.7- Maladie d'Alzheimer

Les électrophérogrammes de l'ordre de nucléotide ont dérivé PS1 de l'exon 9. Dans EOF AD-2, une substitution de nucléotide (GA) a été détectée dans les individus affectés (IV : 23, IV : 47), mais pas dans un nombre inchangé du pedigree (III : 10). Dans EOFAD-3, une substitution de nucléotide (GT) a été détectée dans les individus affectés (II : 4, II : 8), mais pas dans un nombre inchangé du pedigree (II : 12) [87] (figure 49-A). Le diagramme schématique du gène PS-1 indiquant la position des mutations, qui suppriment l'emplacement d'accepteur d'épissure à la fonction de l'intron 8 et à l'exon 9 du gène PS-1. Des amorces de PCR flanquant l'exon 9 ont été employées pour examiner les transcriptions PS-1 pour la présence de la suppression de l'exon 9 par RT-PCR [88] (Figure 49-B). Les produits de la RT-PCR étaient soumis à l'électrophorèse dans un gel d'agarose de 2%, le produit de 130 de point d'ébullition PCR correspond aux transcription PS-1 aux suppressions de l'exon9 est trouvé dans les individus affectés (IV : 36, IV : 37) d'EOFAD-2. Le produit de 271 point d'ébullition correspond au type sauvage (Figure 49-C).

III.3.8- Ataxie de Friedreich

Nous avons inclus cinq patients brésiliens dans cette étude, quatre avec le diagnostic clinique de FRDA et un patient atypique. Ils ont tout convenu sur avoir l'analyse d'ADN pour le

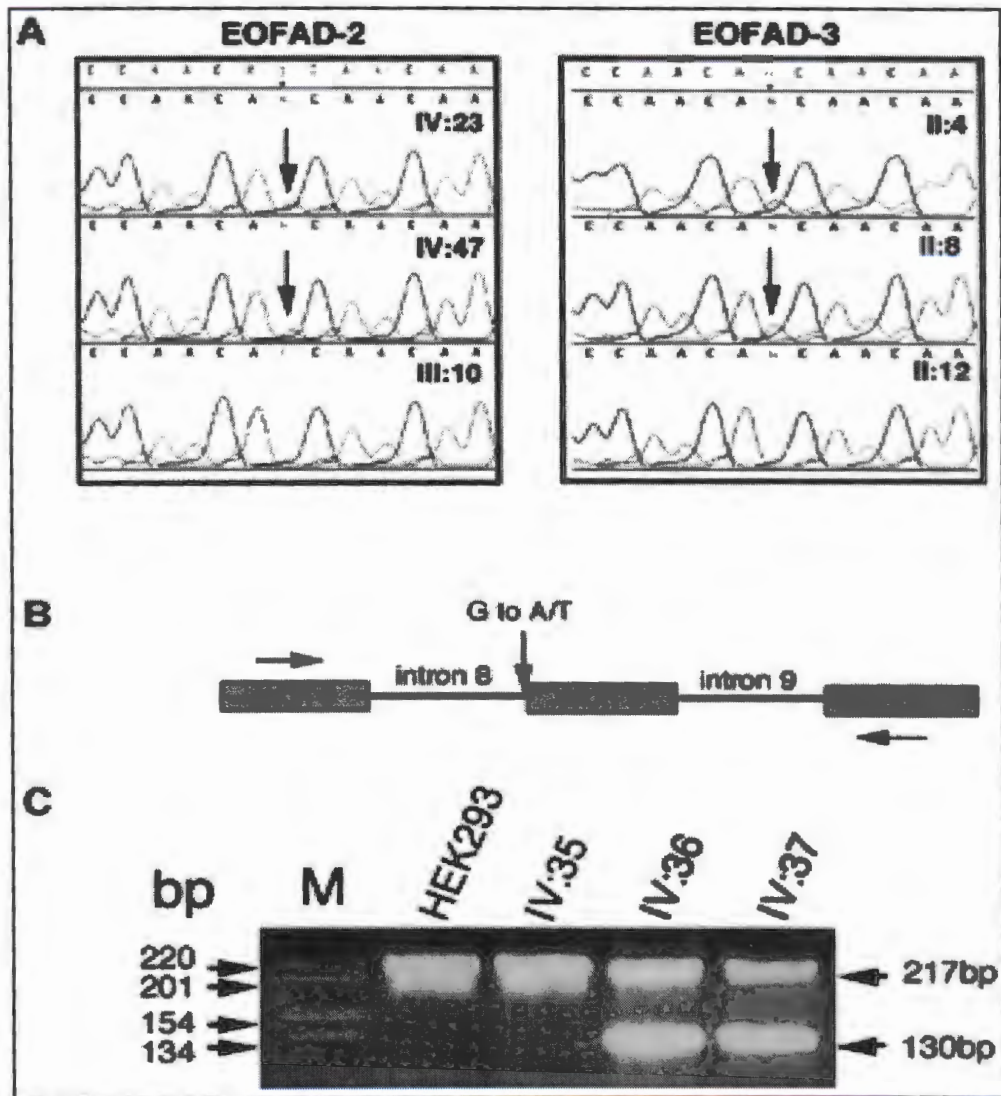


Figure 49. Diagnostic d'Alzheimer par RT-PCR.

- A** : Les électrophérogrammes de l'ordre de nucléotide ont dérivé de PS1 de l'exon 9.
- B** : Le diagramme schématique du gène PS1 indiquant la position des mutations, qui suppriment l'emplacement d'accepteur d'épissage à la fonction de l'intron 8 et à l'exon 9.
- C** : Résultats d'électrophorèse des produits de la RT-PCR sur gel d'agarose.

gène X.25 exécuté. L'analyse moléculaire de quatre patients (affaires 1, 2, 3 et 5) inclus dans cette étude a été exécutée à Naples, Italie. L'analyse dans un des patients (affaire 4) a été exécutée dans notre laboratoire au Brésil. L'ADN a été extraite à partir des leucocytes périphériques de sang en utilisant la méthode de précipitation de « salage » par Milliers et autres [86]. Et amplifiée par PCR en utilisant le mélange d'enzymes d'ELONGASE™ (GIBCO BRL) selon les instructions de fabricants. Les amorces et des états de PCR utilisés pour l'analyse des répétitions de GAA dans le premier intron du gène X.25 ont été décrits par Filla et autres. Qui ont produit des produits de PCR des paires 500+3n basses (n : nombre de triplets de GAA). Ces fragments ont été alors soumis à l'électrophorèse dans un gel d'agarose de 1% et ont été séparés par taille. L'analyse granulométrique d'expansions a été estimée par la comparaison du fragment amplifié avec une échelle 1kb (GIBCO BRL) employant les calculs décrits par Southern (Méridional, 1979) (Figure 50).

L'affaire 1 était un homme de 21 ans, le premier fils des parents en bonne santé et non-consanguins de l'ascendance allemande. Depuis sa première décennie de la vie, il a montré une démarche instable progressive. À l'examen physique, il a eu le membre et l'ataxie oculaire, l'absence des réflexes myotatic et les réponses plantar d'extenseur. Des vitesses sensorielles et de moteur de conduction ont été très réduites. Les images de résonance magnétique de cerveau étaient normales. Sur l'électrocardiogramme, il y avait des signes de la surcharge et de l'hypertrophie ventriculaire gauche. Ses soeurs de 9 et 15 ans étaient asymptomatiques, et l'étude d'ADN n'a pas été réalisée. L'analyse du gène X.25 a montré 641 répétitions de GAA en les deux chromosomes. L'affaire 2 était une femme de 44 ans, avec les parents en bonne santé et consanguins (de premiers cousins). Parmi ses 9 enfants de mêmes parents, 3 ont été également affectés. Malheureusement, aucun des enfants de mêmes parents ne pourrait être examiné. Elle a montré l'ataxie de démarche depuis 18 années, étant, à l'heure de l'examen, personne à charge de fauteuil roulant. À l'examen physique, l'ataxie l'a gardée de la marche ou de se lever ; il y avait également incoordination de membre, absence des réflexes de tendon, réponses d'extenseur et perte plantar de sens vibratoire sur les jambes. Les études neurophysiologiques ont indiqué une neuropathie mélangée et principalement sensible. Elle a présenté l'insuffisance de tricuspide sur l'échocardiogramme, et les anomalies de t-vague sur EKG. Elle a eu 442 et 553 répétitions de GAA respectivement en chaque allèle du gène X.25.

L'affaire 3 était une fille de 12 ans, fille des parents consanguins (de premiers cousins). Hormis l'ataxie, elle également a montré une familial brachydactyly, hérité de son père comme trait dominant autosomale. Elle a commencé par des chutes fréquentes et une scoliose progressive à partir de l'âge de 4, montrant, dans les années suivantes, la dysarthrie et la démarche ataxique. À l'examen physique, elle a montré le dysmetria, l'absence des réflexes

myotatic, les réponses de fléchisseur et la vibration et la perte plantar de sens de position. Sur la conduction le nerf étudié, il y avait réduction de moteur et vitesses sensorielles, et sur l'échocardiogramme il y avait une hypertrophie ventriculaire gauche. Sa soeur de 10 ans n'a pas eu des symptômes de FRDA. Son analyse d'ADN n'a pas été exécutée. L'analyse du gène X.25 dans ce homozygotie montré patient pour 955 répétitions de GAA.

L'affaire 4 était une femme de 27 ans, la première fille des parents en bonne santé et non-consanguins. Après sa naissance, on l'a noté qu'elle a eu la lèvre de fissure unilatérale. Il y avait histoire familiale de cette anomalie : un oncle maternel et un oncle paternel ont également la lèvre de fissure. Elle a montré l'ataxie progressive de démarche depuis 12 années. En années suivantes, elle a commencé par la dysarthrie et fréquente des chutes. À l'examen physique, elle a montré la dysarthrie, l'ataxie appendiculaire, l'absence des réflexes myotatic, les réponses d'extenseur et la perte plantar de sens de position ; l'ataxie l'a gardée seule de la marche. Elle a présenté le tricuspide doux et l'insuffisance mitrale sur l'échocardiogramme. Son balayage de CT était normal. Sa soeur était 23 ans, et n'a pas eu des symptômes de FRDA. Son analyse d'ADN n'a pas été exécutée. L'analyse du gène X.25 a montré l'hétérozygotie pour 759 et 875 répétitions de GAA.

L'affaire 5 était un homme de 30 ans, le cinquième fils des parents en bonne santé et non-constructibles de l'ascendance italienne. Il a fait affecter également deux sibs. Son ataxie a commencé à 25 années. À l'examen physique il a montré la dysarthrie, l'ataxie du tronc et appendiculaire, le nystagmus et la perte de sens vibratoire sur les deux jambes. Les réflexes de Profond-tendon étaient, cependant, préservés, et les réponses plantar étaient fléchisseur. Il y avait d'atrophie cérébelleuse douce sur le balayage de CT. L'évaluation cardiologique était normale. Les réflexes normaux (réponses plantar y compris), le début en retard de la maladie et l'absence de la participation cardiaque étaient tous des résultats atypiques. L'analyse du gène X.25 dans ce patient a montré 224 et 955 répétitions de GAA respectivement pour chaque allèle.

Les expansions de répétition de trinuéotide sont maintenant un mécanisme mutagénique bien connu dans la génétique humaine. L'ataxie de Friedreich, FRDA, est la première maladie récessive autosomal associée à ce mécanisme. L'expansion de GAA est détectée dans tous les patients, la plupart (94%) d'entre eux étant homozygous pour la mutation. Les hétérozygotes composés portant une expansion de trinucleotide sur un allèle parental et une mutation de point de l'autre peuvent expliquer le 5-6% de patients avec FRDA [89].

Sans compter que confirmer le diagnostic clinique de FRDA dans quatre patients présentant des manifestations typiques, les investigations moléculaires ont déterminé le même diagnostic dans un patient atypique (affaire 5). Ce patient a eu un tard-début des symptômes (25 ans), des réflexes préservés, des réponses plantar de fléchisseur et de l'évaluation cardiologique normale. Autant d'autres caisses avec des réflexes maintenus et/ou avec le tard-début ont été diagnostiquées par l'analyse moléculaire comme FRDA. L'existence d'autres formes d'ataxie cérébelleuse récessive autosomal sans marqueurs biologiques, tels qu'EOCA, est douteuse. Elles représentent probablement des variantes de FRDA avec le tard-début (LOFA) ou avec les réflexes maintenus (FARR).

La taille des expansions de GAA, dans nos cas, était plus petite que ceux trouvées par Filla et autres. Dans 67 patients¹³ européens. Ces auteurs ont trouvé les allèles augmentés avec 201-1186 répétitions de GAA. Le moyen, dans cette étude, était de 816 répétitions, avec un écart-type de 188 : notre moyen est 700. Ceci s'est probablement produit en raison de la petite taille de notre échantillon. On le sait qu'il y a une corrélation inverse entre la taille de l'allèle augmenté plus petit et l'âge du début et la sévérité de FRDA¹⁴. Un de nos cinq patients a montré LOFA (affaire 5, également étant décrit comme atypique, ou comme cas de FARR). Ce patient a le plus petit allèle augmenté de notre échantillon (224 répétitions de GAA), qui pourrait expliquer la forme plus douce de sa maladie.

Dans les affaires 2 et 3, les deux allèles augmentés ont la même origine. Les parents sont consanguins (les premiers cousins dans les deux cas). Tandis que dans l'affaire 3 l'expansion semblaient être stables (comme seulement un produit d'amplification de PCR des répétitions de GAA a été vu sur la ruelle, correspondant à 955 répétitions), dans le cas 2 que la mutation s'est avérée instable (442/553 de répétitions). Monrós et autres. La variation allélique également observée de taille des patients d'un certain FRDA a compté être homozygous par descent. Ce phénomène peut être expliqué par l'instabilité méiotique de la répétition de GAA-trinucleotide. Au cas où 1, d'une part, les deux allèles augmentés n'auraient pas la même origine. Cependant, nous avons observé seulement un produit d'amplification de PCR des répétitions de GAA sur la ruelle, correspondant à 641 répétitions. Car les mutations de point dans le gène X.25 ont de basse fréquence et ce patient a des résultats typiques de FRDA, nous croyons qu'il a deux répétitions augmentées de la même taille (641/641). En conclusion, nous soulignons la signification du diagnostic moléculaire direct de FRDA comme outil essentiel dans la pratique clinique, principalement pour confirmer le diagnostic des cas atypiques.

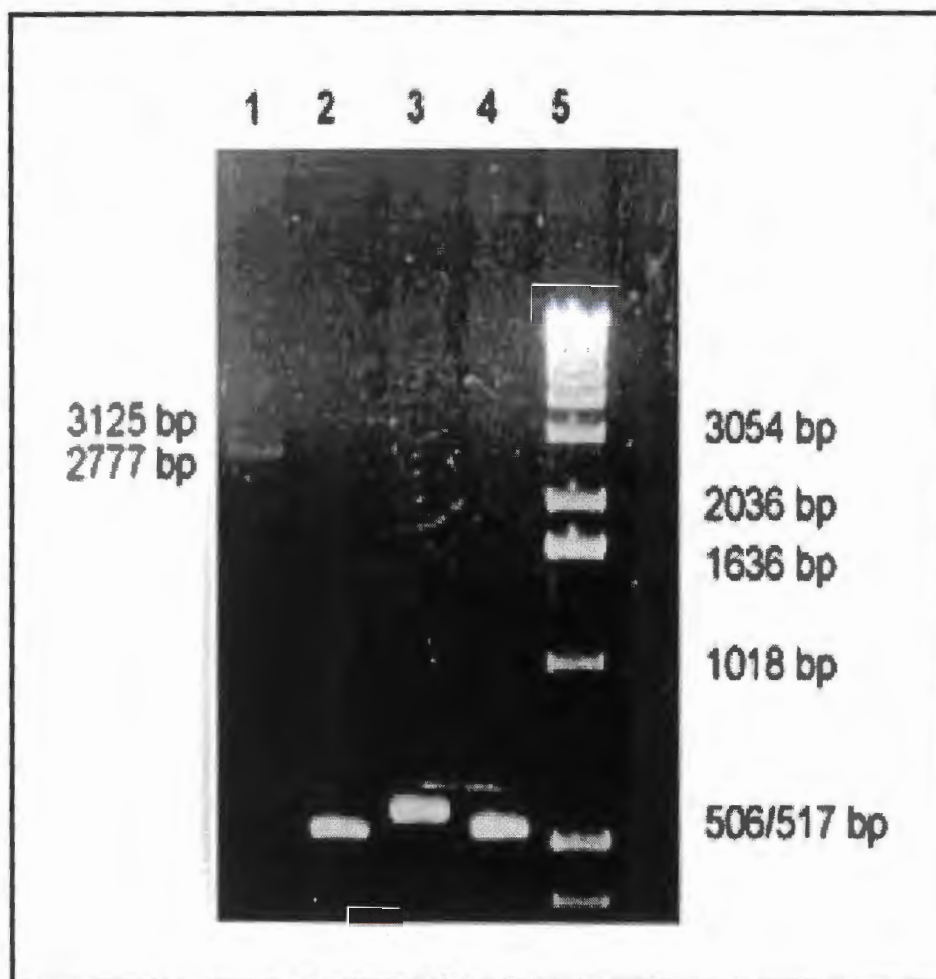


Figure 50. Analyse par PCR de l'intron 1 du gène X25 d'un patient atteint de l'ataxie de Friedreich et de trois personnes saines. Les produits de PCR étaient séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% et coloré par le bromure d'éthidium. La piste 1 représente le **patient atteint de l'ataxie de Friedreich (cas 4)**, montrant deux bandes (fragments : 2777 et 3125) qui correspondent à deux répétitions 759 et 875. Les pistes 2 à 4 représentent des cas normaux. La piste 5 représente le marqueur de poids moléculaire 1kB ladder.

III.3.9- Maladie de Huntington

On peut réaliser un essai prénatal, cet essai peut être employé pour le diagnostic prénatal dans les cellules de fluide amniotique et les échantillons de villus chorionique (CVS). Des échantillons d'ADN devraient être obtenus à partir des deux parents et course simultanément avec l'échantillon prénatal. Des études maternelles de contamination de cellules devraient être réalisées sur chaque échantillon prénatal pour confirmer l'origine foetale de l'échantillon étant examiné. Dans l'essai prédictif de cas et/ou confirmatoire simultané extraordinaire sur un parent du foetus et du foetus lui-même peut être effectué.

On peut utiliser plusieurs ensembles d'amorces, d'états de PCR, de séparation d'amplicon et de techniques de détection on édités [90]. Indépendamment de la stratégie PCR-Basée particulièrement choisie, il est important que des étapes d'analyse et les analyses de poteau -PCR soient optimisées pour assurer la quantitation précise de la longueur de répétition (figure 51), il convient noter que des anomalies de classement par taille de CAG ont été observées dans des études comparatives des méthode de l'incorporation [91] et dans des analyses comparatives de poteau -PCR utilisant l'agarose, capillaire, et dénaturant les méthodes électrophorétiques de gel de polyacrylamide [92]. En tant que tels, la quantitation précise des tailles patientes d'amplicon devrait être empiriquement déterminée par comparaison pour s'approprier des normes externes ou internes. Celles-ci pourraient inclure, mais ne pas être limitées à (M13) ordonnant des échelles, normes copiées de référence, et s'approprient les commandes patientes normales et anormales dont les tailles ont été indépendamment vérifiées. Car c'est la longueur seul de la répétition polymorphe de CAG qui est associée au phénotype de HD, le patient genotyping a basé sur l'utilisation d'une seule paire d'amorce qui amplifie le CAG et la répétition adjacente de CCG [90] est découragée.

La répétition de CCG, qui se trouve 3 de la répétition de HD CAG, s'est avérée polymorphe et en conséquence peut mener aux inexactitudes diagnostiques pour le classement par taille de normale et d'allèle de HD. S'approprier les commandes qui incluent une gamme des tailles de CAG devrait être utilisées pour chaque analyse. Il est de la responsabilité du laboratoire de déterminer empiriquement les limites détection pour leurs analyses. Tandis que la limite supérieure de la détection n'est pas connue, des allèles portant ≈ 115 répétitions de CAG

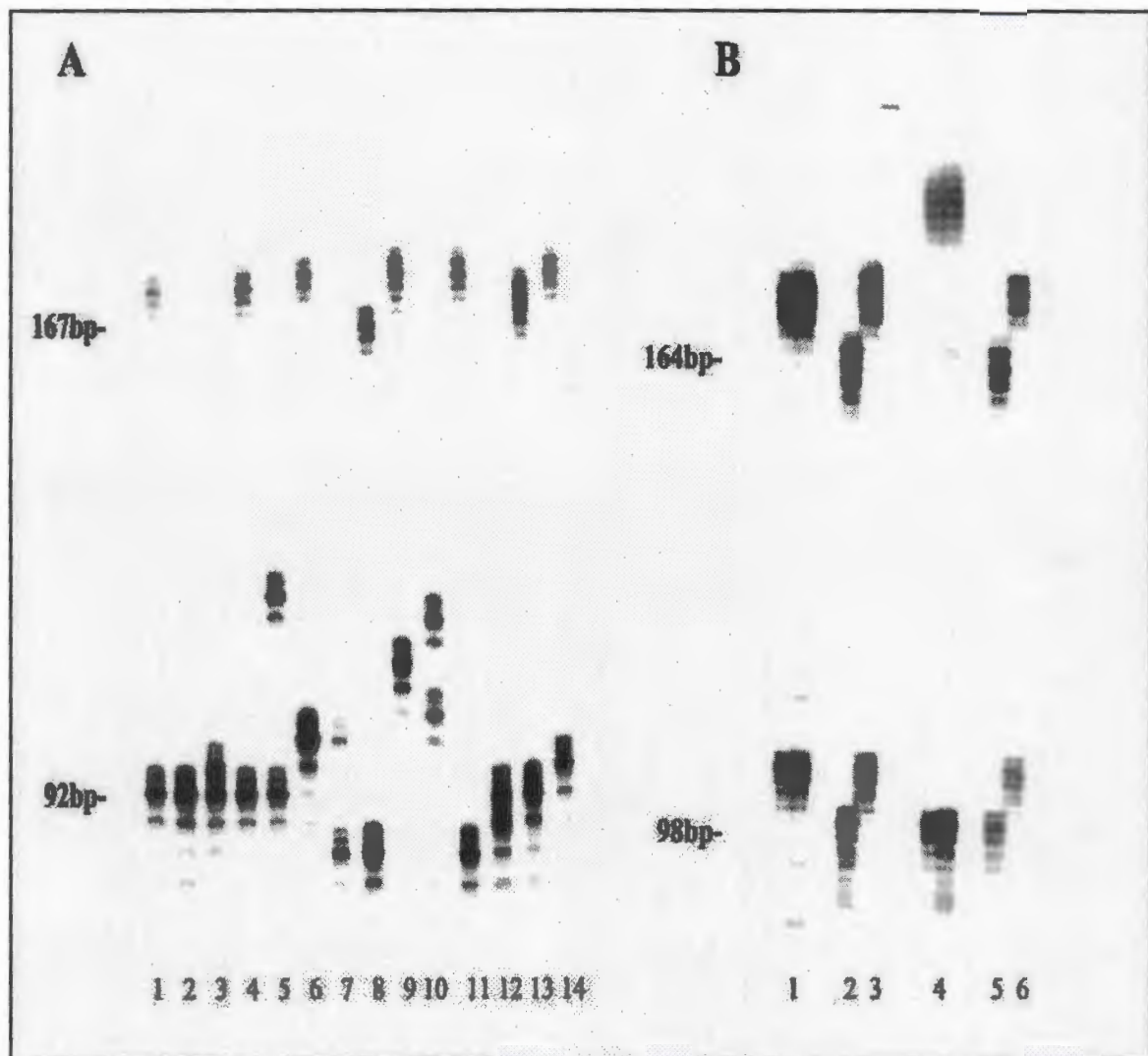


Figure 51. Détection PCR-basée de la répétition polymorphe de CAG utilisant l'incorporation ^{32}P -dCTP et la paire de l'amorce A1/C2 (a) [17] ou la paire de l'amorce HD1/HD3 (b) [16]. La séparation et le classement par taille des allèles ont été exécutés sur les gels de polyacrylamide dénaturants de 6% suivis de l'autoradiographie. Les tailles d'allèle sont (a) : 17/44 ; 17/17 ; 17/18 ; 17/44 ; 17/25 ; 19/45 ; 15/19 ; 15/40 ; 22/45 ; 20/24 ; 15/45 ; 16/17 ; 17/43 ; 18/45 pour les patients 1-14 respectivement. (b) : 19/43 ; 17/39 ; 19/44 ; 17/51 ; 17/39 ; 19/44 pour des patients 1-6 respectivement.

ont été amplifiées par les méthodes PCR- basées, tandis que les allèles portant des ≈ 125 répétitions plus grandes de CAG semblent être réfractaires à l'amplification reproductible [75].

Des polymorphismes entourant ou dans la région de CAG ont été identifiés et ont une fréquence collective $> 1\%$ dans les patients référés pour l'essai de HD [93]. Ces substitutions de nucléotide généralement peuvent être classées par catégorie dans deux groupes : ceux qui modifient des emplacements d'amorce et ceux qui ont comme conséquence la perte d'interruption entre les régions de CAG et de CCG. En la première catégorie, les changements de nucléotide peuvent avoir comme conséquence l'interprétation fautive des données genotyping dues à un échec allèle- spécifique d'amplification lié au mis- recuit mieux habillé. Tant que tels, dans certaine circonstance cliniques « *homozygosity apparent* » pour deux allèles normaux devraient être interpréter avec prudence, et l'utilisation des paires alternatives d'amorce ou d'autres méthodologies (tache méridionale ou ordonnancement) devrait être employée pour résoudre tous les résultats intervenant entre les régions de CAG et de CCG (CAG CAG CCG CCG) peuvent avoir comme conséquence répétition de CAG basée sur les formules conventionnelles de calcul [74].

Les protocoles méridionaux de tache sont souvent essentiels pour l'identification des grandes expansions (peuvent n'amplifient pas bien) liées au juvénile- début HD, et sont utiles pour la confirmation « des génotypes normaux homozygous ». On lui recommande que tous les laboratoires considèrent l'utilisation de tels protocoles ou établissent un arrangement formel de référence avec un service qui offre ceci qui détermine cas qui exigent la résolution génotype.

Les experts estiment qu'environ 40.000 maladies diverses sont connues. Mais seulement environ un tiers d'entre elles peuvent aujourd'hui être efficacement traitées ou tout au moins voir leurs effets atténués. Pour y parvenir, il est nécessaire qu'un diagnostic correct soit posé par un médecin. L'avènement des tests génétiques soulève en termes de santé publique des interrogations sur leur mise à disposition, tant du point de vue de leur financement, que de l'égalité d'accès au soin.

En effet ; les tests génétiques dépassent désormais le stricte cadre des maladies rares dites héréditaires et plusieurs études montrent l'intérêt pour les patients d'une facilité de recours à certains tests génétiques qui ont un intérêt immédiat pour leur prise en charge médicale [29]. Or actuellement ces tests ne sont pas d'une accessibilité facile et ne sont pas pris en compte en terme financier par les organismes de protection sociale à l'exception de certains tests diagnostic prénataux.

Il est important, dans un premier temps; pour pallier les confusions terminologiques qui règnent autour des tests génétiques ; d'apporter quelques précisions. Les tests génétiques, qui devraient désormais être qualifiés, « d'examen des caractéristiques génétiques d'une personne » (Décret du 23 juin 2000) (décret n°2000-570 du 23 juin 2000), doivent être différenciés selon leur utilisation. Il convient de distinguer d'une part les tests génétiques réalisés dans un contexte clinique particulier en vue de confirmer ou d'infirmer un diagnostic de maladie chez un individu présentant déjà des symptômes, de ceux à visés strictement prédictive d'autre part réaliser chez des personnes asymptomatiques [58].

Il paraît indispensable de distinguer les différents types de tests actuellement disponibles en fonction de leur pouvoir de prédiction et donc de leur intérêt en usage clinique. En effet, en fonction du nombre de gènes à l'origine de la maladie, de leur pénétrance et du rôle d'éventuels facteurs environnementaux, les tests de diagnostic moléculaire auront une valeur prédictive plus ou moins certaine. Il est nécessaire de distinguer deux cas de figure pour lesquels la réalisation d'un test génétique impliquera des enjeux éthiques tout à fait différents. Il faut d'abord considérer les maladies monogéniques, communément appelées « maladies génétiques », qui sont des maladies rares et sévères. Un seul gène est responsable de la maladie et la détection d'une mutation de ce gène signera incontestablement la déclaration future de la maladie; on dit que la pénétrance du gène est complète. Ce sont des maladies telles que la mucoviscidose, l'homophilie, les myopathies et de nombreuse autre mais dont la fréquence dans la population est inférieur a 1/50000. Bien souvent, dans ce cas de figure, le recours aux tests génétique se fait dans le cadre du

Chapitre IV

Discussion et conclusion

conseil génétique en vue d'un diagnostic prénatal. On trouve ensuite les maladies communes mais pour lesquelles une fraction des individus atteints ont une prédisposition héréditaire pour ces maladies héréditaires, le diagnostic moléculaire permet d'évaluer le risque de déclaration de la maladie de façon assez significative.

Il existe actuellement de nombreuses techniques propres à la Biologie autre que la PCR utilisés pour le diagnostic moléculaire des maladies héréditaires telle que la technique de Southern blot qui consiste tout d'abord à effectuer une électrophorèse des fragments d'ADN obtenues enzymes de restriction. Le gel est ensuite dénaturé (pour rendre les ADN monovalents) et un transfert (« blot » en anglais) est opéré sur une membrane de nylon. Cette membrane est destinée à être hybridée avec la sonde spécifique. Après lavage pour éliminer l'excès de produit radioactif non fixé, un film est appliqué sur la membrane. Il pourra ainsi être décelé une ou plusieurs bandes radioactives qui correspondent aux fragments d'ADN reconnus par la sonde. Il y'a aussi la technique RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisme) c'est-à-dire polymorphisme de longueur des fragments de restriction qui permet de comparer les ADN de différents individus et de rechercher si des mutations ponctuelles faisant apparaître des sites de restriction se sont produites.

Certains tests de diagnostic moléculaire prénataux ont été inscrits à nomenclature des actes de Biologie Médicale (mucoviscidose, myopathies de Duchenne...). Parmi ces tests on trouve la technique de PCR qui serve l'être humain dans le diagnostic de plusieurs maladies héréditaires (l'X fragile, hémophilie, mucoviscidose.....) et présente des bonnes résultats, qui sont utilisés pour éviter les symptomatologies de la maladie. Donc le diagnostic par PCR est un conseil génétique utilisé dans le traitement des maladies héréditaires. Malgré que la PCR a plusieurs avantages tell que l'efficacité, la rapidité et l'économique. Néanmoins elle a plusieurs inconvénients, on note d'une part la contamination qui est un danger permanent en raison de la présence dans l'atmosphère surtout dans un laboratoire, d'ADN exogène susceptible de venir contaminer l'échantillon étudié et fausser les résultats de l'analyse du diagnostic. Un grand soin doit donc accompagner le remplissage de tube PCR et toutes les routines de PCR s'accompagnent de contrôles négatifs, tubes ou tous les produits sont réunis sans ADN [85].

D'autre part, l'amplification parasite résulte de l'hybridation par homologie, des amorces ailleurs qui aux extrémité du fragment d'intérêt c'est pourquoi il convient de

choisir un couple d'amorce assez longues, purifiées (la synthèse chimique n'étant pas exempt d'erreurs) présentant des température de renaturation identiques ou très proches et les plus élevés possible. L'infidélité de copie résulte du fait qu'in vitro, la Taq polymérase présente un taux d'erreurs d'incorporation assez élevés (0.0001). Une misincorporation génère un fragment muté dont la proportion finale parmi les amplimères sera d'autant plus grand que la misincorporation est survenue plutôt puisque le processus d'amplification va multiplier les brins mutés. Un tel taux est admissible si le critère d'analyse du fragment d'intérêt, après PCR et sa taille, mais peut pose des problèmes notamment en cas de sous clonage des produits de PCR dans un but de séquençage ou de expression (certains sous-clones peuvent être porteur d'une séquence mutée et non d'une séquence originelle [3]. Le diagnostic moléculaire par PCR permet au jourd'hui de savoir si un personne ayant eu un parent atteint de cette maladie et elle-même porteuse (50 % de risque) du gène déficient.

En cas de résultat positif ce test a évidemment un effet dévastateur pour ces personnes qui vivront désormais dans l'angoisse de voir apparaître les premiers symptômes. On peut qu'être enthousiasme devant ces progrès considérables des techniques du Génie Génétique. Un des principaux avantages de cherche à déceler une anomalie au niveau de l'ADN et qu'il est possible de travailler avec n'importe quelle cellule nucléaire et que cette anomalie peut être décelée. Précocement. Les problèmes pratiques majeurs sont dus à l'emploi de sondes radioactives. Seuls les laboratoires autorisés peuvent recevoir et utiliser des éléments radioactifs. La substitution des sondes radioactives par des sondes froides a commencé à se faire. Elle permettra sûrement de développer la biologie clinique moléculaire. Ces techniques vont de plus en plus influencer la pratique médicale. Plusieurs centaines de gènes responsables lorsqu'ils sont anormaux de maladies humaines ont pu être localisés sur les chromosomes [76].

Bibliographies

- [1]. Dunn LC. Genetics in the Twentieth century: Essays on the progress of genetics during its first 50 years. The mac mili co, New York 1951.
- [2]. Fincham JR. Mendel- now down to the molecular level. Nature 1990; 343: 208-209.
- [3]. Mullis KB. The unusual origins the polymerase chain reaction. Sci. Amer 1990 ; 262 : 36 – 41.
- [4]. Mayr E - Histoire de la biologie (traduction française : Fayard) 1982; 52 : 364 – 5.
- [5]. Jean Louis serre et coll.: Les diagnostic génétiques 2002; 70-72
- [6]. Burest M et Guigo R. Evaluation of gene stucture prediction programs. Genomics 1996; 34: 353-367
- [7]. Hollaender, eds. Clenical mutagens: Principales and methods for their detection, vol- 7- New York: Plenum press 1982.
- [8]. Marx J. DNA repair comes into its own. Science 1994; 266: 728 – 30.
- [9]. Bridjes BA. DNA turnover and mutation in resting cells. Bioessays 1997; 19:347-52
- [10]. Harding AE. Atascie cérébelleuse de début tot avec des reflexes maintenus de tendon : une étude clinique et génétique d'une désordre distinct de l'atascie de Hreidreich's. Psychiatrie de j neurol Neurosug 1981 ; 44 : 503-508
- [11]. Adams RJ, Mckie VC, Hsul et al. Prevention of a first strock by transfusion in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial soppler ultrasonography. N Eng J Med. 1998; 399: 5-11
- [12]. Adams R, Mckie V, Nicholas F et al .The structur of hemoglobin. NEJ Med 1992; 326, 9, 605-610.
- [13]. Attali o, Vincigurra C, Trzeciak MC, Durin A, Pernod G . Sobas F, Negerier C. Factor VIII gen analysis in 70 unrelated patients with haemophilia A : Description of 13 new mutations Thromb haemost 1999; 82 : 1437-42
- [14]. Siegl B, Seigl S. Pregnancy and delivery in a patient with cystic fibrosis of the pancreas. Obtet a gynecol 1960; 16:438-40
- [15]. Faber S. Pancreatic insufficiency and the celiac syndrome. N Engl. J. Med 1943; 229: 653-682.
- [16]. Daling RC, Disant Agenese PA, Perera GA, Anderssen D. Electrolyte abnormalities of sweat in fibrocystic disease of pancreas .Aj Med Sci 1953; 225:67-70
- [17]. Rommens JM, Iannuzzi Mc, Keren BS. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking an jumping. Science 1989; 245: 1059-1065.
- [18]. Holsclaw DS, pe(lmuter AD, Jokin H, Shwachman H. Genital abnormalities in male patients with cystic fibrosis J Urol 1971; 106: 568-74.
- [19]. Faconi G, Uchlinyer E, Knauer C, Das coeliakiesyndrom bei ageborener zystischer pankreas fibromatose and bronchieta sein. Wein Med . Wschr 1936 ; 86 : 763-756.

- [20]. Andersen DH. Cystic fibrosis of pancreas and its relation to celiac disease : a clinical and pathological study. *Amj dis child* 1938; 56: 344-399
- [21]. Stead RJ, Grimmett SFM, Rogers SM, Back DJ, Orme ML, Hodson ME, Pharmacokinetics of contraceptive steroids in patients with cystic fibrosis. *Thorax* 1987; 42:59-64.
- [22]. Simon M, Bourel M, Fauchet R, Geet et B. Association of HLA-A3 and HLA-B14 antigens with idiopathic haemochromatosis. *Gut* 1976; 17:332.
- [23]. Feder JN, Gnirk A, Thomas w, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishiam F, Dominago JR, Ellis E, Myer NC, Mintier GA, Moeller N, Moore T, Morking E, Prass CE, Quintana L, Starnesz SM. A novel MHC class I-like gene is mutated in patient with hereditary haemochromatosis. *Nature genetic* 1996; 13: 399.
- [24]. Andrews NC, Levy JE .Iron is hot : an update on the pathophysiology of hemochromatosis. 1998. 92:1845
- [25]. Brissot p, "le diagnostic de l'hémochromatose a l'heure du test génétique » *La presse médicale*, 4mars 2000/29n° 8
- [26]. Parkila S, Waheed A, Britton RS, Bacon BR, Zhou XY, Fleming R. Association of the transferrin receptor in human placenta with HFE The protein defective in hereditary hemochromatosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Medical sciences* 1997; 94:1398.
- [27]. Olyny K JK, cullen DJ, Aquilia S, ROssiE, Summerville L.Powell LW. A population-based study of the clinical expression of the hemochromatosis gene. *The New England journal of Med.* 1999; 341: 718.
- [28]. Piperno A, Sampietro M, Pietrangelo A. Heterogeneity of hemochromatosis in Italy. *Gastroenterology* 1998; 114:996-925
- [29]. Adams M D, Dubnick M., kerlavage A. R et al. Sequence identification of 2375 human brain genes.1992.*Nature* 355-632
- [30]. Bernaudin F;Verlhac S, Freard F et al. A multicenter prospective study of hemoglobin: radiographic and psychometric correlation PHRC 95. *Hemoglobin* 2000; 15:33-343.
- [31]. Pouvars DR, S-gene cluster B. Sickle cell anemia: polymerisation of globul red. *Seminars in haematology* 1991; 28: 202-8.
- [32]. Nagel RL. Severity. Pathobiology, epistatic effets and genetic markers in sickle cell anemia. *Seminars in haematology* 1991; 28: 180-201
- [33]. Advani R, Sorenson S, Rachimilervitz E, lande wet Schrier SL. Characterization and comparison of the red blood cell membran damage in sever human B – Thalassemia and drepanocytose. 1992; 79: 1058-1063
- [34]. Bouhass R,Perrin PecontalP, trabuchet G. Beta thalassemic mutations in Oran region – *Nouv Rev Fr Hemalol* 1994 ;34 :465
- [35]. Kuhl DP, Pizzutia A et al. "variation of the CGG repeat at the fragile X site resulte in genetic instability : resolution of the Sherman pradox" *cell* 1997; 67 : 1047- 58.

- [36]. Hirst M et Davie K. "Precursor arrays for triplet repeat expansion at the fragile X locus". *Hum Molec. Genet* 1994; 3: 1153-1150.
- [37]. Eberhart DE, Malter H.E, Feng y et warren S.T "the fragile x mental retardation protein is a ribonucleoprotein. Containing both nuclear localization and nuclear export signals" *Hum-Mol. Genet* 1996; 5: 1083- 1091.
- [38]. Mandel JL et coll. Le gène de l'ataxie de Friedreich : des applications diagnostiques et une controverse sans fondement. *Med. Sciences* 1997; 13: 253-4.
- [39]. Robert A, Jack C. FMR1- Related disorders in Gene tests: Medical genetics information resource 5database online). Copyright university of Washington, Seattle 1993-2005.
- [40]. Tuddenham EGO. Molecular biological aspects of inhibitor development. *Vox Sang* 1999; 77:13-6.
- [41]. Lakich D, kazazian HHJR, antonarakis SE, Gitschier J. Inversion disrupting the facteur VIII gene are a common cause of sever hemophilia A. *I* 1993; 5: 236-41.
- [42]. Antonarakis SE and the nomenclature working group. Recommendations for a nomenclature system for human gen mutations *Hum Mutat* 1998; 11: 1-3.
- [43]. Hill FGH et Ljung R. Third and fourth Workshop of the European paediatric network for haemophilia management. *Haemophilia* 2003; 9: 223-8.
- [44]. Briet E, rosendaal FR. Haemophilia A and B. *Semin hematol* 1994; 31:11-5
Brissot p, "le diagnostic de l'hémochromatose a l'heure du test génétique » *La presse médicale*, 4mars 2000/29n° 8
- [45]. Bray GL, Gomperts Ed, courter S, Gruppo R, Gordon EM Manco- Jhonson M et al. A multicenter study of recombinant factor VIII (recombinate): safety, efficacy and inhibitor risk in previously untreated patient with hemophilia A. *Blood* 1994; 83:2428-35
- [46]. Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Gianneli R.Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gen is a frequent cause of sever hemophilia A.*Blood* 2002 ; 99 : 168-174
- [47]. Chelly j, Kplan jc. La myopathie de Duchenne du gène DMD à la dystrophine.*Médecine/sciences* 1998; 2:90-95
- [48]. Emery AE. Duchenne muscular dystrophy-second edition. Oxford Monographe on medical Genetics, 24, oxford Medical publications 1993.
- [49]. Gilgenkrantz H. Dysrophine et myopathies-Pathologie moléculaire expression et therapie génétique. Monographie de l'association française contre les myopathies (AFM) 1993.
- [50]. Prior TW, BArtolo c, Pearl AC, Snyder PJ, sedra MS, Burghes M, Mendeil JR. Spectrum of Small mutation in the dystrophin coding region.*AMJ.Hum.Genet* 1995; 57: 22-33.
- [51]. Ahn AH, Kunkel L M. The structural and functional diversity of dystrophin. 1993.*Nature Genet.*3:283-291.
- [52]. Acsadi G, Lochmuller H, Jani A, Huard J, Massie B, Prescott S, Simoneau M, Petrof BJ, karpati G. Distrophin expression in muscles of mdX mice after adenovirus mediated in vivo gene transfer. *Hun gen transfer.Hum gen ther* 7. 1996; 129-140

- [53]. Matsumura K, Campbell K. Dystrophin glycoprotein complex its role in the molecular pathogenesis.
- [54]. Alonso, A-C, Grundke-Iqbal et Iqbal K. Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *nat.Med.* 2 ; 783-784
- [55]. Smith MA. Alzheimer disease. *Int. Rev. Neurobiol* 1998; 42:1-54
- [56]. Cherny RA, atwood CS, scilinas ME et Al. Treatment with a copper – Zinc chelators and rapidly inhibitor beta-amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice- *Neuron* 201; 30:665-676
- [57]. Thomas P, Magnié MN. *Maladie d'Alzheimer*. Edition Masson. Paris 1997.
- [58]. Schenk D, Barbour R, Dunn W et al. Immunization with amyloid beta attenuates Alzheimer disease. *Nature* 1999; 40:173-7.
- [59]. Hardy JA. Amyloid the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 1997; 20: 154-159
- [60]. Delacourte A, David j p, Sergeant N et al – The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* 1999; 52:1158-1165.
- [61]. Iwatsubo T et Obata K. The presenilin 2 mutation (N141 I) Linked to familial Alzheimer disease (Volga German families) increases the secretion of amyloid beta- Protein ending at the 41 nd (or 43rd) residue. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 2025-2030
- [62]. Freidreich V. Uberdegenerative atrophic der spinalen hinterstrange *Virchows Arch Pathol Anat* 1863; 26: 391-419.
- [63]. Leone M, Brignolio F, Rosso MG, Curtoni ES, Moni A, Tribolo A. Friedrich's ataxia : a description epidemiological study in a Italian population. *Clin Genet* 1980; 38: 161-9.
- [64]. Haeding AE. Friedreich ataxia : a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnosis criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain* 1981; 104: 589-620.
- [65]. Geoffroy G, Barbeau A, Breton G, Lemieux B, Aube M, Leger C, Bouchard JP. Clinical description and roentgenologic evaluation of patients with freidreich ataxia. *Can J Neurol Sci* 1976; 3: 279-86
- [66]. Mandel JL et coll. Le gène de l'ataxie de Friedreich : des applications diagnostiques et une controverse sans fondement. *Med. Sciences* 1997; 13: 253-4.
- [67]. Chamberlain S, Shaw , Rowland A, chow L, Farral M, keats B, Richter A, Roy M, Melançon S, denfel T, Berciano j, Williamson R. Genetic homogeneity at the friedreich ataxia locus on chromosome 6. *Am j Hum Genet* 1989; 44: 518-21
- [68]. Campuzanov, montermini l, Molto md, pianese L, cossée M Friedreich ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion- *science* 1996; 271: 1423-1427

- [69]. Babcock M, Silva D, chènes R. Règlements de l'accumulation mitochondriale de fer par YFH 1p, un homologue putatif de frataxin. *La science* 1997; 276: 1709-1712
- [70]. Wexler NS, et al. Venezuelan Kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age onset. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101(10):3498-3503.
- [71]. Van Dellen A, Hannan AJ. Genetic and environmental factors in the pathogenesis of Huntington's disease, *Neurogenetics* 2004; 5(1):9-17.
- [72]. Duyao M, et al. Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease-*Nat. Genet.* 1993; 4(4): 387-392
- [73]. Djousse L, et al. Interaction of normal and expanded CAG repeat sizes influences age at onset of Huntington's disease. *Am.J.Med.Genet* 2003;15; 119 A(3): 279-82
- [74]. Almqvist E, Telenius H, Nichol K, Bourdeltat-parcs B, YP de Goldberg, BR de haddad, Richards F, silence D, CR de Greenberg, Ives E, Van den Engh G, Hughes M. Contribution de l'ordre de l'AND et de la taille de CAG aux fréquences de mutation des allèles intermédiaires pour la maladie de Huntington : Evidence d'analyse simple de sperme. *Fredonnement Molec Genet* 1997; 6 : 301-309.
- [75]. Nance MA, Mathias-Hygen V, Mehe MJ, Hc Glennen RC. Analyse d'une répétition très grande de trinucleotide dans un patient présentant la maladie de Huntington Juvénile. *Neurologie* 1999 ; 52 : 392-4
- [76]. Jacqueline E. *Biochimie génétique biologie moléculaire* 1999: 375
- [77]. Josue F, Marc F, Michel S. *Principe de génétique humaine* 1998 ; 151-152.
- [78]. Riordan JR, Rommens JM, Kern BS. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of the complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066-1075.
- [79]. Kern B-S, Rommens JM, Buchanan JA. Identification of the cystic fibrosis gene : genetic analysis. *Science* 1989; 254 : 1073-80
- [80]. Benther E. The significance of the 187 G (H63D) mutation in the hemochromatosis. *Blood cells Mol. Dis* 1997; 23: 135 -145.
- [81]. Efremov DG et Dimovski Aj. Detection of beta- thalassemia mutations by PCR amplified DNA with digoxigenin dUTP labeled oligonucleotide. *Hemoglobin* 1991; 15: 325-533.
- [82]. Laradi- chebil S, Pousse H, Hhelif A, KOrtas M, Ghanem N. Dépistage des hémoglobinopathies et analyse moléculaire des beta thalassémies en Tunisie centrale. *Arch Rédiatr* 1994 ; 1 : 1100-5
- [83]. Mornet E et Simon. Bouy B. *Biologie moléculaire du syndrome de l'X fragile : données récentes et applications diagnostiques.* *Archives de pédiatrie* 1996 ; 3 : 814 – 821.
- [84]. Oldenburg J, Rost S, Leuer M, Olek K. The new factor 8 gene intron inversion in a female carrier presents as a somatic mosaicism. *Blood* 2000; 96: 2905
- [85]. Liu Q, Sommer SS- Subcycling- PCR for multiplex long and distance amplification to the inversion hotspot in the factor VIII gene- *Biotechniques* 1998; 25: 1022- 1028.

- [86]. Miller SA. Densité double de digues, a haute fréquence de polesky. Une procédure simple de salage pour extraire l'ADN à partir des cellules nucléés humaines, recherche d'acides nucléiques 1988 ; 16 : 1215.
- [87]. Sodeyama N, Iwata T; Ishikawa K, Mizusawa H et al. Very early onset Alzheimer's disease with spastic paraparesis associated with a novel presenilin 1 mutatio 2001; 71:556-7
- [88]. Taddei K, kowk JBJ, Kril JJ, Hallup et al. Two novel presenilin-1 mutations (Ser 169 Leu and 436 Gln) associated with very early onse Alzheimer's disease. Neuroreport 1998; 9: 3335-9.
- [89]. Epplen c, Epplen J T, Frank G, Miltersi B, Santos EJ M. stabilité différentielle de schols L. sur (GAA) la région de n dans le gène de l'ataxie de Friedreich (STM7). Fredonnement Genet 1997 ; 99 : 834-836.
- [90]. Theilman J, Zeisler J, M. de Hayden. Un polymorphisme de repetition de CCG a coté dela repetition de CAG dans le gene de la maladie de hyntington: implication de l'exactitude diagnostique et l'essai prédictif. Mole de genet de fredonnement 1994 ; 3 :65-67.
- [91]. Leggo J ; coles R, Almaqvist E, Biancalana V, Cassiman J-J, Chotai K, Conna M, Abbott MH et coll. Caractéresation phenotipique Hayden des individus avec 30-40 répétition de CAG deans le gene de la maladie de Huntington indique des cas de HD avec 36 répétitions et vieux individfus apparent normaux avec 36-39 répétition. Fredonnement Genet 1996 ; 59 : 16-22
- [92]. Fung D, Trent RJ. Applications de l'electrophorese capillaire dans l'analyse de mutation des desordres génétiques. Mole de patholl 1997 ; 50 : 261-265.
- [93]. Zeisler J, Almqvist E, Sillence D, Richards F, Gacy AM, Telenius H. De Hayden a augmenté l'instabilité des allèles intermédiaires dans les familles, la maladie de Huntington est comparée aux allèles intermédiaires classés semblables dans la population générale. Fredonnement Mole Genet 1997 ; 6 :301-309.

Encadreur : Dr RECHRECHE Hocine
Jury : Mr AICHEUR Ridha

Date de soutenance : Juin 2007
Réalisé par :

- * CHAALEL Madiha
- * MEDBOUH Nadira
- * MOUBAREK Yamina

Résumé

Le diagnostic moléculaire des maladies héréditaires, notamment précoce, a rendu possible la prise en charge des patients aux premiers stades de la maladie et donc le traitement efficace d'un certain nombre de ces pathologies. Il est basé sur les techniques de l'ADN recombinant dont la technologie de PCR (Polymerase Chain Reaction). Celle-ci permet l'amplification de l'ADN de façon économique, efficace et rapide de sorte qu'il est devenu très facile d'identifier les altérations (mutations) des séquences d'ADN liées à une maladie et/ou à l'augmentation des risques de son développement.

Summary

The molecular diagnosis of the hereditary diseases, especially the early one has already opened the possibility of treating some genetic diseases. It's based on the recombinant DNA techniques, such as the of technique of PCR (Polymerase Chain Reaction). This method allow economic, efficient and quick DNA amplification. Therefore, we are able to identify alterations (changes) in DNA sequences which are related to one disease or implicated in increasing the risks of it's development .

الملخص

إن التشخيص الجزيئي للأمراض المتنقلة وراثيا قد فتح إمكانية علاج بعضا منها فهو يعتمد على استخدام تقنيات الحامض النووي الـديزوكسي ريبوي (الـADN) المهندسة خاصة تقنيّة تفاعل البوليمراز التتابعي (الـPCR). هذه الأخيرة تسمح بمضاعفة الـADN بطريقة اقتصادية، فعالة و سريعة. وبالتالي يمكن تحديد هوية الاختلالات (التغيرات) في سلاسل الـADN التي قد تكون مرتبطة بمرض معين أو أنها تساهم في رفع أخطار الإصابة به.

Mots clés

Diagnostic, maladie héréditaire, mutation, PCR, gène, ADN.