

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed BOUDIAF
Faculté des Sciences de la nature et de la vie
Département de Génétique Moléculaire Appliquée



Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Génétique

Spécialité : Biologie Moléculaire

Intitulé du Master : MASTER ACADEMIQUE GENETIQUE

Polycopié de la matière: Génétique et pathologie moléculaire

Semestre: S2

Intitulé de l'UE: UEF1

Crédits: 4

Coefficients: 2

Année Universitaire : 2017-2018

Avant-propos :

La matière Génétique et pathologie moléculaire appelée dans l'ancien canevas Biologie Moléculaire Appliquée II, est une application de toutes les connaissances acquises durant le 1er semestre avec le module Biologie Moléculaire Appliquée I. En effet, ce module permet d'étudier en profondeur différentes pathologies humaines sur leurs différents aspects : Clinique, génétique, épigénétique et éventuellement traiter les différentes techniques de biologie Moléculaire pour le diagnostic, pronostic et le traitement de ses pathologies.

Ce module permet aux étudiants d'intégrer des notions relatives aux méthodes d'analyse et approches technologiques et d'assurer une formation pratique dans le domaine de la pathologie moléculaire à visée diagnostique avec pour champs d'application la génétique moléculaire.

Organisation des chapitres :

Le premier chapitre porte sur les **Applications du Diagnostic Génotypique** qui comprend deux grand volets, le premier portant sur les **Maladies Constitutionnelles complexe** telles que les Hémoglobinopathies, l'Hémophilie, les Myopathies et enfin la Mucoviscidose, et le second sur les **pathologies infectieuses** qui traitent de l'épidémiologie infectieuse des pathologies bactériennes et virales. Le chapitre 2 quant à lui, fournit un aperçu des **mécanismes épigénétiques** et de leurs **liens avec la chromatine**. Les différentes fonctions du noyau impliquant le génome et son organisation et l'intervention des facteurs environnementaux seront discutées en insistant sur les limites technologiques et les nouvelles approches expérimentales développées.

Table des matières:

Chapitre 1 : Applications du Diagnostic Génotypique :

1. Maladies Constitutionnelles :

- Hémoglobinopathies
- Hémophilie
- Myopathies
- Mucoviscidose

2. Maladies Infectieuses :

- Bactériennes
- Virales

Chapitre 2: épigénétique

- Mécanismes moléculaires de l'épigénétique
- Méthodes d'études de la méthylation
- Méthodes d'études de l'acétylation
- Petits ARN et régulations
- Modéficacion épigénétique et effet transgénérationnels
- Epigénétique et facteurs environnementaux/ Mode de vie.
- Alimentation
- Perturbateurs endocriniens
- Tabac

Sommaire

Chapitre I.....	1
Applications du Diagnostic Génotypique	1
Maladies Constitutionnelles	2
A. Hémoglobinopathies.....	3
I. Généralités et définitions	3
1. L'hémoglobine	3
2. Les hémoglobinopathies	3
II. Rappels structuraux	4
1. Structure de l'hémoglobine	4
2. La structure des gènes de l'hémoglobine	5
III. Composantes du diagnostic clinico-biologique	8
1. Circonstances de diagnostic d'une hémoglobinopathie	8
2. Prélèvement	9
3. Approche clinique	9
4. Les techniques biologiques d'exploration des hémoglobinopathies	9
b. Techniques spécifiques d'exploration des hémoglobinopathies	10
IV. Quelques tableaux clinico-biologiques d'hémoglobinopathies	11
1. Les thalassémies	11
a. Les β -thalassémies	11
b. Les α -thalassémies.....	15
B. L'hémophilie.....	21
I. Introduction.....	21
II. Classification des coagulopathies acquises et congénitales.....	21
III. Les Pathologies acquises de la coagulation	22
1. L'hémophilie A	22
a. Aspect moléculaire de l'hémophilie.....	24
a1/ Description du gène F8.....	24
a2/ Anomalies génétiques responsables de l'hémophilie A.....	24
2. L'hémophilie B	27
3. Les femmes hémophiles :	28
a. Le diagnostic des conductrices et le diagnostic anté-natal	29
4. Corriger les anomalies par thérapie génique:	29
C. Les Myopathies.....	31

<i>I. Introduction</i>	31
1. Les myopathies d'origine génétique	31
2. Les myopathies acquises	31
3. Les dystrophinopathies	32
4. Approches thérapeutiques	38
5. Traitement pharmacologique.....	39
6. Thérapies géniques	39
D. La Mucoviscidose	42
<i>I. Introduction</i>	42
1. Le gène cftr et ses mutations	43
2. Les classes de mutations	45
3. Les relations génotype/phénotype	45
4. Diagnostic moléculaire	46
Maladies Infectieuses	49
<i>I. Définition</i>	50
<i>II. Les différents agents pathogènes</i>	50
1. Caractéristiques des différents agents pathogènes	51
2. Symptomatologie	52
3. Rapports avec le corps humain.....	53
4. Traitements	54
5. Infections et maladies	55
Chapitre II	
<i>I. Introduction a l'épigénétique</i>	59
<i>II. Mécanismes moléculaires et épigénétique</i>	59
1. La méthylation des cytosines	60
2. Modification des histones	62
<i>III. Méthodes d'études de la méthylation</i>	64
1. Méthylation specific PCR (MSP)	64
2. Séquençage bisulfite (BS-seq).....	64
<i>IV. Méthodes d'études de l'acétylation</i>	65
1. Anticorps contre les histones modifiées et ChIP	65
2. ChIP on ChIP	66
<i>V. Petits ARN et régulations</i>	67
1. Mode d'action de l'interférence	68
<i>VI. Epigénétique et mode de vie : lien entre l'environnement et</i> <i>génomme</i>	70

Chapitre I
Applications du
Diagnostic
Génotypique

Maladies Constitutionnelles

A. Hémoglobinopathies

I. Généralités et définitions :

1. L'hémoglobine :

L'hémoglobine appartient à la famille des pigments respiratoires qui sont des macromolécules protéiques fixant réversiblement l'oxygène et qui se sont développées aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés. Outre son rôle principal dans le transport de l'oxygène des poumons aux tissus, l'hémoglobine est impliquée dans l'élimination du gaz carbonique et le maintien du pH intra-érythrocytaire.

2. Les hémoglobinopathies :

Ce sont des maladies génétiquement déterminées qui constituent un problème de santé publique dans de vastes parties du monde. Les praticiens sont confrontés de plus en plus souvent à ces affections en raison des migrations de populations. Ils doivent poser un diagnostic précis pour prendre en charge les patients, donner un conseil génétique et, si nécessaire, porter un diagnostic prénatal.

Les anomalies de l'hémoglobine se répartissent en deux grands groupes :

- **Les anomalies de structure de la protéine**, responsables d'anémies, plus rarement de polyglobulie ou de cyanose. C'est dans cette catégorie que se situe la drépanocytose par exemple.
- **Les anomalies de synthèse des chaînes de globine** : ce sont d'une part les syndromes thalassémiques (α -thalassémies dues à un déficit de synthèse des chaînes α , et les β -thalassémies résultant d'un déficit de synthèse des chaînes β) et d'autre part les persistances héréditaires de l'hémoglobine fœtale.

Les deux types d'anomalies peuvent être intriqués : ce sont par exemple les syndromes thalasso- drépanocytaires. Les mécanismes moléculaires responsables de ces anomalies sont multiples. Il existe une grande diversité des syndromes cliniques.

II. Rappels structuraux :

1. Structure de l'hémoglobine (figure 01) :

L'hémoglobine humaine comporte une partie protéique : les chaînes de globine, au nombre de quatre et identiques deux à deux (deux chaînes de type alpha et deux chaînes de type beta), unies par des liaisons non covalentes et une partie non protéique : l'hème.

Dans la structure tétramérique, les dimères sont disposés de telle sorte que la sous-unité α_1 soit en contact avec la sous-unité β_2 et α_2 de β_1 . Le contact est rigide entre les sous-unités d'un même dimère $\alpha_1\beta_1$ ou $\alpha_2\beta_2$. Le contact entre les chaînes alpha, au niveau de la cavité centrale, est établi par l'intermédiaire d'une molécule de 2,3-diphosphoglycérate (2,3-DPG) et stabilise la configuration désoxygénée. Lors de la transition de l'état désoxygéné, le 2,3-DPG est expulsé de la cavité centrale.

Les sous-unités protéiques ont une surface externe, en contact avec le milieu aqueux ambiant, constituée de résidus hydrophiles alors que les régions internes comprennent des résidus hydrophobes qui, en échangeant un très grand nombre de liaisons de faible énergie, stabilisent l'édifice moléculaire.

La molécule d'hème est logée dans une cavité en forme de V de chaque sous-unité de globine. C'est une protoporphyrine ayant à son centre un atome de fer sous forme réduite, qui peut fixer de façon réversible un atome d'oxygène (Whitehead et al. 1998) (Ataga et al. 2004)

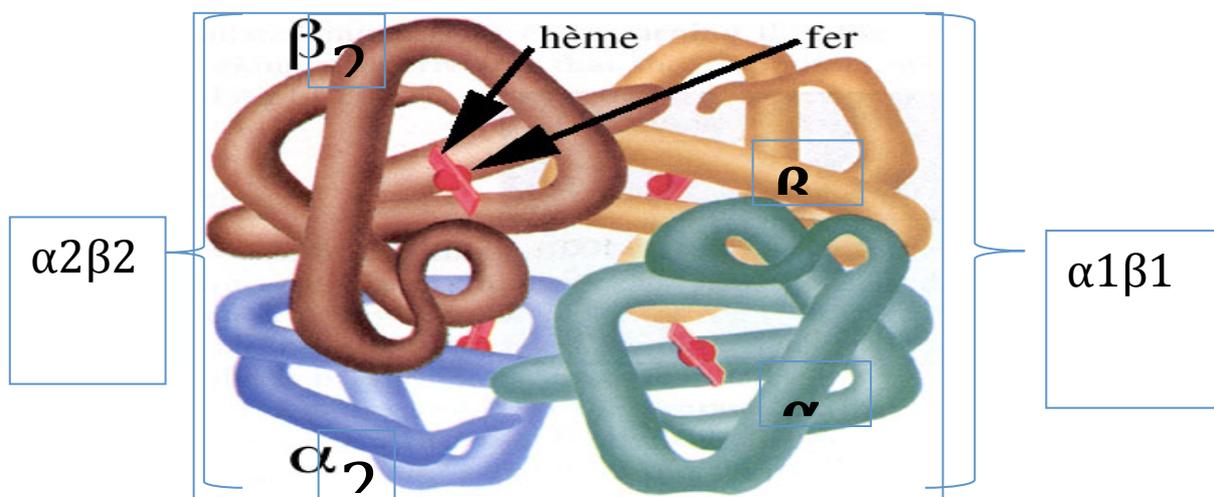


Figure 01 : Structure de l'hémoglobine:

2. La structure des gènes de l'hémoglobine :

Les gènes de la famille α sont situés sur le chromosome 16 et ceux de la famille β sur le chromosome 11. La famille α comporte trois gènes et la famille β cinq. Il existe de plus des séquences similaires à celles des gènes ne codant pour aucune chaîne polypeptidique (pseudogènes). Comme d'autres gènes, ceux de la globine sont constitués par des zones codantes et des zones non codantes (**Figure 02**).

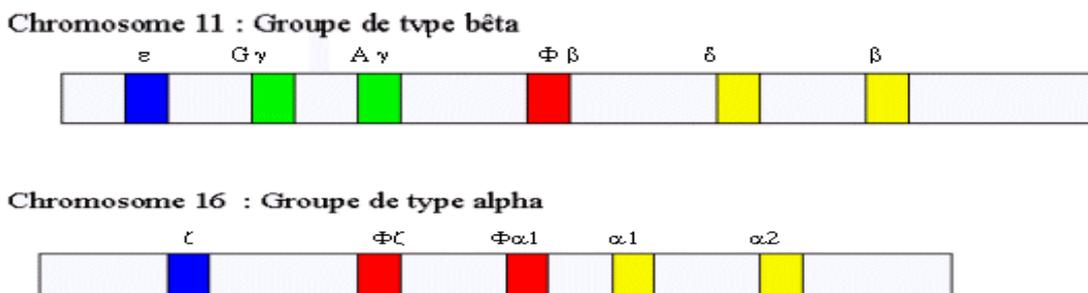


Figure 02 : La structure des gènes de l'hémoglobine

L'ordre des gènes de 5' en 3' sur le chromosome correspond à l'ordre de leur expression au cours du développement. En effet le profil électrophorétique des hémoglobines varie au cours de la vie (**figure 03**):

- chez l'embryon, trois hémoglobines coexistent :
 - Hb Gower 1 ($\zeta_2\epsilon_2$)
 - Hb Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$)
 - Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$)
- Chez le fœtus apparaît l'hémoglobine fœtale ($\alpha_2\gamma_2$). Les chaînes γ sont produites par deux gènes dupliqués : $G\gamma$ et $A\gamma$, après la naissance, l'hémoglobine F diminue rapidement :

Le statut hémoglobinique adulte est atteint, en principe, entre l'âge de 1 et 2ans, et comporte :

- HbA1 ($\alpha_2\beta_2$) \approx 97
- Hb A2 ($\alpha_2\delta_2$) \leq 3,1

- Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) $\leq 1\%$

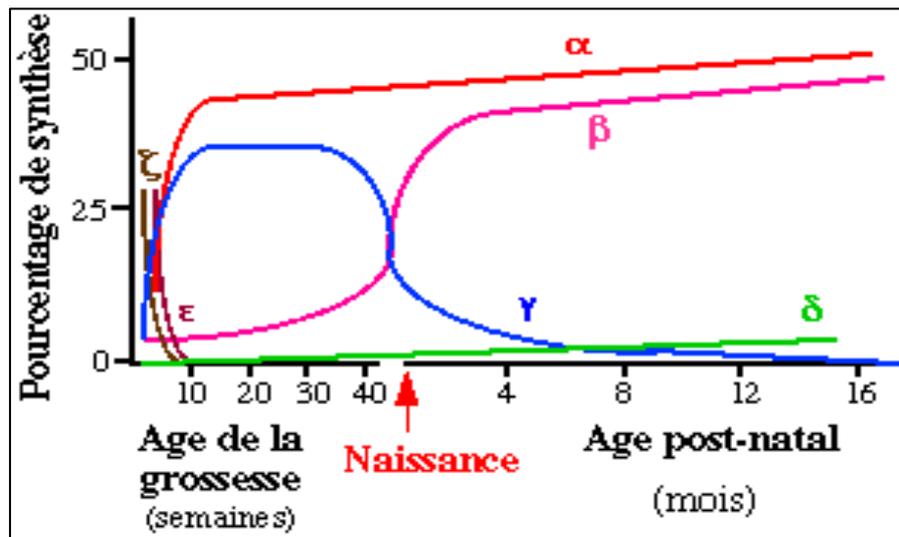


Figure 03: le profil électrophorétique des hémoglobines durant la vie.

Les globines humaines sont des molécules homologues, leurs gènes appartiennent à une famille de gènes, la famille des globines

Les séquences nucléotidiques ou les séquences peptidiques des globines humaines présentent un degré de similitude qui ne peut être dû au hasard. Les globines sont donc des protéines homologues ainsi que les gènes qui les codent. Tous ces gènes dérivent d'un même gène ancestral (**figure 04**).

```

Beta.pro   FGKEFTPPVQAAYQKVVAGVANALAHKYH-----
Delta.pro  FGKEFTPQMQAAYQKVVAGVANALAHKYH-----
gammaG.pro FGKEFTPEVQASWQKMVTAVASALSSRYH-----
gammaA.pro FGKEFTPEVQASWQKMVTAVASALSSRYH-----
Epsilon.pro FGKEFTPEVQAAWQKLVSVAIALAHKYH-----
Alpha1.pro LPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSKYR-----
Alpha2.pro LPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSKYR-----
Theta.pro  YPGDFSPALQASLDKFLSHVISALVSEYR-----

Myoglob.pro HPGDFGADAQGAMNKALELFRKDMASNYKELGFQG
    
```

Figure 04 : Alignement des différentes séquences des gènes de la famille des globines.

- La phylogénie des gènes de la famille des globines (figure 05) :

Chaque nœud de cet arbre correspond à une duplication génique, suivie d'une évolution indépendante des deux duplicata par fixation de mutations différentes (les mutations apparaissant au hasard). Cet arbre permet de retrouver les 2 groupes de globines : le groupe alpha et le groupe bêta.

Tous les Vertébrés, à l'exception des Agnathes, ayant deux gènes de globine (alpha et bêta) et les plus anciens poissons étant datés d'environ 450 mA alors que les premiers Vertébrés sont apparus il y a environ 550 mA, on en déduit que la première duplication a dû avoir lieu entre ces deux dates.

La myoglobine diffère des sous-unités alpha et bêta de l'hémoglobine, plus que celles-ci ne diffèrent l'une de l'autre, ce qui indique que la myoglobine a divergé avant l'apparition des gènes a et b.

La myoglobine est une protéine des vertébrés formée chez l'homme d'une chaîne unique de 153 acides aminés, contenant un noyau porphyrique avec ion fer II au centre. Elle est le transporteur intracellulaire principal de l'oxygène dans les tissus musculaires et stocke l'oxygène dans les muscles. Elle est aussi impliquée dans la dégradation du NO, molécule très réactive et oxydante produite lors du processus de respiration oxydative.

À la différence de l'hémoglobine, à laquelle elle est apparentée structurellement, cette protéine est monomérique (formée d'une seule sous-unité). Sa couleur rouge et son abondance dans certains muscles ou chez certaines espèces expliquent la différence d'apparence entre viande blanche et viande rouge

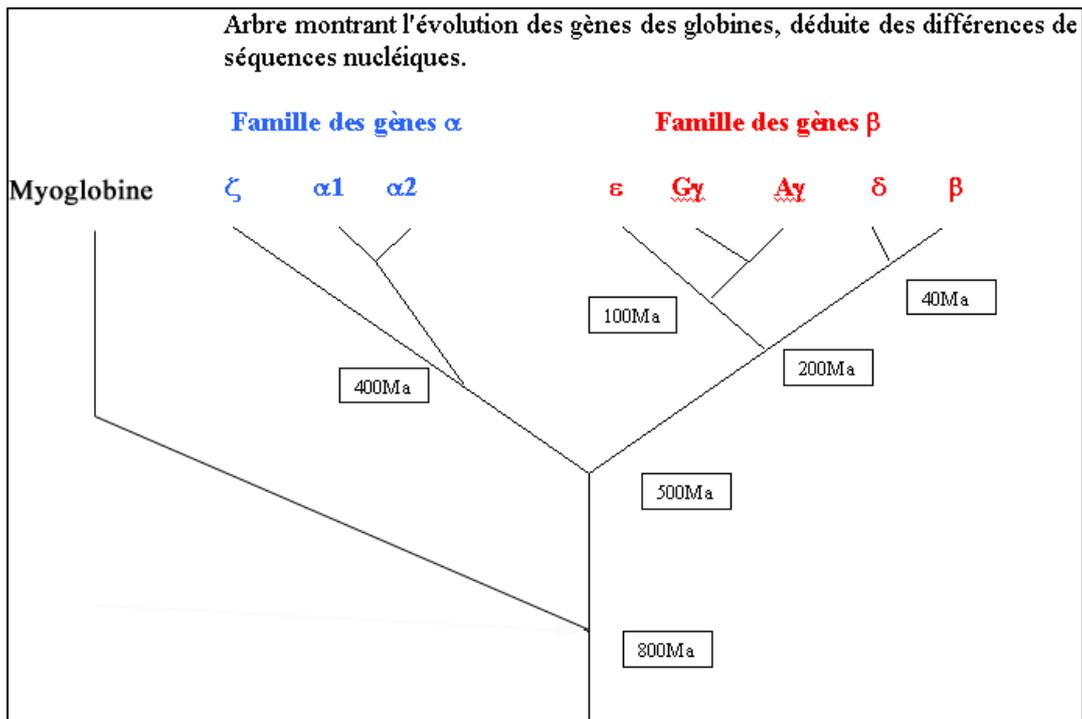


Figure 05 : Arbre montrant l'évolution des gènes des globines, déduites des différences de séquences nucléiques

III. Composantes du diagnostic clinico-biologique :

1. Circonstances de diagnostic d'une hémoglobinopathie :

Les situations amenant à étudier une hémoglobinopathie sont multiples et comprennent :

- le diagnostic étiologique d'anomalies biologiques :
 - anomalies hématologiques au niveau d'un frotti sanguin,
 - signes d'hémolyse,
 - fraction hémoglobinique anormale sur le tracé chromatographique pour dosage de l'hémoglobine glyquée.
- le diagnostic étiologique d'anomalies cliniques :
 - anémie hémolytique (lithiase vésiculaire),
 - polyglobulie,
 - cyanose.
- l'enquête familiale, suite à la découverte d'une hémoglobinopathie

- la recherche systématique chez les nouveau-nés de certaines maternités.

2. Prélèvement :

Pour la plupart des explorations d'une hémoglobinopathie, un tube de sang total recueilli sur EDTA suffit. Le diagnostic d'une drépanocytose chez un nouveau-né peut même être réalisé sur un échantillon d'une centaine de microlitres de sang. L'idéal est de travailler sur du sang frais. Le délai de conservation au-delà de trois ou quatre jours peut faire apparaître des fractions hémoglobiniques dénaturées qui peuvent poser des problèmes diagnostiques avec certaines hémoglobines en très petite quantité ; de même, la méthémoglobine, qui représente moins de 1 % de l'hémoglobine à l'état normal, peut augmenter dans les prélèvements vieillis.

3. Approche clinique :

Signes d'anémie : pâleur cutanéomuqueuse, asthénie, souffle cardiaque signes d'hémolyse : splénomégalie, lithiase vésiculaire

4. Les techniques biologiques d'exploration des hémoglobinopathies :

a. Données biologiques de base :

Hémogramme hémoglobine

- nombre d'hématies
- volume globulaire moyen
- teneur hémoglobinique corpusculaire
- morphologie érythrocytaire: cellules cibles, drépanocytes, poikilocytose, microcytose, hypochromie
- inclusions érythrocytaires : corps de Jolly, ponctuations basophiles, corps de Heinz réticulocytes, érythroblastes
- leucocytes
- plaquettes

b. Techniques spécifiques d'exploration des hémoglobinopathies :

5. Techniques électrophorétiques et chromatographies :

- ***Electrophorèse sur acétate de cellulose à pH alcalin :***

C'est la technique standard la plus simple à mettre en œuvre. Elle sépare les différentes hémoglobines en fonction de leur charge et de la position de l'acide aminé muté dans la molécule. Elle permet une bonne séparation des différentes fractions hémoglobiniques normales : A, F, Aet le dépistage des syndromes thalassémiques.

Cependant il faut doser l'hémoglobine A pour confirmer le diagnostic de β - thalassémie et utiliser un autre système de séparation pour identifier les hémoglobines anormales. Un tracé normal n'exclut pas une hémoglobinopathie.

- ***Electrophorèse sur agar à pH acide :***

Cette technique complète l'électrophorèse à pH alcalin. La migration d'une hémoglobine anormale en agar dépend d'abord de la localisation de la mutation et secondairement du changement de charge ; cette migration résulte de l'électroendosmose, de la liaison à l'agaropectine et de l'effet de l'ion citrate.

- ***Chromatographie liquide à haute performance :***

Des systèmes complètement automatisés peuvent être utilisés, comme le Variant qui est une CLHP par échange de cation avec détection des composés élués à double longueur d'onde (415/690nm)

- ***Focalisation isoélectrique ou isoélectrofocalisation :***

L'isoélectrofocalisation est une technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient de pH, sous voltage élevé. Les hémoglobines sont séparées grâce à leur point isoélectrique. La visualisation définitive des fractions hémoglobiniques est réalisée par une brève fixation par l'acide trichloracétique.

- ***Electrophorèse des chaînes de globine :***

Cette électrophorèse est réalisée en gel de polyacrylamide en milieu acide dissociant, c'est-à-dire en présence d'urée 8M et d'un détergent le Triton-X100

Cette technique met en évidence toute substitution d'acides aminés impliquant une différence d'hydrophobicité de la chaîne latérale de l'acide aminé concerné, même en l'absence de différence de charge. Elle permet de séparer les deux chaînes gamma qui ne diffèrent entre elles que par un résidu méthyl (γ^{136} Ala ou Gly).

- **Explorations génomiques :**

- ***Polymerase Chain Reaction***

Des techniques d'amplification de l'ADN à l'aide d'amorces judicieusement choisies permettent de faire apparaître sur l'électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide, des produits d'amplification de tailles différentes selon la présence ou l'absence d'une mutation ou d'une délétion.

IV. Quelques tableaux clinico-biologiques d'hémoglobinopathies :

1. Les thalassémies :

Les thalassémies sont définies par un déficit total ou partiel de synthèse de chaînes de l'hémoglobine. Elles peuvent concerner toutes les chaînes de l'hémoglobine. Nous nous limiterons aux thalassémies suivantes : α , β , et $\alpha\beta$ -thalassémies.

a. Les β -thalassémies :

a1/ Répartition géographique :

Les plus fortes densités de β -thalassémies sont décrites sur le pourtour méditerranéen : Italie, Sardaigne, Sicile, Grèce (la fréquence du trait est de l'ordre de 8 % de la population), Afrique du Nord, Proche et Moyen-Orient sauf le Japon. En Afrique intertropicale, la fréquence varie de 1 à 5 % selon les régions.

En France, 36,5 % des sujets originaires de pays à haut risque pour les β -thalassémies résident dans la région parisienne et 63,5 % en province (D. Lena-Russo, 1992).

a2/ Physiopathologie des β -thalassémies :

Les β -thalassémies sont définies par un déficit total ou partiel en synthèse de chaînes de l'hémoglobine. On distingue les β^0 -thalassémies (absence de synthèse) et les β^+ -thalassémies (présence d'une synthèse diminuée).

En raison de l'absence ou de la diminution de synthèse des chaînes β , le tétramère hémoglobinique normal est peu ou pas formé et les chaînes α non appariées, moins solubles, précipitent et altèrent l'érythroblaste provoquant sa destruction. Les troubles sont davantage liés à la dysérythropoïèse qu'à l'hémolyse. La précipitation des chaînes libres s'effectue dès les étapes précoces de l'érythrogenèse. Il s'en suit une érythropoïèse inefficace ainsi qu'une prolifération du tissu érythroïde.

Cependant dans les hématies du sang périphérique, la précipitation des chaînes α libres conduit à des altérations membranaires et à une hémolyse.

La chaîne δ n'étant synthétisée qu'en faible quantité, la seule compensation possible est une production accrue des sous-unités γ , qui constituent, associées aux sous-unités α , l'hémoglobine F. L'hémoglobine F circulante, quantitativement insuffisante et ayant une affinité élevée pour l'oxygène, ne peut corriger le défaut d'oxygénation des tissus. L'anoxie tissulaire, à l'origine d'une stimulation de la synthèse de l'érythropoïétine, accroît encore le processus érythropoïétique.

a3/ Classification des lésions moléculaires des β -thalassémies :

- les lésions moléculaires à l'origine des β -thalassémie sont nombreuses et la liste ne peut en être exhaustive.
- Les délétions étendues : elles sont rares (contrairement au cas des β -thalassémies).
- les les mutations non-sens : Elles aboutissent à l'apparition d'un codon de terminaison prématurée (par exemple : apparition d'un codon-stop β^0 39).
- les mutations décalantes du cadre de lecture par insertion ou délétion d'une ou de plusieurs bases (mutations « frame-shift »).
- les mutations affectant l'épissage normal du transcrit primaire en ARN messenger : anomalie de la charnière exon-intron, anomalies de séquences consensus, anomalies à l'intérieur d'un intron

- les mutations dans le promoteur du gène
- les mutations dans le site de polyadénylation (extrémité 3' de l'ARN messager)
- les mutations du site CAP (extrémité 5' de l'ARN messager)
- les mutations du codon d'initiation
- des hémoglobines hyper-instables peuvent entraîner une β -thalassémie comme l'hémoglobine Cagliari β 60 [E4] Val \rightarrow Glu, par exemple.
- certaines hémoglobines anormales comme l'hémoglobine E (26 [B8] Glu \rightarrow Lys) ou l'hémoglobine Knossos (β 27 [B9] Ala \rightarrow Ser) s'accompagnent d'un syndrome thalassémique.

a4/ Classification clinique des β -thalassémies :

- β -thalassémie homozygote :

La forme homozygote habituelle est l'anémie de Cooley. La maladie apparaît au cours des premiers mois de la vie lorsque s'effectue la commutation entre hémoglobine fœtale et hémoglobines adultes. Elle se traduit par un syndrome anémique très sévère, une hépato-splénomégalie, un retard de croissance. Non traitée, la maladie évolue spontanément vers le décès en quelques mois ou années dans un tableau d'anémie parfois aggravé par des infections intercurrentes. Cette pathologie nécessite des transfusions sanguines régulières accompagnées d'un traitement chélateur du fer et généralement d'une splénectomie en attendant une greffe de moelle.

- β -thalassémie intermédiaire :

La définition de cette entité est purement clinique : elle est caractérisée par une bonne tolérance à l'anémie sans asthénie. Le retentissement sur l'état général est le plus souvent modéré. Cependant la puberté est souvent retardée, mais généralement complète. La splénomégalie est habituelle dans ces formes de thalassémie ; elle peut évoluer vers un hypersplénisme et rendre compte des besoins transfusionnelles.

Sur le plan génétique, il peut s'agir d'une anomalie homozygote dans laquelle le déséquilibre de synthèse des chaînes de globine est plus modéré que dans les β^0 -thalassémies. Mais certaines β -thalassémies intermédiaires surviennent chez des hétérozygotes dans le cadre de certaines mutations du troisième exon en particulier.

- ***β-thalassémie mineure :***

C'est la forme la plus souvent observée chez les sujets hétérozygotes. La traduction en est essentiellement hématologique avec une discrète anémie microcytaire pseudo-polyglobulique. Toutes les complications des β-thalassémies intermédiaires peuvent être observées mais leur fréquence et leur gravité sont infiniment moindres : splénomégalie, ulcères de jambes, lithiase vésiculaire.

- ***β-thalassémie silencieuse :***

Il s'agit d'une forme inapparente de β-thalassémie, même sur le plan hématologique et l'hémoglobine A2 peut être normale. Cette forme est déduite de l'étude familiale. Sur le plan moléculaire, il s'agit de certaines mutations du promoteur diminuant faiblement la transcription du gène β.

• ***Explorations phénotypiques et moléculaires de l'hémoglobine :***

Dans la forme hétérozygote, la **chromatographie de l'hémoglobine** est essentielle et montre un taux d'hémoglobine A2 supérieur à 3,4 % ; le taux d'hémoglobine F est supérieur à 1 % dans environ la moitié des cas. Le diagnostic est difficile quand sidéropénie et β -thalassémie mineure coexistent chez un même patient car la carence martiale provoque une diminution du taux de l'hémoglobine A2. Il convient alors de renouveler l'exploration biologique après un traitement martial suffisant.

Dans la β -thalassémie homozygote, la chromatographie montre exclusivement de de l'hémoglobine A2 et de l'hémoglobine F. Il convient de confirmer ces fractions hémoglobiniques dans un deuxième système de migration comme **la focalisation isoélectrique**. L'étude phénotypique familiale est importante à ce stade.

C'est la **biosynthèse *in vitro* des chaînes de globine** qui assure le diagnostic de certitude. Le diagnostic précis de la mutation au niveau de l'ADN est réalisé par des techniques d'**amplification PCR, hybridation** avec des sondes oligonucléotidiques spécifiques, analyse électrophorétique des produits d'amplification et éventuellement séquençage.

c. Les α -thalassémies :

b1/ Répartition géographique :

Elles ont une fréquence encore plus importante que les β -thalassémies en Afrique, en Asie et autour de la Méditerranée. En général, elles n'ont de conséquence clinique que dans les formes où trois ou quatre gènes α sont anormaux ou absents. La délétion des quatre gènes α concerne particulièrement les populations du Sud-Est asiatique.

b2/ Physiopathologie et classification des lésions moléculaires :

Les α -thalassémies traduisent un défaut d'expression d'un ou de plusieurs gènes codant pour les chaînes α de globine. Le mécanisme moléculaire le plus souvent incriminé est la délétion des gènes α . Des mutations ponctuelles affectant la transcription ou la traduction de la chaîne α ont été également décrites (Higgs, 1993).

- *Les α -thalassémies délétionnelles :*

Elles sont liées à une perte de matériel génétique. Celles-ci sont secondaires à des phénomènes de recombinaison génétique inégale entre les chromosomes homologues 16.

- *Les α -thalassémies non délétionnelles :*

Les causes en sont multiples :

- mutation déclante du cadre de lecture (mutations « frameshift »)
- épissage aberrant par délétion de nucléotides au niveau d'introns
- perturbation de l'extrémité 3' de l'ARN messager au niveau du site de polyadénylation
- mutation dans le codon de terminaison avec élongation de chaîne et production de globine hyperinstable (par exemple : hémoglobine Constant Spring).

- *Les α -thalassémies acquises :*

Il a été décrit quelques cas d' α -thalassémie acquise : hémoglobinose H associée à un syndrome de prolifération leucémique, le plus souvent chez des sujets âgés de sexe masculin. Le mécanisme moléculaire responsable de l'absence de synthèse des chaînes α dans ces

érythrocytes anormaux est encore totalement inconnu (Ragusa et al. 2003) .

b3/ Classification clinique des α -thalassémies :

- *Anasarque fœtal de Bart :*

Il s'agit de l'absence totale de gène α fonctionnel. Cette anomalie est à l'origine d'une anémie hémolytique extrêmement sévère durant la vie fœtale, conduisant à la mort *in utero* dans un tableau d'*hydrops fœtalis*.

Les α -thalassémies s'expriment selon quatre formes cliniques, en fonction du nombre de gènes défectueux ou absents. En pratique, cette classification doit être nuancée par la différence d'expression des gènes.

- *Hémoglobine H :*

Elle se rencontre le plus souvent chez des patients d'origine asiatique ou méditerranéenne et exceptionnellement dans la race noire. Elle se présente comme une anémie hémolytique assez grave, accompagnée de pâleur, d'ictère cutanéomuqueux et de splénomégalie ; la survenue d'une lithiase en est une complication fréquente.

Des épisodes hyperhémolytiques avec séquestration splénique sont une indication de splénectomie.

- **α -thalassémie 1 ou α -thalassémie mineure :**

Deux gènes sont délétés et seule existe une discrète anémie microcytaire.

- *α -thalassémie 2 ou α -thalassémie silencieuse*

Quand il reste trois gènes normaux, l' α -thalassémie est pratiquement asymptomatique en dehors de la présence d'hémoglobine Bart présente à un taux de 1 à 2 %, à la naissance. Elle peut cependant être suspectée quand elle est associée à une hémoglobine anormale, par exemple : hémoglobine S, C ou E, ou en cas de β -thalassémie de sévérité intermédiaire chez un homozygote thalassémique (**figure 06**).

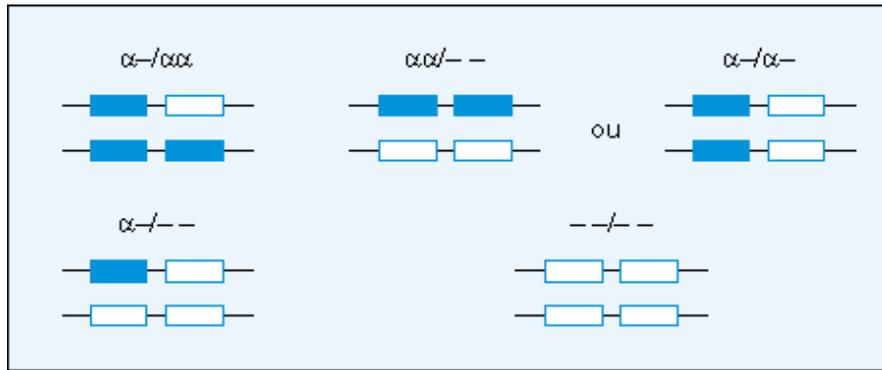


Figure 06. Mécanismes génétiques à l'origine des α -thalassémies. (Kaplan et Delpech, 1989).

- **Diagnostic biologique des α -thalassémies**

• *Anomalies hématologiques*

Dans les α -thalassémies 2, le volume globulaire moyen est souvent normal. Dans les α -thalassémies 1, le frottis sanguin montre une microcytose, une hypochromie et des cellules cibles.

Dans l'hémoglobine H, on observe :

- une microcytose importante (souvent inférieur à 50 fl),
- des anomalies de la morphologie érythrocytaire : hypochromie, ponctuation basophiles, schizocytose, cellules cibles
- une réticulocytose supérieure à 5%
- *Explorations phénotypiques et moléculaires de l'hémoglobine :*
 - Les techniques d'électrophorèse à pH alcalin et à pH acide peuvent mettre en évidence l'hémoglobine Bart.
 - La **chromatographie liquide à haute performance** des hémoglobines peut laisser suspecter l'existence d'une α -thalassémie 1 devant une diminution de l'hémoglobine A2. L'hémoglobine Bart est également mise en évidence et confirmée par la technique de **focalisation isoélectrique**.
 - L'étude de la biosynthèse in vitro des chaînes de globine apporte un diagnostic de certitude. Les α -thalassémies délétionnelles peuvent également être détectées par l'utilisation de la technique de **PCR**, avec choix opportun des amorces et **digestion enzymatique** des produits d'amplification.

d. Les gamma beta -thalassémies

c1/Définition moléculaire

Les $\gamma\beta$ -thalassémies se caractérisent par une atteinte concomitante des chaînes β et α de globine. Elles résultent d'une délétion plus ou moins étendue des deux gènes γ et β (Kafando et al. 2008).

c2/ Tableaux cliniques

La forme hétérozygote de $\gamma\beta$ -thalassémie est asymptomatique. La forme homozygote réalise un tableau d'anémie de Cooley.

c3/ Explorations biologiques

La $\gamma\beta$ -thalassémie hétérozygote se traduit au niveau de l'hémogramme par une microcytose. La CLHP montre une absence d'élévation du pourcentage de l'hémoglobine A2 et une élévation de l'hémoglobine fœtale (5 à 10 %).

- A l'état homozygote, dans la forme $\gamma\beta$ -thalassémie, il n'y a pas de synthèse d'hémoglobine A ni d'hémoglobine A2. par contre il y a une synthèse d'hémoglobine fœtale. L'étude de la biosynthèse *in vitro* des chaînes de globine et la détermination du génotype assurent le diagnostic.

e. L'hémoglobinoses S ou drépanocytose

- La drépanocytose a été décrite en 1910 par Herrick (Herrick, 1910). Cette affection transmise selon le mode récessif autosomique est due à une modification du 6e codon de la chaîne β de l'hémoglobine (substitution de l'acide glutamique par de la valine) qui entraîne la formation d'hémoglobine (Hb) S. Les sujets peuvent être homozygotes SS ou hétérozygotes (AS) le plus souvent asymptomatiques (MacDonald et al. 1999).
- D'autres mutations associées aboutissent à des hétérozygotes composites :
 - synthèse d'hémoglobine C par mutation du 6e codon en leucine (hétérozygotes SC)
 - ; - β -thalassémie (hétérozygotes S- β thalassémiques). Homozygotes SS, hétérozygotes SC et S- β thalassémiques sont regroupés sous le terme de syndromes drépanocytaires majeurs (Giroto, 1999).

d1/ Physiopathologie de drépanocytose :

La mutation de la chaîne β de globine ($\beta^6\text{val}$) est la cause de la drépanocytose. Les

molécules d'hémoglobine S (HbS) diffèrent de l'hémoglobine A normale (HbA) par une nouvelle propriété, celle de former des polymères quand elles sont désoxygénées, ce qui induit la falciformation (Morris et al. 2005). La falciformation et la polymérisation de l'HbS sont réversibles lors de la réoxygénation, les hématies reprenant une forme normale. Des études de la polymérisation de l'hémoglobine S, par une désoxygénation brusque, ont montré un rôle essentiel de la concentration intracellulaire de l'hémoglobine S dans le délai de survenue de la polymérisation de l'HbS, qui est d'un ordre exponentiel élevé de la concentration de l'hémoglobine S (Steinberg, 1999). La polymérisation de l'hémoglobine S induit une déshydratation cellulaire par perte d'ions et d'eau. Elle augmente ainsi la densité cellulaire, la concentration de l'Hb et accélère la formation des polymères en cas de désoxygénation des globules rouges drépanocytaires (**figure 07**) (Ballas et Smith, 1992). Les globules rouges déshydratés et denses sont capables de contenir des polymères dans des conditions d'hypoxie modérée et même dans le sang artériel, en raison de la concentration intracellulaire particulièrement élevée de l'HbS, jusqu'à 50 % (Brugnara, de Franceschi, et Alper 1993). La proportion des hématies déshydratées joue un rôle important sur le pourcentage de globules rouges rigides et déformés dans les capillaires et les veinules post-capillaires où la viscosité accrue et le ralentissement circulatoire favorisent leurs interactions avec l'endothélium qui peut être activé. Les études de la physiopathologie ont montré que les globules rouges denses et déshydratés jouent un rôle central dans les manifestations aiguës et chroniques de la maladie drépanocytaires basées sur les vaso-occlusions et la réduction du flux sanguin dans les vaisseaux, conséquence de la falciformation dans les petits vaisseaux (**figure 07**). Les altérations membranaires secondaires à la polymérisation de l'hémoglobine S favorisent également la génération de globules rouges rigides et déformés en permanence. Ceci contribue à des événements vaso-occlusifs additionnels et à la destruction des globules rouges dans la circulation. Ces globules rouges altérés ont également une perte de l'asymétrie des phospholipides avec l'externalisation de la phosphatidylsérine (PS), qui joue un rôle significatif dans leur reconnaissance par les macrophages et leur élimination prématurée, l'apoptose cellulaire et l'activation de la coagulation (Solovey et al. 2001). Les événements vaso-occlusifs dans la microcirculation résultent d'un scénario complexe impliquant les interactions entre différents types cellulaires incluant les globules déshydratés et denses, les réticulocytes, les cellules endothéliales anormalement activées, les leucocytes, les plaquettes et des facteurs plasmatiques (Ataga et al. 2004).

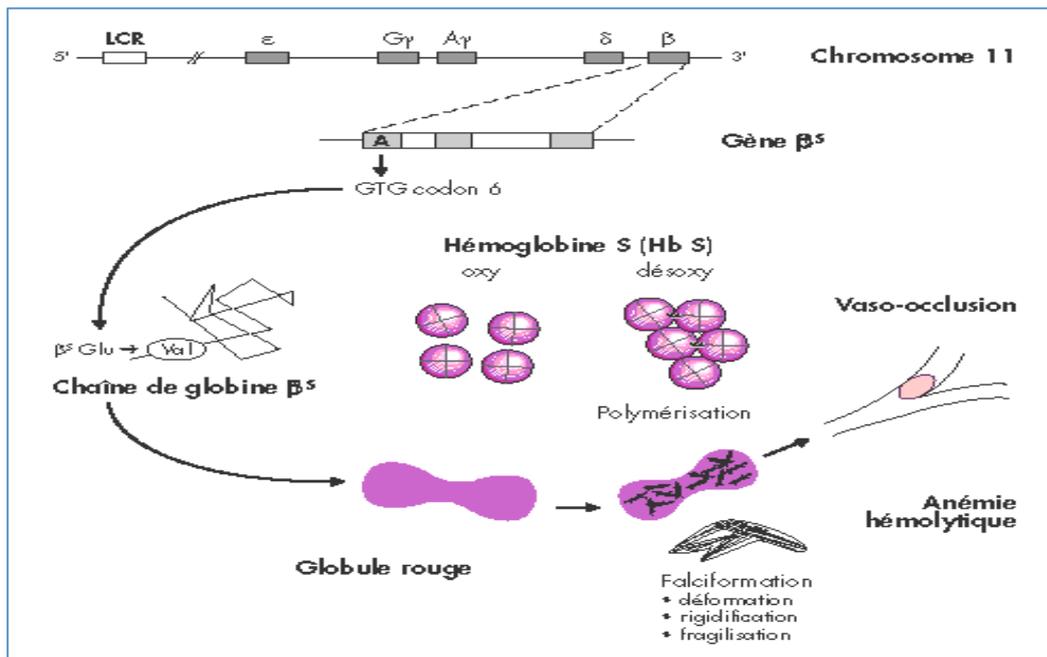


Figure 07. La physiopathologie de la drépanocytose.

La polymérisation de l'Hb S dans sa forme désoxygénée est au centre du processus physiopathologique. Déformation, rigidification et fragilisation du globule rouge qui en résultent sont responsables de deux des grandes manifestations de la maladie : crise vaso-occlusive douloureuse et anémie hémolytique.

Autres substitutions :

D'autres hémoglobines correspondent à des substitutions de différents acides aminés. Elles se traduisent par l'apparition de cellules cibles sur un frottis sanguin : - HbC, mutation au niveau de la chaîne β (glu6 lys), en Afrique et en Maghreb ; - HbD, dont HbD Panjab (glu121 → gln) en Inde ; - HbE (mutation au niveau de la chaîne β (glu26 lys), dans le Sud-est asiatique. - Hb O-Arab résulte d'une mutation ponctuelle au niveau du codon 121, cela a pour conséquence le remplacement de l'acide glutamique de la chaîne β par une lysine (Siguret et Andreux, 1997).

B. L'hémophilie

I. Introduction :

Les troubles de la coagulation correspondent à une tendance hémorragique acquise ou héréditaire consécutive à des anomalies concernant :

1. la vasoreaction (vasculopathies)
2. les facteurs de coagulation (coagulopathies)
3. les plaquettes
4. les composants de l'hémostase après une lésion vasculaire
5. la vasoconstriction
6. l'adhésion plaquettaire à la lésion endothéliale, agrégation, formation du clou plaquettaire (hémostase primaire)
7. La cascade de la coagulation, fibrinogénèse (hémostase secondaire)
8. La fibrinolyse

Un équilibre physiologique existe entre la coagulation et la fibrinolyse ; la régulation est assurée par des agents activateurs et inhibiteurs.

II. Classification des coagulopathies acquises et congénitales :

1. Carence en vitamine K ou synthèse anormale de facteurs de coagulation dépendant de la vitamine K

- Atteinte hépatique grave.
- Antibiothérapie, syndrome de malabsorption, troubles de l'absorption des lipides, alcoolisme.

2. Coagulopathie de consommation

- Coagulation intravasculaire disséminée (CIVD).

3. Troubles de coagulation d'origine immunologique

- Anticorps dirigés contre les facteurs de coagulation associés aux maladies auto-immunes (par ex : lupus anticoagulant au cours du lupus érythémateux).

4. Microangiopathies

- Purpura thrombopénique thrombotique (PTT).

- Syndrome hémolytique urémique (SHU).

5. Coagulopathies héréditaires

- Déficit en facteur VIII (hémophilie A).
- Déficit en facteur IX (hémophilie B).
- Maladie de von Willebrand (v).
- Déficiences des autres facteurs de la coagulation.

III. Les Pathologies acquises de la coagulation :

Correspondent à des coagulopathies pouvant survenir soit spontanément, soit comme conséquence d'une maladie sous-jacente qui n'est pas initialement une maladie de l'hémostase. A la différence des pathologies héréditaires, plusieurs composants de la coagulation sont en général affectés. On peut distinguer des défauts de synthèse ou des anomalies métaboliques.

1. L'hémophilie A :

Trouble de coagulation héréditaire provoqué par le déficit (90 % des cas) ou l'inactivité (10 %) du facteur VIII de la coagulation (FVIII, anti hémophilique A) (Berntorp 2001).

Elle correspond à la coagulopathie héréditaire la plus fréquente, son incidence est de 1 cas pour 5000 hommes/an. Les femmes sont porteuses hétérozygotes du gène. Elles présentent rarement des signes cliniques d'hémophilie. Le rapport entre l'incidence des hémophilies A et B est d'environ 5/1.

Le gène codant le facteur VIII est situé sur le chromosome X → l'homme est principalement affecté, transmission autosomique récessive (70% des cas) ou mutation spontanée (30 %) liée au chromosome X (Berntorp 2001).

- Le facteur VIII est synthétisé dans le foie, la protéine à un poids moléculaire de 265 kDa, elle ne dépend pas de la vitamine K et sa demi-vie est entre 8–12 heures.
- Le facteur VIII circule dans le plasma en étant lié au facteur von Willebrand (FvW) → protection contre la protéolyse (Berntorp 2001).

- Symptôme :

Tendance accrue aux saignements (manifestation au cours de la petite enfance ou de l'enfance)

- Saignements importants, hématomes.
- Saignement des tissus mous, saignement intra-articulaire (hémarthrose).
- Saignement gastro-intestinal, hématurie.

- **Diagnostic :**

Antécédents, examen clinique

- Antécédents : incluant ceux de la famille.
- Examen clinique : incluant type de saignement, complications.

- ***Examens de laboratoire***

- Paramètres de coagulation : facteur VIII ↓↓, TCA ↑, temps de Quick normal (voie extrinsèque), temps de saignement normal (mesure par l'évaluation de la fonction plaquettaire).
- Diagnostic génétique : RFLP (analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction) ; anomalie génétique rencontrée le plus souvent : inversion de l'intron 22.

L'hémophilie A se manifeste à des degrés plus ou moins importants, en fonction du taux de facteur de coagulation FVIII déficitaire. Ces degrés sont associés à des manifestations hémorragiques particulières dans leurs ampleurs, leurs fréquences et leurs localisations.

En clinique l'hémophilie A est classée, selon l'activité résiduelle du FVIII mesurée dans le plasma des patients comparée à celle réalisée sur un plasma sain, en sévère, modérée et mineure (valeur référence chez une personne saine: 0,50-1,50 Unité Internationale (UI) / millilitre (ml)) (white et al, 2000) (Tableau I).

Tableau 1: Classification de la sévérité de l'HA selon les recommandations de la société internationale de thrombose et de l'hémostase (International Society on Thrombosis and Haemostasis, ISTH) (White et al, 2001).

Classification	Taux de FVIII mesuré
HA sévère	<0,01 UI /mL (< 1 % de l'activité normale)
HA modérée	0,01–0,05 UI /mL (1-5 % de l'activité normale)
HA mineure	>0,05–0,40 UI /mL (5-40% de l'activité normale)

- **Les manifestations cliniques**

Les manifestations cliniques de l'hémophilie A sont essentiellement d'ordre hémorragique et peuvent avoir différentes conséquences en raison de leurs répétitions ou localisations. Ces hémorragies sont souvent provoquées et affectent préférentiellement l'appareil locomoteur. Il s'agit principalement d'hémarthrose ou d'hématome musculaire.

Les conséquences cliniques de l'hémophilie A sont directement liées à l'anomalie de la coagulation engendrée par le déficit en FVIII. Plus le déficit est sévère, plus les manifestations cliniques sont fréquentes.

a. Aspect moléculaire de l'hémophilie A :

a1/ Description du gène F8 :

Le gène codant le FVIII, appelé gène F8, a été cloné en 1984 par l'équipe de Gitschier (Gitschier et al, 1984). Il est localisé sur l'extrémité distale du bras long du chromosome X (q) en Xq28 et s'étend sur 186 kilobases (kb), ce qui représente près de 0,1% de la totalité du chromosome (Poustka et al, 1991). Ce gène est constitué de 26 exons et 25 introns avec une séquence codante de 7053 nucléotides (Oldenburg et El-Maarri 2006).

Les exons du gène F8 ont des tailles qui varient entre 69 paires de base (pb) (exon 5) et 3,1 kb (exon 14). La taille des introns varie de 207 pb (intron 17) à 32,4 kb (intron 22). Ce gène comprend un promoteur de longueur estimée à 1,2 kb, une région codante de 183 kb faite de 26 exons, 25 introns et une région 3'UTR de 1,8 kb (Gitschier et al, 1984). La transcription du gène F8 commence au niveau du 170^{ème} nucléotide du gène qui se trouve en amont du codon d'initiation de la traduction (ATG) (Gitschier et al. 1984). Le codon ATG est précédé en 30 nucléotides en amont d'une séquence GATAAA similaire à la boîte TATAAA, indispensable à l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II.

a2/ Anomalies génétiques responsables de l'hémophilie A

La majorité des mutations responsables de l'HA sont rares ou spécifiques à une famille à l'exception des micro-inversions du gène F8 qui sont relativement communes et courantes (Bagnall et al. 2002). Deux types de micro-inversions intra-chromosomiques du

gène F8 ont été décrits. Il s'agit de la micro-inversion de l'intron 22 et de l'intron 1 dont le mécanisme pathogène est une recombinaison entre les séquences intra-géniques Int22h-1 et Int1h-1 avec leurs séquences homologues extra-géniques télomériques respectivement Int22h-2 et Int22h-3, et Int1h-2. Ces deux micro-inversions sont responsables d'un phénotype sévère de la maladie (**figure 01**).

Ces micro-inversions surviennent principalement lors de la méiose masculine où la partie intermédiaire du chromosome X se trouve libre (Rossiter et al. 1994).

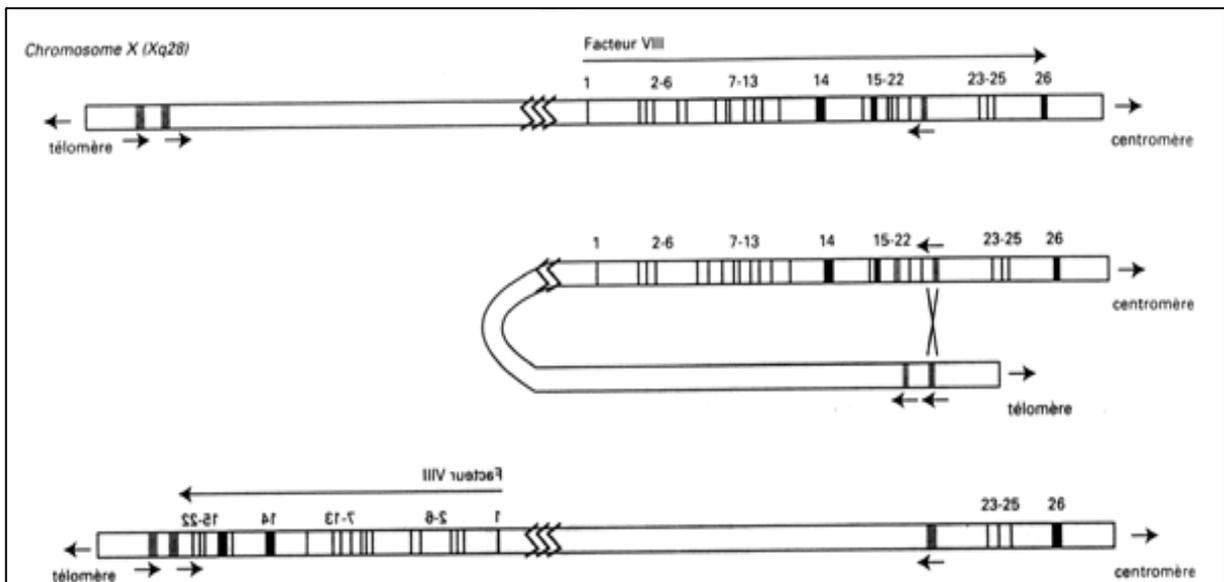


Figure 01: Représentation schématique du mécanisme responsable de micro inversion de l'intron 22.

- **La micro-inversion de l'intron 1 :**

La première description faisant évoquer la micro-inversion de l'intron 1 a été rapportée en 1996 par Brinke et al. qui décrivait une inversion altérant le F8 au niveau de son premier intron (Brinke et al, 1996). Cette micro-inversion est le résultat d'un crossing-over intra-chromosomique homologue entre une séquence de 1 kb au niveau de l'intron 1 du gène F8 (Int1h-1) et sa séquence homologue (Int1h-2) répétée dans une orientation opposée à

approximativement 140 Kb de la région télomérique, aboutissant à la rupture de la séquence du gène F8 (Bagnall et al, 2002).

La majorité des cas d'hémophilie A (environ 67%) a pour origine une mutation ponctuelle dans le gène F8. Ces mutations ponctuelles regroupent les mutations faux-sens, les mutations non-sens et les mutations au niveau des sites d'épissage. La distribution de ces mutations est indiquée dans la figure. La majorité des mutations ponctuelles sont des mutations faux-sens (48,7%), suivis par les mutations non-sens (11,3%) et enfin les mutations au niveau des sites d'épissage (7,7%).

La distribution de ces mutations tout au long des exons du gène F8 codant les différents domaines de la protéine est représentée dans la figure 34. Les mutations nonsense et au niveau des sites d'épissage sont réparties sur l'ensemble des domaines FVIII. Cependant, les mutations faux-sens sont dispersées tout au long des domaines à l'exception du domaine B où elles sont relativement rares (Payane et al, 2013) (**figure 02**).

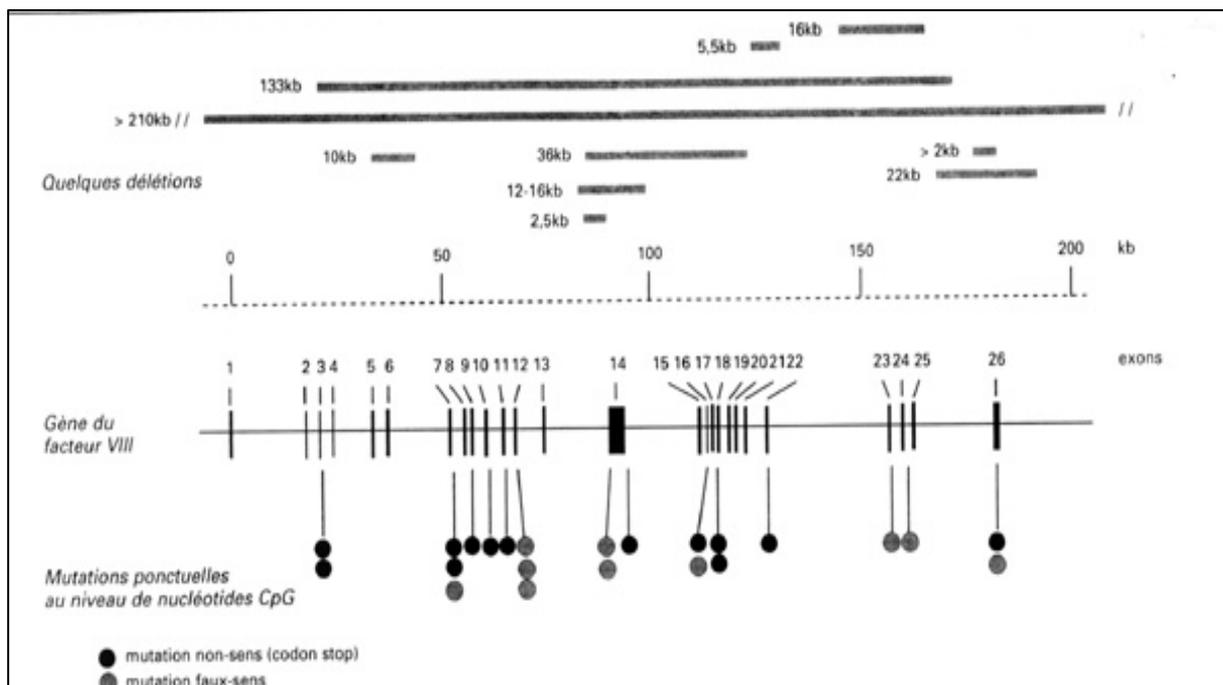


Figure 02 : distribution des mutations ponctuelles

3. L'hémophilie B :

Correspond à une coagulopathie héréditaire provoquée par le déficit ou l'inactivité du facteur IX de la coagulation (FIX, facteur anti hémophilique B) (Boltton- magg et passi, 2003). L'hémophilie B est une coagulopathie héréditaire rare, son incidence est de 1 cas pour 25 000–30 000 hommes/an. La femme est porteuse hétérozygote du gène (Boltton- magg et passi, 2003).

Le gène codant le facteur IX est situé sur le chromosome X → affection principalement masculine,

Elle est héritée selon le mode récessive liée au chromosome X. Les formes héréditaires représentent (80 % des cas) et les mutations spontanées (20 %) (Boltton- magg et passi, 2003).

La protéine est Synthétisée au niveau hépatique et à un poids moléculaire de 55 kDa, sa demi-vie est de 24 heures.

- Symptôme :

Tendance accrue au saignement, similaire à l'hémophilie A (in différenciable sur le plan clinique) (Evatt, 2002):

- hématomes, saignement des tissus mous, saignement intra-articulaire (hémarthrose) ;
- hématurie, saignement gastro-intestinal.

- Antécédents, examen clinique

- Antécédents : incluant ceux de la famille.
- Examen clinique : incluant type de saignement, complications.

Examens de laboratoire

Facteur IX ↓↓, TCA ↑, temps de Quick normal (voie extrinsèque), temps de saignement normal (Vérifié par les tests de la fonction plaquettaire).

- Traitement du saignement

Administration de facteur IX, demi-vie 12–24 heures.

Posologie : dose (UI) = augmentation ciblée du facteur (%) × poids corporel (kg).

Règle générale : administration de 1 UI/kg de facteur IX →↑ de 2 % du FIX plasmatique

- Recommandations pour la posologie

- Saignement mineur : augmenter le taux de facteur IX de 10–30 % pendant 1–2 jours.

- Saignement moyen : augmenter le taux de facteur IX de 30–50 % de l'activité normale pendant 5–7 jours.
- Saignement grave/opération chirurgicale programmée : augmenter le taux de facteur IX de > 70 % pendant 3 jours, puis maintenir à > 50 % pendant 7 jours.
- En cas d'urgence, possibilité d'avoir recours au plasma frais congelé (PFC) en cas de non-disponibilité de concentrate de facteur IX recombinant (Srivastava et al, 2004).

b. Diagnostic moléculaire :

- **Analyse directe: (recherche directe des pathologies moléculaires):**

Compte-tenu de la taille du gène et du nombre de mutations ponctuelles, cette recherche est fastidieuse et donc rarement engagée lors d'un diagnostic de cas modérés.

Pour les cas sévères une recherche des inversions par southern blot (séquençage ou PCR long range) peut être réalisée et certaines mutations ponctuelles touchant les dinucléotides CG sont ciblées grâce à l'utilisation de l'enzyme de restriction TaqI dont le site de coupure est TCGA. Ce site est donc aboli lorsqu'il y a une substitution de C par un T ou du G par un A.

- **Détection indirecte :**

Dans de tels cas on va chercher un marqueur qui permettra d'identifier le chromosome (la portion de chromosome proche du gène) qui porte l'allèle muté pour déterminer si c'est lui qui a été transmis au descendant. Pour pouvoir connaître l'état de cette portion du génome des parents il faut avoir examiné un malade de la même famille (enfant de la même fratrie, ascendant, cousin, ...)

4. Les femmes hémophiles :

Différentes causes peuvent être à l'origine d'hémophilie chez les femmes :

- Inactivation fortuite pendant l'embryogénèse d'une majorité de X portant l'allèle normal.
- Syndrome de Turner (XO).
- Isodomie maternelle du X (non disjonction au cours de la deuxième division de méiose), on a alors un zygote avec 2 X identiques maternelles à condition que le X du spermatozoïde ayant participé à la fécondation ait été éliminé.

a. Le diagnostic des conductrices et le diagnostic anté-natal :

Ils sont possibles dans certaines familles par l'étude de l'ADN à partir d'un prélèvement sanguin ou d'une biopsie de trophoblaste. Dans le cas d'une famille "non informative", le dosage du F. VIII et du F. XI est possible sur le sang du cordon prélevé sous échographie dès la 22^{ème} semaine.

Il est également possible de faire un diagnostic préimplantatoire (DPI) dans le cadre d'une fécondation in vitro.

Où en est la recherche ?

Des recherches sont menées par les laboratoires pour augmenter la demi-vie des produits leur durée d'action serait plus longue, ce qui réduirait le nombre d'injections nécessaire. Pour y parvenir, la stratégie actuellement à l'étude consiste à coupler le facteur de substitution avec une molécule ou une protéine qui a une longue demi-vie dans l'organisme. Le couplage avec un fragment d'immunoglobuline humaine (fragment Fc d'IgG) est en cours de développement. Les résultats préliminaires sont prometteurs, permettant de multiplier par trois à cinq la durée de vie du facteur IX et par deux celle du facteur VIII.

D'autres équipes s'attèlent à trouver des **alternatives thérapeutiques à utiliser en cas d'apparition de ces anticorps**. L'idée est de mettre au point des molécules qui miment l'activité du facteur de substitution rendu inactif par les anticorps.

Une toute autre stratégie explorée consiste à **induire une tolérance au facteur de substitution dès la vie fœtale**. L'idée a été testée chez la souris : les chercheurs injectent à la mère du facteur VIII couplé à une immunoglobuline pendant la grossesse. L'immunoglobuline traverse le placenta ce qui permet au fœtus de développer une tolérance au facteur VIII.

5. Corriger les anomalies par thérapie génique:

Un premier essai de thérapie génique concluant a eu lieu en décembre 2011. Il concernait le traitement de l'**hémophilie de type B**. La technique consiste à emballer le gène fonctionnel codant pour le facteur IX dans un adénovirus. Le virus sert de vecteur pour acheminer le gène-médicament dans les cellules du foie où le facteur coagulation est normalement produit. Pour la première fois, l'équipe anglo-américaine a obtenu une réponse prolongée : les six patients inclus dans l'étude n'ont pas été guéris, mais la sévérité de leur

maladie a été nettement diminuée pendant plusieurs mois suite à une seule injection intraveineuse. Quatre d'entre eux ont pu se passer complètement de l'administration pluri hebdomadaire de facteur IX dont ils avaient besoin pour éviter des saignements spontanés.

- Il faudra toutefois encore plusieurs années pour poursuivre le développement de cette technique et la rendre accessible aux patients. Par ailleurs, il est important de noter qu'un tel essai est beaucoup plus difficile à envisager dans le cadre de l'hémophile de type A : le gène codant pour le facteur VIII est en effet plus grand (donc plus compliqué à véhiculer dans l'organisme des patients) et il sera bien plus difficile d'obtenir son expression dans les cellules des patients.

C. Les Myopathies

I. Introduction:

Les myopathies sont des maladies qui touchent les muscles. Elles se caractérisent par une atrophie des tissus musculaires, subséquente à une dégénération progressive de ces mêmes tissus. Elles se répartissent en deux grands groupes (Bougeon 2008):

1. Les myopathies d'origine génétique comprennent:

Les dystrophies musculaires où, du fait d'une altération primaire des fibres musculaires, celles-ci se détruisent progressivement. Les myopathies congénitales dues à une anomalie du développement et de la maturation des fibres pendant la période fœtale.

- Les myopathies métaboliques secondaires à un dysfonctionnement de la voie de dégradation des sucres (glycogénoses), du métabolisme des graisses (lipidoses) ou de la chaîne respiratoire (maladies mitochondriales)

2. Les myopathies acquises surviennent sur un muscle antérieurement sain et regroupent :

- Les myopathies toxiques et médicamenteuses.
- Les myopathies inflammatoires.
- Les myopathies endocriniennes.
- Examen clinique :

L'examen clinique doit être simple et avoir les objectifs suivants :

- Rechercher un déficit et s'assurer d'emblée qu'il répond aux critères du syndrome myogène par :
 - sa prédominance proximale (elle est très habituelle, mais certaines myopathies, telle la maladie de Steinert, se manifestent par une faiblesse distale des membres) ;
 - l'absence de fasciculations et l'absence de troubles sensitifs ;

– le respect prolongé des réflexes ostéotendineux.

- Préciser la topographie du déficit au niveau des membres (proximal, distal ou global ; symétrique ou non ; sélectif ou non) et ne pas omettre d'examiner la musculature faciale, oculaire et vélo-pharyngolaryngée.
- Rechercher en association au déficit :
 - une atrophie ou une hypertrophie (langue, mollets) ;
 - des douleurs (siège, qualité, circonstances de survenue) ;
 - une myotonie ;
 - une limitation des amplitudes articulaires secondaires aux rétractions musculotendineuses.
- Rechercher d'autres signes que l'atteinte musculaire squelettique (altération de l'état général, signes cutanés ou articulaires, signes cardiaques ou respiratoires, signes neurologiques centraux).

3. Les dystrophinopathies :

On désigne sous ce terme les dystrophies musculaires d'hérédité récessive liée à l'X en rapport avec une mutation dans le gène codant pour la dystrophine. Il s'agit du plus grand des gènes humains connus (> 2 mégabases). Un défaut quantitatif ou qualitatif de la dystrophine, localisée à la face interne du sarcolemme, provoque une fragilisation de la membrane musculaire par rupture de la liaison entre le cytosquelette et la matrice extra-cellulaire (**figure 01**).

Les dystrophies musculaires, désignent un ensemble d'affections musculaires à transmission héréditaire. La dystrophie musculaire de Duchenne de Boulogne (DMD) décrite en 1868 ainsi que sa forme moins sévère rapportée par Becker (BMD) en 1955, se caractérisent par un début durant l'enfance ou l'adolescence et une transmission récessive, liée au chromosome X (Gowers, 1879).

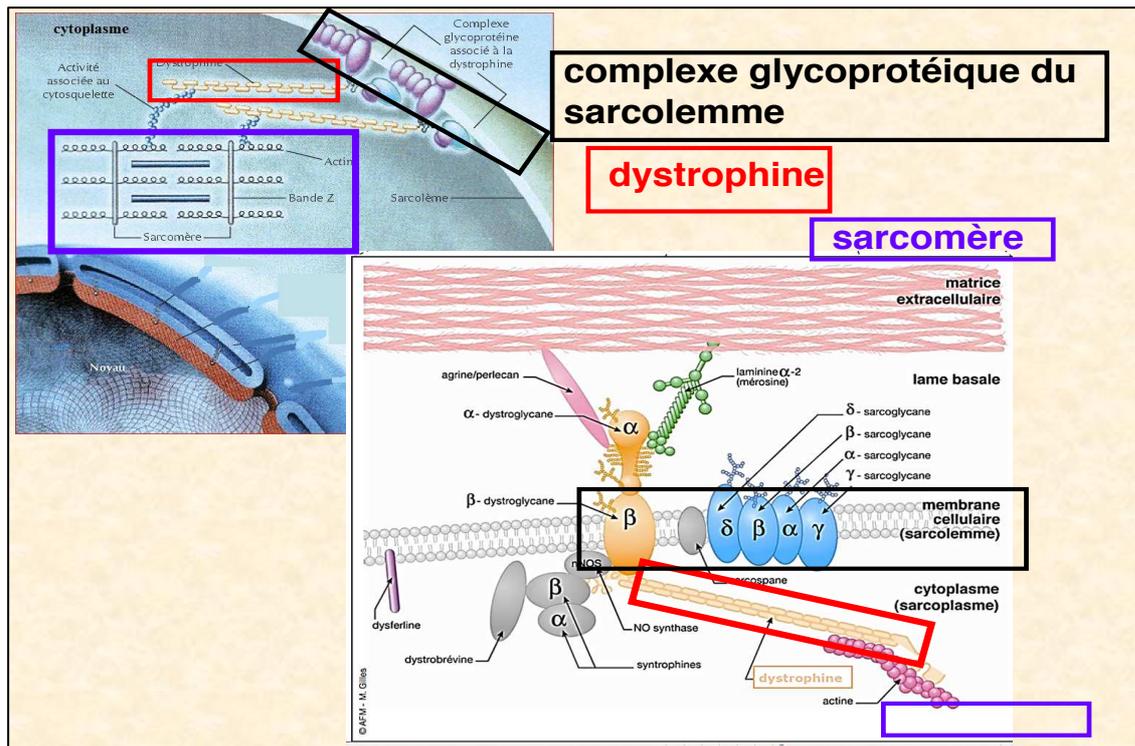


Figure 01 : Rôle de la dystrophine pour la liaison entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire.

a. Clinique des dystrophies musculaire de Duchenne et Becker :

L'évolution progressive et inexorable de la DMD et de la BMD suit de façon schématique deux périodes : la première décennie pendant laquelle la marche est conservée et la seconde au cours de laquelle la station debout est impossible, et qui se termine par la mort (Serratrice et al. 1997).

La définition du phénotype ne fait pas appel à la connaissance du génotype, auquel il n'est qu'incomplètement corrélé. Le phénotype est divisé en deux catégories :

- l'âge de la perte d'indépendance locomotrice : avant 13 ans pour la DMD, entre 13 et 16 pour les phénotypes intermédiaires, après 16 ans pour la BMD ;
- la quantité de dystrophine détectable dans le muscle par Western-Blot : moins de 3% de la quantité normale de dystrophine dans la DMD, 3 à 20% dans les phénotypes intermédiaires, et plus de 20% de la quantité normale de la dystrophine dans la BMD. Ce deuxième critère

permet de définir le phénotype d'un individu dystrophinopathe âgé de moins de 16 ans (Hoffman et al. 1989).

- Le phénotype Duchenne ne présente pas de variation individuelle majeure probablement parce que, chez tous les patients, aucune dystrophine fonctionnelle n'est présente dans le muscle. Par contre le phénotype Becker est très variable car la dystrophine est de taille, de stabilité et de capacité fonctionnelle différente en fonction des individus.

a1/ Phénotype Duchenne :

Le caractère pathologique de la dystrophie musculaire de Duchenne se traduit par une dégénérescence progressive du tissu musculaire. Durant la première année de vie, les nourrissons ne présentent pas de symptômes évidents, mis à part un léger retard de croissance. Durant leur tendre enfance, les malades ne présentent que rarement des symptômes, même si certains signes cliniques démontrent que le processus dégénératif est déjà amorcé haut taux de créatine phosphokinase (CPK) sérique et nécrose des fibres musculaires (Prelle et al. 1992). Les premiers signes se traduisent par une stature plus courte, une difficulté à courir ou à monter les escaliers, des chutes fréquentes et une hypertrophie des mollets (Marques, 2004). Le signe de Gowers, très évocateur, est présent à partir de l'âge de 5 ans et se manifeste par l'utilisation des mains en appui sur les genoux et les cuisses pour obtenir la station debout (Blake et al. 2002).

La dégénérescence affecte les muscles proximaux, plus que les muscles distaux, ainsi que les muscles des membres inférieurs et dorsaux, plus que les muscles des membres supérieurs. La régression de la force musculaire est constante et presque de manière linéaire entre l'âge de 6 et 11 ans, avec une prépondérance pour les muscles proximaux (Camirand, 2004).

Le décès des patients, causé par l'affaiblissement des muscles respiratoires, survient par rétention du monoxyde de carbone et anoxémie accompagnées d'une infection respiratoire (Mukoyama et al. 1987).

L'atteinte simultanée des muscles squelettiques et cardiaques n'est pas rare, entre 65% et 95% des cas après 21 ans (Angelini et al. 1996).

a2/ Phénotypes Becker et intermédiaires :

La distinction des phénotypes «Duchenne» et «Becker» est basée sur l'âge de la perte d'indépendance de la marche. Les phénotypes intermédiaires, avec une perte de la locomotion entre 13 et 16 ans peuvent être classés aussi comme une «maladie de Becker sévère» ou une «maladie de Duchenne modérée» (Dubowitz 1992).

La dystrophie musculaire de Becker est caractérisée par un grand polymorphisme clinique, l'incapacité locomotrice pouvant survenir tôt dans l'adolescence ou ne jamais se manifester, parfois les seuls signes cliniques sont des crampes et douleurs musculaires (Hofmann, 1993).

Les signes les plus constants de BMD sont une élévation des taux de créatine kinase sérique et une hypertrophie précoce des muscles des mollets.

La plus préoccupante des complications pouvant survenir au cours de la dystrophie musculaire de Becker est une cardiomyopathie, très proche de celle du phénotype Duchenne. Un phénotype particulier est la «cardiomyopathie dilatée liée à l'X» ou XLDC (X-Linked Dilated cardiomyopathie) phénotype restreint soit associé à un phénotype Becker léger.

L'atteinte myocardique isolée s'observe lorsque la mutation du gène DMD (de type Becker) entraîne la dissociation du complexe protéique associé à la dystrophine dans le myocarde mais pas dans le muscle squelettique.

La BMD peut parfois être restreinte à une symptomatologie neuropsychiatrique, c'est-à-dire à un retard mental (QI inférieur à 80), les lésions musculaires ne s'exprimant cliniquement que par une élévation de la créatine kinase sérique.

- Diagnostic :

Le premier diagnostic est souvent associé aux premiers signes cliniques, ou bien il est la conséquence d'un dépistage intervenu chez un enfant à risque.

Ainsi le diagnostic est fait rarement avant l'apparition des premiers signes cliniques. Lors de l'apparition de ces premiers signes cliniques différents tests sont entrepris pour confirmer ou non si l'enfant est affectivement atteint.

Les principaux tests pratiqués à cet effet sont :

- **Biochimiques et Western Blot:**

Des lésions musculaires importantes provoquent le plus souvent un relargage dans le sang de certaines enzymes, principalement la créatine phosphokinase (CPK), pyruvate kinase, lactico-déshydrogénase, aldolase anhydase carbonique (Salima 2017) dont le dosage sérique révèle une augmentation dans la dystrophie musculaire de Duchenne et de Becker. L'étude en Western blot des différentes protéines musculaires permet une évaluation quantitative et qualitative de la dystrophine (poids moléculaire) (Pélissier et Urtizbera, 1996). Cette étude est indispensable pour préciser le type de déficit protéique (absence de la dystrophine dans la dystrophie musculaire de Duchenne) (fig. 1). La sévérité du phénotype est corrélée à la quantité résiduelle de la dystrophine présente mais aussi à la taille de celle-ci (Hoffman et Kunkel 1989).

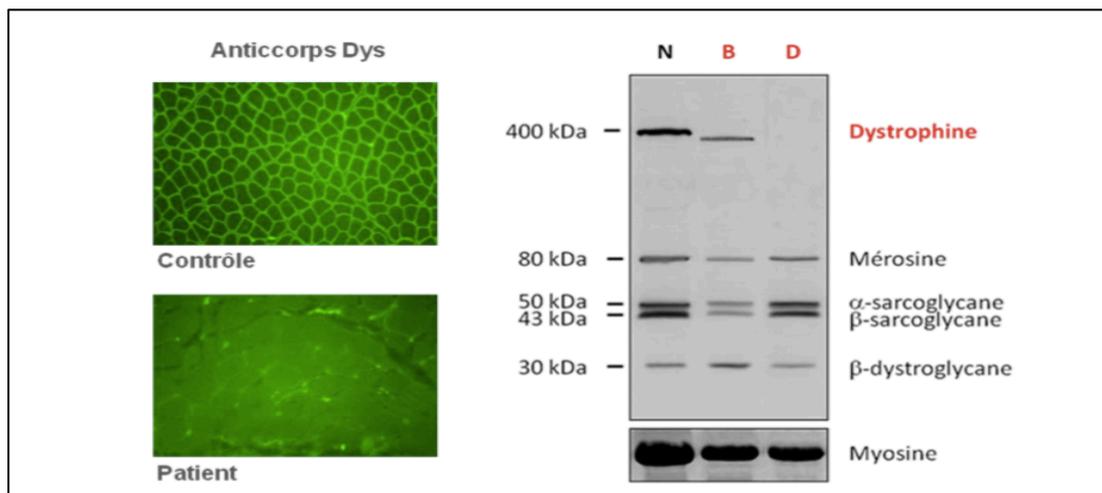


Fig.2: Technique de Western-blot pour l'étude de la dystrophine sur muscle solubilisé. Mise en évidence d'altérations et déficits affectant la protéine dystrophine par immunohistochimie (A.) et par western blot (B.). (A) Marquage de coupes histologiques réalisées à partir de muscles avec un anticorps spécifique reconnaissant la protéine dystrophine (Dys), mettant ainsi en évidence (comparativement à un individu contrôle) un déficit de cette protéine chez le patient analysé. (B) Western blot montrant deux types d'altérations rencontrées chez les patients présentant une dystrophie musculaire de Becker/Duchenne: Patient B, présentant une dystrophie musculaire de Becker, avec présence d'une protéine tronquée et d'expression très légèrement diminuée, Patient D, présentant une dystrophie musculaire de Duchenne, avec absence de dystrophine, comparativement à un individu contrôle N. Myosine, protéine contrôle [Kaplan *et al.*, 1996; Ehmsen *et al.*, 2002].

Electromyographiques:

L'électromyogramme (EMG) permet de recueillir et d'analyser des signaux électriques par l'intermédiaire de fines aiguilles- électrodes implantées dans le muscle étudié (Ghozlane, 2001). Il permet d'affirmer devant des troubles moteurs une origine neuropathique (dites aussi neurogène ou myogène).

Analyses moléculaires :

Les hommes affectés suspectés d'avoir une dystrophinopathie sur la base du diagnostic clinique sont dirigés vers une confirmation moléculaire réalisée pour démontrer la présence d'une altération clairement pathogène dans le gène *DMD*, et en tenant compte de la sensibilité de la procédure moléculaire utilisée (Abbs et al. 2010).

Puisque les délétions intragéniques sont les principales mutations affectant le gène *DMD* (65%), des tests moléculaires de première instance seraient de tenter de détecter la majorité des délétions avec un minimum de procédures techniques, avantages offerts par la PCR multiplexe qui permet d'amplifier simultanément les exons connus pour être le plus souvent délétés. Deux PCRs multiplexes ont ainsi été mises au point, celle de Chamberlain *et al.* (1988) et Beggs *et al.* (1990) (Chamberlain et al. 1988) (Beggs et al. 1990), permettant la détection d'environ 98% des délétions caractérisées dans le gène *DMD*. Etant donné que ces deux tests ne caractérisent pas les bordures de toutes les délétions, il est pourtant parfois nécessaire de réaliser PCRs supplémentaires pour caractériser l'étendue exacte lorsqu'une délétion n'est pas bordée de ses deux cotés (Abbs et al. 2010). Des analyses quantitatives de tous les exons offrent une amélioration du taux de détection de mutations puisqu'elles détectent toutes les délétions intragéniques et, en outre, toutes les duplications (5-10% des mutations). D'autres avantages sont que ces analyses caractérisent les bordures de la plupart des réarrangements et peuvent également être utilisés pour tester les femmes porteuses. La méthode quantitative la plus utilisée est la MLPA (pour "Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification") (Abbs et al. 2010)

Une autre approche quantitative CGH array (pour "array Comparative Genomic Hybridization"), a été mise au point pour doser le gène *DMD* avec une haute résolution, permettant de détecter le nombre de copies, exons et introns compris, à travers l'ensemble des 2.2 Mb de la région génomique contenant ce gène et individualisant donc les points de réarrangement en des intervalles relativement étroits. Cette approche permet aussi de détecter

la perte ou le gain de séquences introniques aux points liés à des inversions et des réarrangements complexes, offrant ainsi un taux plus élevé de détection de mutations que la MLPA ou les autres tests ciblant seulement les exons (Abbs et al. 2010).

Si aucune deletion ou duplication n'a été trouvée, le diagnostic Clinique ne peut être ni confirmé ni exclu. Si les caractéristiques cliniques, les antécédents familiaux et/ou les résultats d'analyse de la biopsie musculaire laissent suggérer une dystrophinopathie, d'autres tests peuvent être envisagés pour rechercher des mutations pathogènes. De nombreuses méthodes peuvent ainsi être utilisées pour analyser de petits changements nucléotidiques dans le gène *DMD* (SSCP pour "Single Strand Conformation Polymorphism", dHPLC pour "denaturing High Performance Liquid Chromatography", PTT pour "Protein Truncation Test", ...), offrant une alternative moins coûteuse que le séquençage de tous les 79 exons du gène *DMD*. Le séquençage du gène *DMD*, peut quant à lui, être effectuée par RT-PCR d'ADNc dérivées de l'ARN du muscle (à condition de disposer de ce matériel génétique ou à partir d'AND génomique).

4. Approches thérapeutiques :

Les thérapies développées dans le cadre des myopathies, notamment de la forme sévère de dystrophie musculaire de Duchenne, se doivent d'atteindre au moins un des effets thérapeutiques suivant :

- Ralentir, voire arrêter, la dégénérescence musculaire;
- Estomper les divers signes cliniques en corrigeant l'origine de la pathologie;
- Restaurer la capacité musculaire des patients.

Presque 150 ans se sont écoulés depuis la description des premiers cas de DMD et plus de 20 ans depuis que le gène codant pour la dystrophine fut identifié. Néanmoins, il n'existe pour l'instant aucun traitement curatif pour cette maladie.

La difficulté à établir une thérapie efficace est particulièrement due aux obstacles représentés par le remplacement ou la réparation du gène défectueux. Pareillement, la pluralité des pathologies associées à la dégénérescence musculaire permanente oblige les équipes de recherche à travailler sur "un terrain miné". Pour l'instant, les palliatifs se limitent malheureusement à améliorer le confort et la qualité de vie des patients. Pour ralentir un peu l'atrophie musculaire, des séances de physiothérapies peuvent être prescrites. Pour augmenter

la mobilité des patients, cannes puis chaises roulantes électriques ont été mises à leur disposition. Pour augmenter leur capacité respiratoire, les patients sont mis sous assistance respiratoire. Également, des interventions chirurgicales lourdes peuvent être envisagées pour les patients qui développent une lordose pathologique : des barres métalliques sont alors vissées le long de la colonne vertébrale pour éviter son affaissement (Franzini-Armsrong, 1994).

Toutefois, de 1940 à 1979, une multitude de drogues et d'agents ont été administrés aux patients. L'ensemble de ces traitements ne rentrant pas dans le cadre d'études scientifiques rigoureusement contrôlées, aucun des traitements prescrits ne donna de résultats convaincants. Parmi ces produits, nous citerons la vitamine E, des androgènes, des stéroïdes anabolisants avec ou sans digitoxine, de l'adrénaline, des vasodilatateurs, de la glycine, d'autres acides aminés, ... Puis, au début des années 80, les traitements proposés rentrèrent dans des programmes scientifiquement encadrés (Franzini-Armsrong, 1994). Actuellement, les thérapies pharmaceutiques, géniques et cellulaires constituent ainsi l'ensemble des approches envisagées pour traiter les dystrophinopathies.

5. Traitement pharmacologique

L'avantage majeur de cette approche est qu'elle permet une administration facile de molécules pharmacologiques (voie orale, intraveineuse ou sous-cutanée), molécules dont l'effet pourrait même être interrompu dès l'arrêt du traitement si nécessaire (Pichavant *et al.* 2011).

Plusieurs stratégies pharmaceutiques ont ainsi été proposées pour répondre aux problèmes liés à la DMD. De nombreux composés tels que la vitamine E, le sélénium, le mazindol (Zatz, Betti, et Frota-Pessoa 1986) se sont avérés inefficaces. Malgré tout, l'approche pharmaceutique demeure une approche thérapeutique d'actualité.

6. Thérapies géniques :

La thérapie génique consiste en l'introduction dans les fibres musculaires, via des vecteurs viraux ou non viraux, d'une copie fonctionnelle du gène *DMD*, directement dans les muscles ou dans des cellules en culture. Le transgène est généralement la séquence complète de l'ADNc du gène *DMD*, mais en raison de sa grande taille, d'autres séquences ont été générées

en induisant des délétions dans le domaine central (mini-dystrophine) et C-terminal (micro-dystrophine).

a. Saut d'exon par utilisation d'oligonucléotides anti-sens (AON) :

En dépit des altérations moléculaires qui affectent la dystrophine, il n'est pas rare d'observer chez les souris *mdx* et les jeunes enfants DMD quelques fibres qui expriment pourtant la protéine. Son expression dans ces fibres, dites révertantes, est causée par une restauration du cadre de lecture suite à une seconde mutation ou bien suite à un phénomène d'épissage qui aurait permis d'éliminer la séquence comportant la mutation (Lu et al. 2000). Normalement, le mécanisme d'épissage sert à éliminer les introns d'un ARN pré-messager. En utilisant des ARN antisens spécifiques à l'ARN pré-messager de la dystrophine, la stratégie de saut d'exon (exon skipping) vise à moduler l'épissage de l'ARN afin d'en éliminer l'exon contenant une mutation non-sens et restaurer ainsi le cadre de lecture. Le principe de cette approche repose ainsi sur l'introduction, dans la cellule, de petites séquences d'ARN nommées "oligoribonucléotides antisens" (AONs) qui sont complémentaires et spécifiques à un site d'épissage présent sur le transcrit de la dystrophine. En neutralisant un site d'épissage, les AONs produisent un nouvel épissage qui permet de sauter un ou plusieurs exons et conduisent à la production d'une dystrophine tronquée [Bremmer-Bout *et al.*, 2004]. Comme l'a démontré une étude récente en analysant les profils d'expression géniques, ces courtes séquences d'ARN antisens ont une activité très spécifique et ne semblent pas affecter d'autres gènes ('t Hoen et al. 2006).

b. Correction génomique :

Sur la base du fait que les mutations ponctuelles affectant le gène de la dystrophine représentent jusqu'à 15% des cas de DMD, l'utilisation d'oligodésoxynucléotides (**Figure 14**) permettrait de réparer ce type de mutations. La souris *mdx* a été un excellent modèle pour vérifier ce principe. En effet, la déficience en dystrophine chez cette souris était due à une mutation ponctuelle générant un codon Stop dans le gène codant la dystrophine. Ainsi les premières expériences réalisées chez cette souris donnèrent des résultats encourageants. La correction fut démontrée au niveau génomique ainsi qu'au niveau de l'ARNm, l'expression de dystrophine ayant été démontrée *in vitro* et *in vivo* (Rando, Disatnik, et Zhou 2000) (Bertoni et Rando 2002) (Bertoni et al. 2006) À l'instar des AONs, l'utilisation des oligodésoxynucléotides nécessiterait une ingénierie constante de ces vecteurs pour chaque

zone de mutation. De plus, il faudrait aussi noter la faible efficacité de cette approche, puisque seules 1 à 5% des cellules traitées produisent de la dystrophine. Enfin, même si la correction au sein des cellules répondantes est permanente, il n'en demeure pas moins qu'il y a un renouvellement cellulaire important lors des événements de dégénérescence/ régénérescence musculaire (Sampaolesi et al. 2006) (Rando, 2007).

c. Thérapie cellulaire :

La thérapie cellulaire consiste à introduire dans le muscle du patient atteint de DMD des cellules musculaires provenant d'un patient non-atteint permettant ainsi de restaurer l'expression de dystrophine dans leurs muscles. Ces cellules peuvent soit provenir d'un donneur ou être des cellules autologues dont le gène de la dystrophine a été corrigé par thérapie génique *ex vivo*. Deux formes de cette thérapie sont présentement à l'étude : l'injection intra-artérielle de cellules, notamment de mésoangioblastes (Sampaolesi et al. 2006) ou l'injection intramusculaire de cellules, notamment de myoblastes (Péault et al. 2007). Les mésangioblastes sont des cellules isolées à partir des vaisseaux sanguins et peuvent être injectées de manière intra-artérielle, passer à travers la paroi vasculaire et se diriger vers le muscle pour finalement se différencier en cellules musculaires (Péault et al. 2007). L'injection intramusculaire de myoblastes permet d'introduire dans le muscle dystrophique des cellules précurseurs exprimant une dystrophine non-mutée et qui fusionneront avec les fibres musculaires endommagées du patient. Des essais *in vivo* ont été effectués sur des animaux et des essais cliniques ont même été envisagés (Skuk et al. 2002) (Skuk et al. 2007). Cette thérapie est très prometteuse pour nombre de maladies génétiques, bien qu'elle doive cependant faire face à plusieurs obstacles : la faible dispersion des myoblastes hors des sites d'injections, la mort rapide et précoce des myoblastes suite à l'injection, le rejet à moyen et long terme dû à la réponse immune spécifique (Darabi et al. 2008).

D. La Mucoviscidose

I. Introduction :

La mucoviscidose, encore appelée fibrose kystique du pancréas, est classiquement considérée comme la plus fréquente des maladies génétiques graves de l'enfant dans les populations d'Europe du nord ouest et d'Amérique du nord. Les progrès qui ont été accomplis au cours des dernières décennies dans la prise en charge de cette maladie ont conduit à améliorer considérablement l'espérance de vie des patients, et aujourd'hui près de la moitié d'entre eux sont des adultes.

Cette affection est due à des mutations du gène *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), gène situé sur le bras long du chromosome 7, codant pour une protéine transmembranaire intervenant dans la régulation du transport transépithélial des ions chlorure (Cl^-).

L'absence ou la dysfonction de la protéine CFTR entraîne alors un défaut du transport du Cl^- , donc une augmentation de la réabsorption de sel et d'eau, et, notamment au niveau de l'épithélium bronchique, une réduction du liquide de surface bronchique.

Il s'agit donc d'une exocrinopathie généralisée, touchant les glandes séreuses et les glandes à sécrétion muqueuse qui entraîne une accumulation de sécrétions visqueuses et déshydratées.

Ce « mucus visqueux » (d'où le nom de mucoviscidose) obstrue différents sites de l'organisme, notamment l'appareil respiratoire, le tube digestif et ses annexes (pancréas, voies biliaires et foie), les glandes sudoripares et le tractus génital.

L'expression clinique de la maladie se traduit essentiellement par une atteinte pulmonaire et digestive. Au plan pulmonaire, il s'agit d'une broncho-pneumopathie chronique obstructive caractérisée par une production d'un mucus abondant épais, colonisé par une flore spécifique. *Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenzae* sont les premiers microorganismes retrouvés dans la flore, suivis quelques années voire quelques dizaines d'années plus tard, par une colonisation par *Pseudomonas aeruginosa*. Cette colonisation marque en général un tournant dans l'histoire de la maladie et son éradication devient

difficile. Des atélectasies surviennent chez environ 5 % des patients et le pneumothorax est une complication fréquente. L'atteinte pulmonaire est responsable de l'essentiel de la morbidité et de la mortalité de la maladie.

Au plan gastro-intestinal, la manifestation clinique la plus précoce est la présence d'un iléus méconial qui survient chez 15 % environ des nouveau-nés. La maladie pancréatique - une insuffisance du pancréas exocrine - est présente chez 85 % des enfants à la naissance. La suffisance pancréatique est génétiquement déterminée, présente chez les enfants porteurs d'au moins une mutation peu sévère. Enfin, 95 % des hommes ont une absence de canaux déférents se traduisant par une stérilité par azoospermie excrétoire. La fertilité chez les femmes est également diminuée, mais le nombre de grossesses chez les femmes atteintes de mucoviscidose est en augmentation constante depuis deux décennies.

La mucoviscidose se transmet sur le mode autosomique récessif, et elle affecte un nouveau-né sur 4500 en France avec des différences loco-régionales significatives en termes d'incidence (une naissance pour 3000 en Bretagne, une naissance pour 7000 en Languedoc Roussillon).

La maladie a été décrite pour la première fois par Fanconi en 1938 sous le nom de fibrose kystique du pancréas. Elle a par la suite été mieux diagnostiquée dans la seconde moitié du 20^{ème} siècle à la suite des travaux de Di Sant' Agnese, qui découvrit que la sueur de ces enfants était anormalement riche en sel et proposa un test biologique : le test de la sueur mesurant la concentration en ion chlorure (Cl⁻) et en sodium de la sueur. Une valeur du test supérieure à 60 mEq/l reste aujourd'hui le test diagnostique de référence et est très spécifique de la maladie.

1. Le gène *cftr* et ses mutations :

Le gène *CFTR* est le premier gène situé sur un autosome qui a été cloné grâce à une stratégie réussie de clonage positionnel. Alors que les généticiens n'avaient aucune connaissance de la protéine responsable de la maladie, par une stratégie de liaison génétique ils sont parvenus d'abord à cartographier le gène en 7q puis à s'en rapprocher pour finalement réussir à le cloner en 1989.

Composé de 27 exons et s'étendant sur 180 kb, ce gène code pour une protéine transmembranaire de 1 480 acides aminés qui est un canal chlorure régulé par l'AMPc

(Adénosine MonoPhosphate cyclique). Ce canal de faible conductance est un régulateur d'autres canaux, en particulier des canaux sodiques comme le canal ENaC (*Epithelial Na Channel*) ou le canal chlorure à rectification sortante (ORCC, *Outwardly Rectifying Chloride Channel*).

L'étude moléculaire du gène *CFTR* a été réalisée dans le cadre d'une collaboration internationale exemplaire menée sous l'égide du découvreur du gène – Lap Chee Tsui – au travers d'un Consortium International d'Etude des Mutations du Gène (Cystic Fibrosis Gene Mutation Analysis : <http://www.genet.sickkids.on.ca>, dans lequel plus de 100 laboratoires dans le monde ont, depuis 20 ans, colligé en temps réel les résultats de leurs travaux.

Nous avons aujourd'hui une connaissance approfondie de la pathologie moléculaire du gène *CFTR*, qui se caractérise par la présence d'une mutation très fréquente : la délétion F508del correspondant à la perte d'une phénylalanine en position 508 de la protéine (nomenclature officielle selon les recommandations de la Human Genome Variation Society : p.Phe508del). Cette délétion est présente sur plus de deux chromosomes mutés sur trois. La fréquence de quatre autres mutations dépasse le seuil de 1 % (G542X (p.Gly542X) ; G551D (p.Gly551Asp) ; 1717-1G>A (c.1585-1G>A) ; W1282X (p.Trp1282X)) et à côté de cela, il existe aujourd'hui 1800 mutations répertoriées, dispersées au sein des 27 exons du gène. Ce sont souvent des événements rares ou privés, témoignant de l'extraordinaire variabilité allélique présente dans le gène *CFTR*.

Le type de mutations, leurs fréquences varient beaucoup selon l'origine géographique et ethnique des patients, et il est important, pour orienter le laboratoire dans sa recherche de mutations, de bien documenter les origines géographiques des patients et de leurs parents. Pour illustrer ceci, on peut rappeler que la mutation W1282X est la mutation la plus fréquente dans la population juive Ashkénaze tandis que la mutation G551D rend compte de 5 % des mutations dans les populations d'origine celte. La mutation G542X est fréquente dans les populations du pourtour méditerranéen.

2. Les classes de mutations :

Les 1800 mutations de ce gène, qui sont essentiellement des mutations ponctuelles, ont pu être réparties en cinq classes selon l'impact qu'elles produisent sur la fonction de la protéine :

- Les mutations de classe 1 sont des mutations non sens ou des délétions/insertions, plus rarement de grande délétions conduisant à une absence d'expression de la protéine CFTR à la surface de la membrane apicale des cellules épithéliales.
- Les mutations de classe 2 conduisent à des anomalies de repliement et de trafic intracellulaire de la protéine (la mutation F508del appartient à la classe 2).
- Les mutations de classe 3 impactent la régulation de la protéine CFTR et sont souvent des mutations faux sens situées au niveau des domaines NBF (*Nucleotide Binding Fold*) où se lie l'ATP.
- Les mutations de classe 4 sont des mutations faux sens situées dans le canal transmembranaire et ces mutants affectent la conductance du canal CFTR.
- Les mutations de classe 5 correspondent à des anomalies moléculaires qui affectent la transcription. Elles diminuent quantitativement la quantité de transcrits normalement exprimés et donc *in fine* la quantité de protéine CFTR exprimée à la membrane.

3. Les relations génotype/phénotype :

Le type de mutations, leurs fréquences varient beaucoup selon l'origine géographique et ethnique des patients, et il est important, pour orienter le laboratoire dans sa recherche de mutations, de bien documenter les origines géographiques des patients et de leurs parents. Pour illustrer ceci, on peut rappeler que la mutation W1282X est la mutation la plus fréquente dans la population juive Ashkénaze tandis que la mutation G551D rend compte de 5 % des mutations dans les populations d'origine celte. La mutation G542X est fréquente dans les populations du pourtour méditerranéen.

La découverte des mutations du gène *CFTR* a, depuis 20 ans, ouvert un champ nouveau de recherche qui nous permet de mieux comprendre les relations entre le génotype et le phénotype, et par là même, de mieux comprendre l'influence respective de la génétique et de l'environnement sur la variabilité de l'expression clinique observée chez les patients atteints de mucoviscidose.

Selon leur impact sur la fonction de la protéine, on considère de façon un peu schématique que les mutations peuvent être classées en « mutations sévères » où l'on range les mutations de classe 1, 2 et 3, ou en « mutations peu sévères » où l'on retrouve les mutations de classe 4 et 5.

Les mutations dites sévères sont associées, sur le plan phénotypique, à une insuffisance pancréatique et à une atteinte pulmonaire qui débute dans l'enfance. Ce sont les formes de présentation classique de la maladie et les patients homozygotes F508del en sont les exemples les plus fréquemment rencontrés.

Au-delà des mutations portées par le patient, la variabilité de l'expression de la maladie est aussi largement influencée par des facteurs d'environnement (tabagisme, pollution, facteurs socio-économiques, compliance au traitement, ...) et par d'autres facteurs génétiques que l'on appelle des gènes modificateurs (gènes impliqués dans la réponse immunitaire, dans l'inflammation, ...).

4. Diagnostic moléculaire :

Aujourd'hui la stratégie d'étude du gène est bien codifiée. Devant un tableau clinique de suspicion de mucoviscidose, la première étape, la plus simple, est de rechercher la présence de mutations fréquentes. Pour ce faire, il existe aujourd'hui de nombreux kits qui permettent de dépister en quelques heures une trentaine de mutations du gène, mutations qui sont les plus fréquemment rencontrées dans le monde. L'étude de ces 30 mutations permet, dans 60 % des cas, d'établir le génotype du patient. Les deux mutations sont alors identifiées ; elles sont soit identiques et le patient est homozygote pour la mutation considérée, soit différentes et le patient est dit hétérozygote composite.

Si le génotype est incomplet parce qu'il manque une ou deux mutations, l'étude du gène est poursuivie par une technique dite de balayage, qui permet au niveau de chacun des exons du gène de mettre en évidence la présence d'une anomalie moléculaire confirmée par une réaction de séquençage. Au terme de ce balayage complet des 27 exons du gène, les 1800 mutations sont recherchées et s'il reste encore un allèle non identifié, il faut mettre en place une technique de recherche de grand réarrangement (délétion/duplication). Ces anomalies rendent compte de 2 % des anomalies du gène *CFTR*.

Au terme de cette recherche, il reste environ 1 à 2 % des sujets atteints de mucoviscidose (selon l'origine géographique ou ethnique) pour lesquels au moins une mutation n'est pas caractérisée. Il est probable qu'il s'agit chez ces patients de mutations introniques ou de mutations situées dans les régions régulatrices en 5' ou en 3' du gène.

- **Peut-on dépister cette maladie avant qu'elle ne se déclare?**

Depuis 2002, on pratique systématiquement en France le dépistage de la mucoviscidose chez tous les nouveaux-nés. Ce dépistage permet une prise en charge nutritionnelle et respiratoire précoce des enfants atteints. Cette prise en charge précoce améliore le pronostic de la maladie, surtout sur le plan nutritionnel et donc la croissance et le développement de l'enfant. Notons que le dépistage néonatal implique le dépistage indirect des deux parents porteurs du gène muté, ce qui permet de les informer de leur risque de transmission de la maladie et de la possibilité d'un diagnostic prénatal lors d'une grossesse ultérieure.

Le dépistage consiste en la mesure d'une enzyme pancréatique, la trypsine immunoréactive (TIR) à partir du sang recueilli sur papier buvard au 3ème jour de vie. Si ce dosage est élevé, une étude génétique visant à rechercher les altérations (mutations) du gène *CFTR* est réalisée. Si aucune mutation n'est retrouvée, on répétera le dosage de TIR à 3 semaines de vie : si celui-ci est normal, l'enfant n'est pas malade. Si au contraire des mutations du gène sont retrouvées, et aussi dans les cas où ce dernier dosage de TIR est anormal, le bébé sera immédiatement pris en charge. Si le test de la sueur est négatif et qu'aucune mutation n'a été trouvée, l'enfant n'est pas malade et ne peut transmettre la maladie. Si le test de la sueur est négatif mais qu'une mutation du gène a été trouvée, l'enfant n'est pas malade, mais pourra transmettre le gène altéré à sa descendance. Une consultation de conseil génétique sera alors proposée aux parents.

- **Le diagnostic prénatal chez les sujets à risque :**

Il est possible de faire un diagnostic prénatal dès la huitième semaine de grossesse. Ce test diagnostique est proposé aux couples à risque, *a fortiori* si l'un de leurs enfants est déjà atteint et qu'une mutation a pu être identifiée chez lui. Il consiste à rechercher l'anomalie génétique sur les villosités chorales (constituants du trophoblaste qui proviennent uniquement du fœtus) après biopsie de trophoblaste (le tissu embryonnaire à l'origine du placenta) à 12

semaines d'aménorrhée. Cet examen peut entraîner une fausse couche dans environ 1% des cas.

- **Les espoirs thérapeutiques :**

Peu de temps après la découverte du gène, la communauté médicale et scientifique s'est enthousiasmée pour le développement et la mise en place d'une thérapie génique de la mucoviscidose. Des vecteurs adéno et lentiviraux mais également des vecteurs de synthèse ont été construits, des essais cliniques de phase 1 ont été menés, mais il fallu se rendre à l'évidence dans les années 2000 que l'on était encore loin d'une possibilité de traitement par thérapie génique. D'une part, l'expression par les adénovirus était transitoire et immunogène, les cellules souches de l'épithélium pulmonaire ne sont pas identifiées. Par ailleurs, la cible essentielle, c'est-à-dire l'épithélium pulmonaire, est remaniée, inflammatoire et encombrée de mucus, ce qui rend très aléatoire l'efficacité des transfections par des vecteurs viraux ou de synthèse. On constate aujourd'hui un retour à des travaux plus fondamentaux à la fois de vectorologie qui doivent permettre de trouver un vecteur idéal et de biologie cellulaire avant d'envisager à nouveau la mise en place d'essais cliniques.

L'espoir aujourd'hui vient du développement de petites molécules qui sont de deux types : les unes appelées « correcteurs » et les secondes « potentiateurs ». Les premiers ont pour objectif de corriger l'adressage défectueux à la membrane de la protéine CFTR et le mauvais repliement de la protéine, et les seconds visent à potentialiser l'ouverture du canal chlorure.

Une molécule - le Vertex 770 - est ressortie d'un crible réalisé par une firme pharmaceutique la firme Vertex. Des essais de phase 2/3 sont en cours actuellement, avec des premiers résultats encourageant obtenus sur des patients porteurs de la mutation G551D. Ces travaux illustrent bien la démarche actuelle engagée dans la recherche de thérapies ciblées reposant sur la connaissance du génotype des patients et soulignent l'importance du dépistage néonatal précoce et la connaissance exhaustive des mutations du gène, préalable indispensable à la mise en place de ces nouvelles thérapeutiques.

Maladies Infectieuses

I. Définition :

Une maladie infectieuse est le résultat de l'agression d'un organisme vivant par un agent pathogène (virus bactérie, champignon, parasite.). Les signes cliniques liés au déséquilibre entre la virulence de l'agent pathogène et les défenses immunitaires de l'hôte.

A l'origine, l'étude des épidémies, est devenue une branche de la médecine:

- Epidémiologie descriptive : étudie les circonstances dans lesquelles l'infection ou la maladie surviennent dans une population (fréquence et répartition).
- Epidémiologie analytique : étudie les facteurs qui influencent la fréquence, l'extension et la distribution des maladies.
- Epidémiologie évaluative : étudie les résultats des interventions pour lutter contre les maladies (grippe).

II. Les différents agents pathogènes :

a. Bactéries : organisme unicellulaire (staphylocoque, pyocyanique...)

- **Pouvoir pathogène** : rôle des toxines, enzymes qui perturbent le fonctionnement des cellules.

b. Virus : ADN ou ARN. Pour se développer ils doivent se trouver dans une cellule hôte (VIH, VHB, grippe)

- **Pouvoir pathogène** : effet cytopathogène (inactivation de fonctions cellulaires ou destruction cellulaire)
- Risque de cancer par perturbation du cycle cellulaire.

c. Champignons : Candida albicans

- **Pouvoir pathogène** : destruction tissulaire et réaction inflammatoire.

d. Parasites : paludisme, toxoplasmose...

e. Prion (agent transmissible non conventionnel) : agent pathogène de nature protéique sans acide nucléique.

Les différents agents pathogènes appartiennent à l'environnement et sont définis par leur relation avec l'individu hôte :

- **Saprophytes** : Présents chez l'hôte, non pathogènes.
- **Commensaux** : Présents chez l'hôte potentiellement pathogènes en cas de déséquilibre de la flore microbienne. De nombreuses bactéries sont normalement présentes sur la peau et les muqueuses des sujets sains (saprophytes + commensaux). Elles ont un rôle de protection contre les autres agents infectieux..
- **Opportunistes** : germes pathogènes uniquement chez les sujets immunodéprimés.

1. Caractéristiques des différents agents pathogènes :

➤ *Les réservoirs.*

- Humain : portage symptomatique ou non.
- Animal : exemple de la toxoplasmose dont la transmission se fait par le chat
- Germes telluriques : exemple de la terre pour le tétanos
- Eau : légionellose.
- Air

➤ *Maladies ouvertes*

Le germe peut à tout moment diffuser spontanément hors de l'organisme malade :

- Voies respiratoires
- Voies digestives
- Voies urinaires.
- Lésions cutanéomuqueuses ouvertes.

➤ *Maladies fermées.*

Le germe reste normalement dans l'organisme infecté et n'est pas spontanément en contact avec l'extérieur (abcès profond ou sang)

Transmission par un vecteur vivant (moustique – palu) ou inanimé (aiguille, matériel de ponction...);

➤ *Modes de transmission.*

a. Transmission horizontale : inter-individuelle.

- Directe : Pas de vecteur germes peu résistants (aérienne, cutanée, sexuelle)
- Semi-indirecte (manuportée, exemple : gastroentérite)
- Indirecte : avec un vecteur animé ou non (germes très résistants)
- Transmission nouvelles technologies :
 - Aérosol, air conditionné: maladie du Légionnaire
 - Seringues : inoculation, infections des drogués
 - Transfusion (VMC, VIH, Hépatites B, C, E)
 - Chirurgie: infections nosocomiales
 - Transplantation
 - Xénogreffes

b. Transmission verticale :

Mère fœtus (toxoplasmose, listériose, varicelle...)

- *Modes d'entrée dans l'organisme cible :*

Souvent identique au mode d'évasion (voie respiratoire, digestive...).

- *Résistance :*

a. Résistance dans l'environnement : fragilité du germe (dépend de sa constitution)

b. Résistance au traitement :

- **Sauvage :** forme génétique particulière sécrétion d'enzyme résistante...
- **Acquise :** mutations.

c. Bactéries multi-résistantes :

Elles sont résistantes à plusieurs familles d'antibiotiques : possibilités thérapeutiques sont restreintes

2. Symptomatologie :

Comme le résumait en 1935 le bactériologiste français Charles Nicolle : « Malheureusement, les signes des maladies infectieuses sont presque tous les mêmes : fièvre, maux de tête,

agitation ou stupeur, éruption. Seul leur groupement, leur succession, une observation minutieuse ont pu, après de longs tâtonnements, permettre d'établir des tableaux symptomatiques particuliers et les distinguer entre eux⁴.

3. Rapports avec le corps humain

a. Phases de l'infection.

- **Incubation**
Phase silencieuse (durée variable)
- **Invasion**
Phase d'installation des symptômes
- **Phase d'état**
- **Evolution**
guérison ou aggravation (...décès) ou chronicité (ex : hépatite C)
- **Récidive**
(ex : zona)

b. Facteurs influençant la sensibilité de l'hôte :

Âge, Hygiène (trop ou pas assez), immunité.

c. Moyens de défense de l'organisme.

- **Moyens anatomiques :** Barrière cutanée et muqueuse.
- **Réaction inflammatoire :** permet de circonscrire le foyer infectieux.
Vasodilatation afflux polynucléaires et macrophages.
- **Moyens immunitaires :** Immunité cellulaire (lymphocytes)
- **Immunité humorale :** Immunoglobuline (anticorps)

d. Sites d'infection bactérienne

- Cutanéomuqueuse : érysipèle, fasciite.
- Pulmonaire : pneumopathies
- Cardiaque : endocardite
- Articulaires : Arthrite
- Osseuse : Ostéite
- Disque intervertébral : Spondylodiscite
- Système nerveux central : Méningite, encéphalite
- Passage dans le sang : Septicémie.

4. Traitements :

Chaque type de maladie a son protocole particulier de traitement lié à ce que la médecine sait faire contre eux. La lutte contre les maladies infectieuses est une lutte sans merci et ne s'éteindra sans doute jamais tant qu'on n'aura pas trouvé des moyens pour s'immuniser définitivement contre chacun des agents infectieux. Mais comme ils risquent de muter, la solution est peut-être à ce que ce soit les hommes... qui se mettent à muter. Mais cela ce sont des spéculations.

a. Maladies Bactériennes:

Les maladies bactériennes se soignent avec les antibiotiques, mais les bactéries deviennent peu à peu, de plus en plus résistantes aux traitements.

b. Maladies Virales :

Les maladies virales ne bénéficient pas encore de beaucoup de médicaments antiviraux, mais à la différence des bactéries ils ne mutent pas (ils ne se transforment pas) au point que ces médicaments ne soient plus efficaces contre eux.

a. Mycoses

Les champignons qu'on appelle aussi mycoses, sont très difficiles à combattre : les traitements sont longs et souvent ce végétal qui résiste à tout, finit par revenir comme les champignons dans un lieu humide.

b. Parasitoses

Les parasites sont très variés : des petits organismes faits d'une seule cellule comme les amibes, jusqu'aux ver solitaire qui parasite les intestins et peut faire jusqu'à 1 mètre de long. Chaque parasite bénéficie de son traitement spécifique. Il y a les anti-amibiens, les antihelminthiques, les anti-poux, bref...C'est pratiquement contre eux qu'on sait le mieux se défendre, bien que certains, comme paludisme, deviennent eux aussi résistants au traitement.

c. Prion

Les prions enfin récemment mis en cause dans la maladie de Creutzfeldt-Jacob, sont insaisissables et pour l'instant on ne sait comment s'en débarrasser.

6. Infections et maladies :

- L'exposition à un agent infectieux ne conduit pas toujours à une infection voire à une maladie. Le développement (ou non) d'une infection dépend de l'immunité innée (seule ou associée à l'immunité adaptative). Les signes (ou phénotypes) biologiques et/ou cliniques peuvent être détectés après établissement de l'infection et engagement d'une réponse immune.
- Le processus complexe qui va de l'exposition à l'agent infectieux jusqu'au développement d'une maladie infectieuse avec symptômes est sous la dépendance du contrôle de l'hôte et de l'environnement (**figure 01**).
- Les facteurs d'hôte peuvent être génétiques (ex. mutation au niveau d'un gène impliqué dans l'immunité anti-infectieuse) ou non-génétiques (ex lésions cutanées). Ils peuvent jouer au niveau de l'exposition (rôle des barrières cutanées ou muqueuses) ou au niveau de l'infection par le micro-organisme (immunité innée et adaptative).
- Les facteurs environnementaux peuvent être microbiens (ex, facteurs de virulence) ou reliés au mode d'exposition (ex, air, température), et peuvent avoir un impact à chaque stade de l'infection

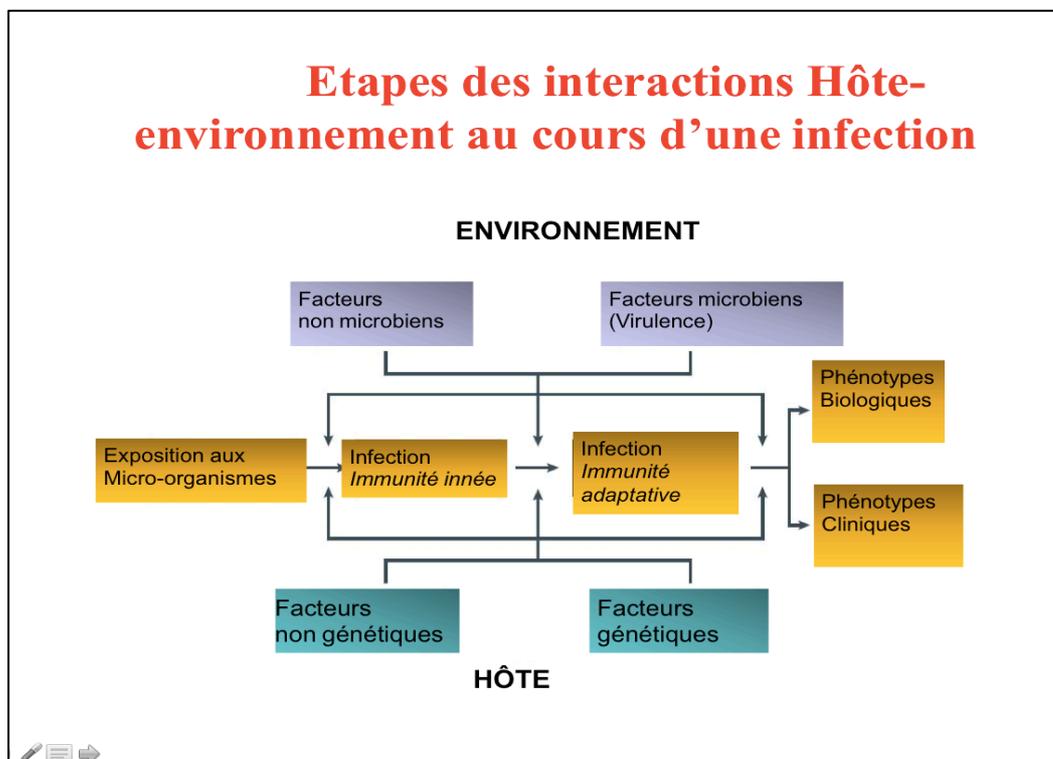


Figure 01 : Etapes des interactions Hôte- environnement au cours d'une infection

- **La détection du génome par amplification génique**

- Ces 30 dernières années ont vu « fleurir » les techniques de biologie moléculaire après la première description en 1985 de la PCR (Polymerase Chain Reaction) consistant à amplifier une séquence nucléidique cible du génome. Mais la PCR se prête mal à un diagnostic rapide (délai de réponse de 3 à 16 heures), d'où l'intérêt de l'utilisation d'automates de PCR en temps réel (RT-PCR) qui permettent un diagnostic en moins de 2 heures, là où les techniques classiques, sérologie et cultures, demandent plusieurs jours.

- D'autres techniques sont utilisées : la PCR-duplex et la PCR-multiplex qui sont des réactions conçues pour détecter plus d'un agent pathogène dans une seule réaction et la Nested/semi-nested polymérase chain réaction utilisée pour augmenter la sensibilité de l'amplification.

- **Principales indications :**

- Diagnostic de l'infection à VIH/Sida : diagnostic précoce de la primo-infection, du suivi thérapeutique et de la transmission mère - enfant. Elle permet la mesure de la quantité des virus appelée « charge virale » et est aussi utilisée pour le génotypage des souches qui permet de mettre en évidence les mutations de résistances aux anti-rétroviraux (patients en échec thérapeutique).

- Diagnostic des méningites bactériennes aiguës par PCR-multiplex (LCR).

- Diagnostic de bactéries à culture lente, comme *Mycobacterium tuberculosis*, des bactéries intra-cellulaires (*Rickettsia* sp.), des bactéries non cultivables (*Mycobacterium leprae*). L'amplification du génome de *Mycobacterium tuberculosis* par des techniques PCR est utilisée à la fois pour le diagnostic de la tuberculose et pour la détection de la résistance à la rifampicine.

- Diagnostic de la Maladie à virus Ebola (sang, sérum, autres liquides, ...) par RT-PCR.

- Détection de l'ADN des virus des hépatites : virus de l'hépatite B (ADN/VHB) et du virus de l'hépatite C (ARN/VHC) sériques permettant la quantification virale.

- Détection des papillomavirus

- Détection des virus grippaux. La RT-PCR multiplex permet de différencier les virus grippaux A/H1N1 et A/H3N2 saisonniers et les virus grippaux du groupe B.

- Diagnostic des mycoses : la PCR et la RT-PCR sont applicables au diagnostic des mycoses profondes : candidose (sang), aspergillose invasive (sang, LBA), et surtout

pneumocystose qui est la mycose profonde pour laquelle la RT-PCR est indispensable pour détecter au plus tôt les malades et instaurer un traitement.

- Pour conclure :

La maladie est une conséquence (voire “un dérivé”) de la réplication d’un pathogène dans des conditions définies. Le plus souvent, les agressions au niveau de l’hôte (maladie infectieuse) ne sont pas la conséquence directe de l’action de l’agent pathogène. C’est le résultat d’une réaction forte du système immunitaire face à l’infection!!

Chapitre II

Epigénétique

I. Introduction a l'épigénétique :

Nos cellules contiennent la même information génétique, elles n'en font pas toutes le même usage : une cellule du foie n'a pas les mêmes fonctions qu'une cellule du cœur. De même, deux jumeaux qui partagent le même génome ne sont jamais parfaitement identiques. Cela est du aux différents phénomènes de l'épigénétique.

En effet l'épigénétique régule l'expression des gènes par des modifications chimique, comme notamment la méthylation d'une des quatre bases de l'ADN – la cytosine, ou sur les protéines qui lui sont associées, les histones. Ces modifications définissent comment ces gènes vont être utilisés par une cellule, en les activant ou en les réprimant (Gnansia 2017).

Ce changement d'activité des gènes n'implique aucune modification de la séquence d'ADN et peut être transmis lors des divisions cellulaires. Ce sont donc des signaux régulateurs héréditaires, qui s'ajoutent à l'information portée par la séquence d'ADN et sont également réversibles. Contrairement aux mutations qui affectent la séquence d'ADN.

II. Mécanismes moléculaires et épigénétique :

Les bases moléculaires de l'épigénétique et les mécanismes sous-jacents sont multiples, entre autres la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones et les ARNi (interférent) (**figure 01**).

Les deux principales marques épigénétiques sont la méthylation de l'ADN et la modification des histones. Ce sont généralement eux qui vont traduire l'influence de l'environnement en changements moléculaires sur les gènes. La méthylation de l'ADN est le mécanisme le plus connu. Elle modifie l'action d'un gène en lui ajoutant une molécule, appelée groupe méthyle (CH₃). Cela a généralement pour résultat d'inactiver ou de réduire l'activité du gène (Gnansia 2017).

L'autre mécanisme épigénétique, la modification des histones, lui, a une action plus physique. Les histones sont des protéines ressemblant à des bobines autour desquelles l'ADN s'enroule. Pour que les gènes puissent être actifs, il faut que l'ADN soit déroulé. Certains facteurs environnementaux parviennent à l'ouvrir ou à le fermer par des réactions chimiques sur les histones. Ils influencent ainsi l'activité des gènes.

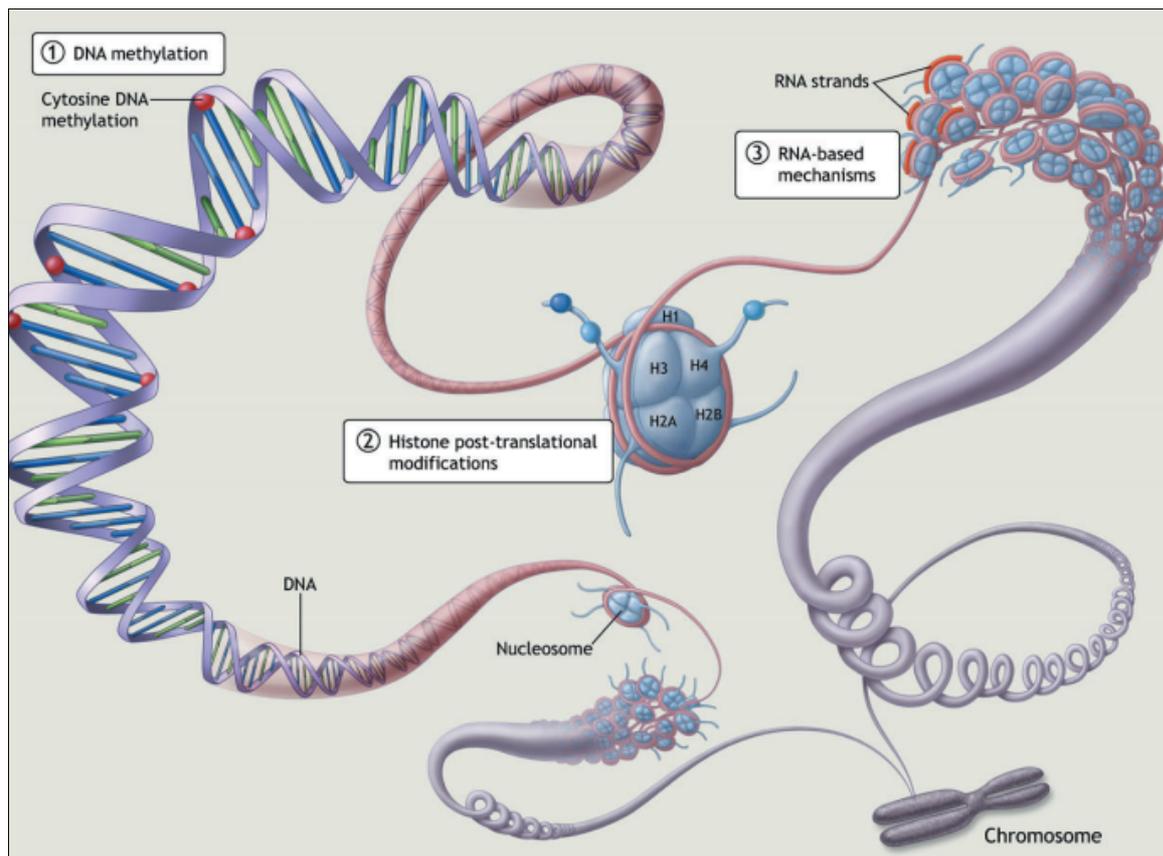


Figure 01 : représentation graphique des trois marques épigénétiques influençant la structure chromatinienne. (1) la méthylation de l'ADN implique la modification covalente de la cytosine. (2) changement post-traductionnelle des queues N-terminal des histones en influençant le compactage de la chromatine. (3) les mécanimes à base d'ARN en tant que régulateurs de la structure de la chromatine et de l'expression génique. (Matouk et Marsden 2008)

1. La méthylation des cytosines :

La méthylation de l'ADN correspond généralement à une modification covalente de l'ADN par l'ajout d'un groupement méthyl (CH_3) sur le carbone 5 d'une cytosine pour former une base appelée 5-méthylcytosine (5mC). Cette cible de la méthylation, se trouve essentiellement dans les promoteurs des gènes (Ilots CpG).

Les ilots CpG sont répartis sur l'ensemble du génome, et 70% à 80% d'entre eux sont méthylés (J. A. Law et Jacobsen 2010). On retrouve régulièrement des regroupements de CpG au niveau des régions régulatrices en 5' de gènes (promoteurs). La méthylation de ces ilots

dans les promoteurs inhibe la transcription des gènes en aval, en bloquant l'accès à des facteurs de transcriptions (méthylation directe) ou en facilitant l'attachement à des répresseurs (méthylation indirecte)(Deaton et Bird 2011).

La mise en place de la méthylation se fait par des enzymes de type ADN méthyltransférase (DNMTase).

Il existe trois DNMTase principales chez les mammifères (Smith et Meissner 2013). La méthylation dite « de maintenance », catalysée par DNMT1, permet de conserver les cytosines méthylées lors de la réplication de l'ADN. On retrouve deux types de DNMT3 impliquées dans la méthylation de novo. DNMT3A se charge principalement des régions promotrices et géniques alors que DNMT3B est active dans les séquences répétées et péri-centromériques. Ces deux enzymes sont assistées par DNMT3L, qui sert de régulatrice mais ne possède aucune activité méthyltransférase (Smith et Meissner 2013). DNMT1 est une autre DNMT dont le rôle et la méthylation d'un ARN de transfert (Goll et al. 2006).

Les fonctions que remplissent la méthylation sont très diverses selon les espèces. Chez les mammifères, elle contrôle principalement la répression de la transcription des gènes lorsqu'elle est présente au niveau des régions promotrices dans les îlots CpG. Elle est impliquée dans la défense des génomes par inactivation (silencing) des éléments répétitifs du génome. On la retrouve ainsi très présente dans les éléments génétiques mobiles ainsi que dans les régions centromériques et péri-centromériques (He, Chen, et Zhu 2011). Chez les mammifères, elle joue un rôle essentiel dans le développement embryonnaire (la gaméto-génèse implique un effacement de la 5mC, suivie d'une reméthylation spécifique, essentielle au développement embryonnaire), la différenciation cellulaire, l'inactivation aléatoire du chromosome X dans le but de rétablir l'égalité des sexes lorsque mâle et femelle ont une formule gonosomique différente, l'empreinte parentale (régions du génome activées ou inactivées par méthylation en fonction de l'origine paternelle ou maternelle de l'allèle transmise) et le vieillissement. Elle est très étudiée en santé humaine car son implication dans le développement de nombreuses maladies à caractère environnemental (ex: associées au tabagisme) est de plus en plus montré (Robertson 2005). En cancérologie, l'hyperméthylation de gènes répresseurs de tumeurs et l'hypométhylation d'oncogènes sont à l'origine du développement de cancer.

2. Modification des histones :

Dans le noyau cellulaire, l'ADN interagit avec de nombreuses protéines nucléaires pour former la chromatine. Afin de former un nucléosome l'ADN s'enroule sur une longueur de 147 paires de base autour des octamères d'histones (deux histones H2A, deux H2B, deux H3 et deux H4). L'ADN enroulé autour des nucléosomes peut former deux structures chromatiniennes : l'euchromatine, qui est une forme relâchée permettant la transcription et l'hétérochromatine, forme condensée réprimant la transcription (**Figure 02**).

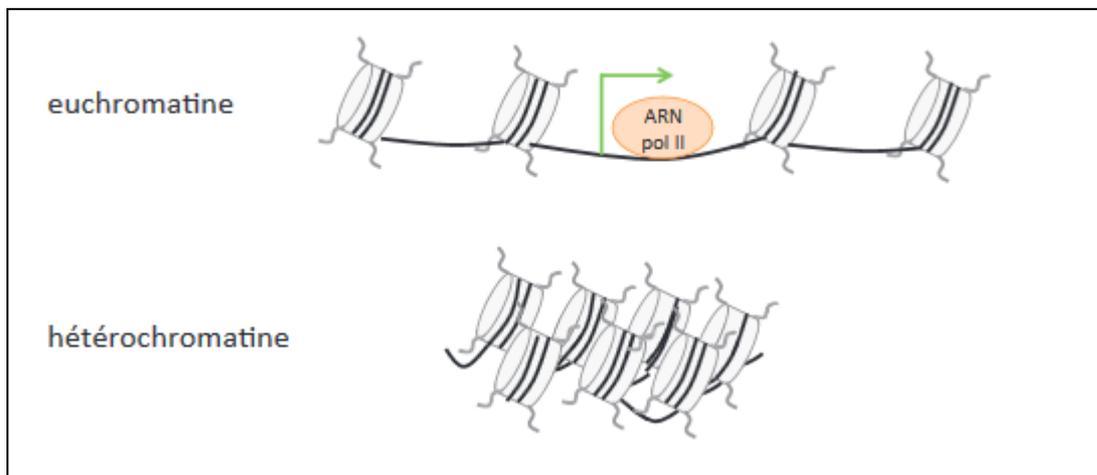


Figure 02 : Euchromatine et hétérochromatine

Les quatre types d'histones possèdent des chaînes latérales (ou queues) accessibles à l'extérieur du nucléosome et dont certains acides aminés sont candidats à des modifications post-traductionnelles covalentes. Une méthylation peut avoir lieu sur les lysines et arginines, acétylation et ubiquitylation sur les lysines uniquement, phosphorylation sur les sérines, thréonines et tyrosines, et citrullination sur les arginines (Rodríguez-Paredes et Esteller 2011)(**figure 03**).

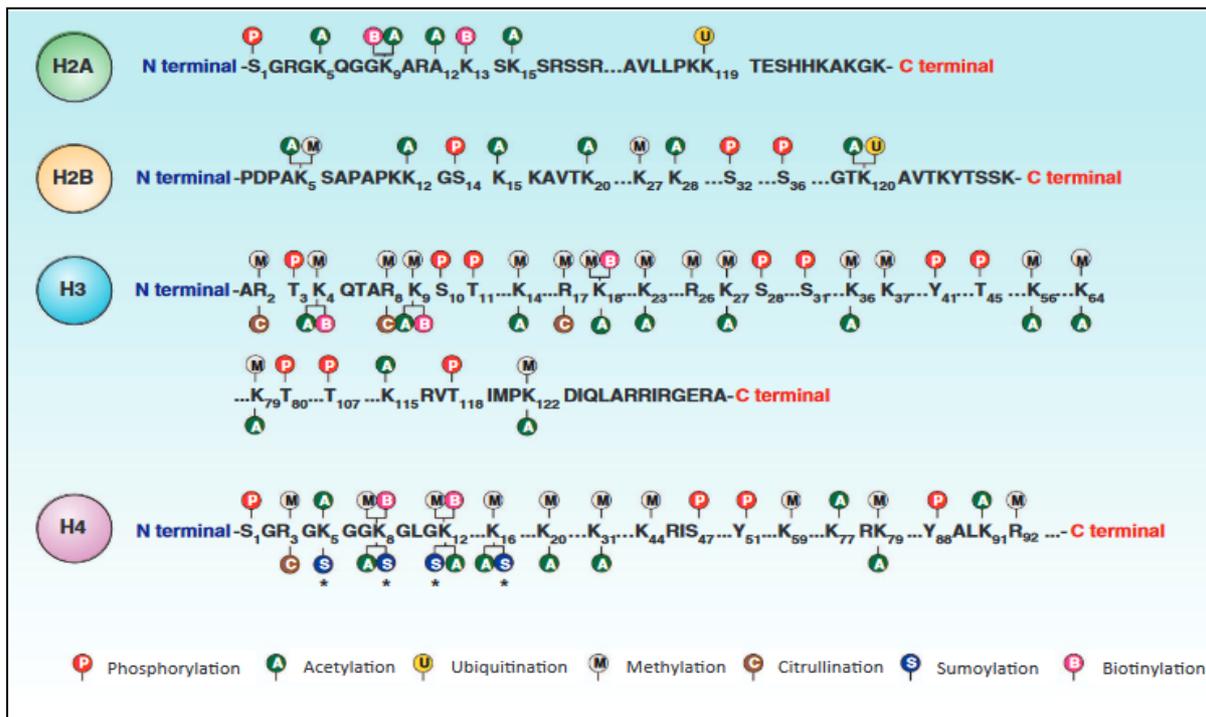


Figure 03 : les différentes modifications covalentes pouvant avoir lieu sur les chaînes latérales des quatre histones. Figure issue de (A. Y. S. Law et Wong 2010)

Les modifications biochimiques des histones sont catalysées par différentes enzymes. On retrouve les arginines déiminases (PADs), arginines méthyltransferases (PRMTs), lysines méthyltransferase, lysines acetyltransferases (KATs), lysines biotinas (HLCS), lysines ribosylases, lysines ubiquitinas, et certaines sérines/thréonines/tyrosines kinases (Zhang et Reinberg 2001). On retrouve également plusieurs types d'enzymes dont la fonction se résume à retirer les modifications chimiques des histones : arginines déméthylases, lysines déacétylases (HADCs), lysines déméthylases, lysines déribosylases, lysines déubiquitinas et sérines/thréonines/tyrosines phosphatases.

Les fonctions jouées par les modifications d'histones vont dépendre du type de modification chimique, de la présence d'autres types de modifications au même endroit, ainsi que de la localisation génomique de la marque.

Globalement ce n'est pas une marque, mais une combinaison de marques dans un contexte génomique donné qui influera sur la structure chromatinienne (Barth et Imhof 2010).

Les différents états de compaction de la chromatine sont réversibles et peuvent passer de l'un à l'autre en fonction du niveau de méthylation de l'ADN.

III. Méthodes d'études de la méthylation :

1. Méthylation specific PCR (MSP):

La PCR MS repose sur la réalisation de deux PCR distinctes visant à déterminer la présence respective d'allèles méthylées ou non méthylées. Au préalable, l'ADN doit être purifié et traité au bisulfite de sodium. Cette étape permet de convertir les cytosines (C) en uraciles (U), sauf celles protégées par la méthylation. L'ADN traité sert de gabarit aux deux réactions PCR dont chacun des couples d'amorces s'apparient uniquement à la séquence méthylée ou non méthylée (C → U). La présence ou non d'allèles méthylées est évaluée qualitativement sur gel d'agarose.

2. Séquençage bisulfite (BS-seq) (FIGURE 04):

L'ADN extrait est soumis à un traitement au bisulfite de sodium. Ce traitement convertit les cytosines non - méthylées en uracile. L'ADN converti est alors amplifié par PCR, ce qui a pour effet de remplacer les uraciles par des thymines, et est ensuite séquencé. Les 5mC ne sont pas converties par le bisulfite, et sont ainsi les seules observées dans les séquences d'ADN traitées. Avec l'aide d'outils bioinformatiques, on peut reconstruire le méthylome, avec une résolution au nucléotide près, et obtenir le pourcentage de méthylation à un site donné dans une population cellulaire.

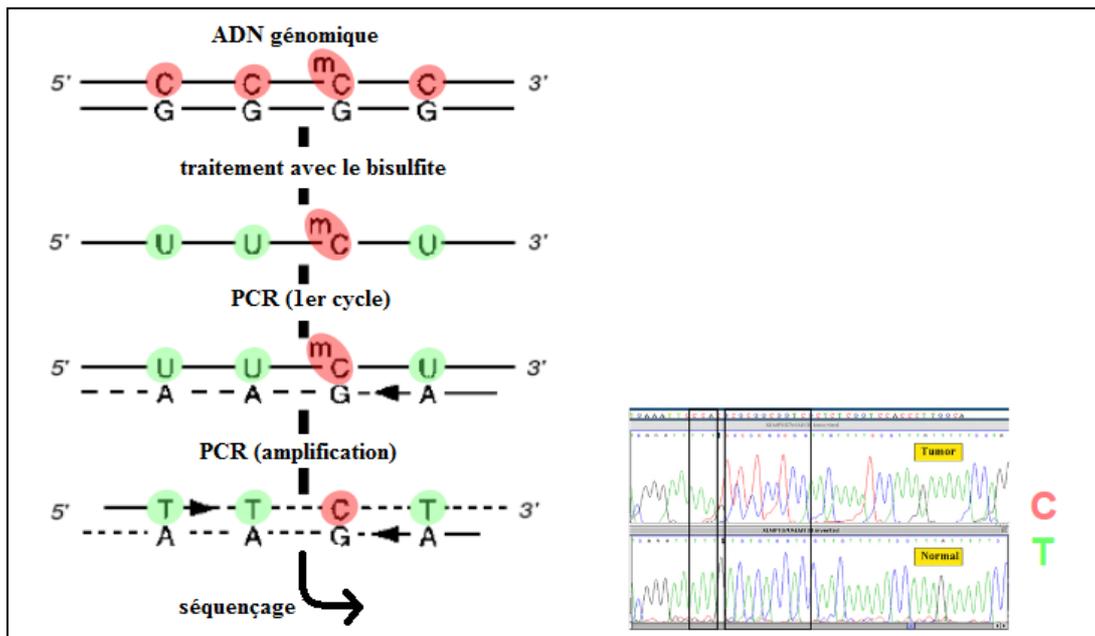


Figure 04 : séquençage après traitement au Bisulfite

IV. Méthodes d'études de l'acétylation:

Les modifications post-traductionnelles jouent un rôle important dans diverses fonctions cellulaires comme la signalisation intracellulaire (phosphorylation), la régulation de la stabilité des protéines (ubiquitination) et la régulation de la transcription (acétylation et méthylation des histones).

Pour ce qui est de l'acétylation les méthodes les plus utilisées sont (**Figure 05**) :

1. Anticorps contre les histones modifiées et ChIP :

Les cellules ou les échantillons de tissus sont traités avec un agent de «cross-linking» comme le formaldéhyde pour lier les histones à la chromatine. La chromatine est ensuite traitée avec une nucléase pour générer des fragments d'ADN courts. Une immunoprécipitation (IP) est alors réalisée à l'aide d'un anticorps dirigé contre la modification d'histone désirée. Si le site putatif de modification d'histone dans un gène ou un promoteur est connu, la PCR peut être utilisée pour quantifier la présence de la modification d'intérêt à un site donné (Spencer et al. 2003).

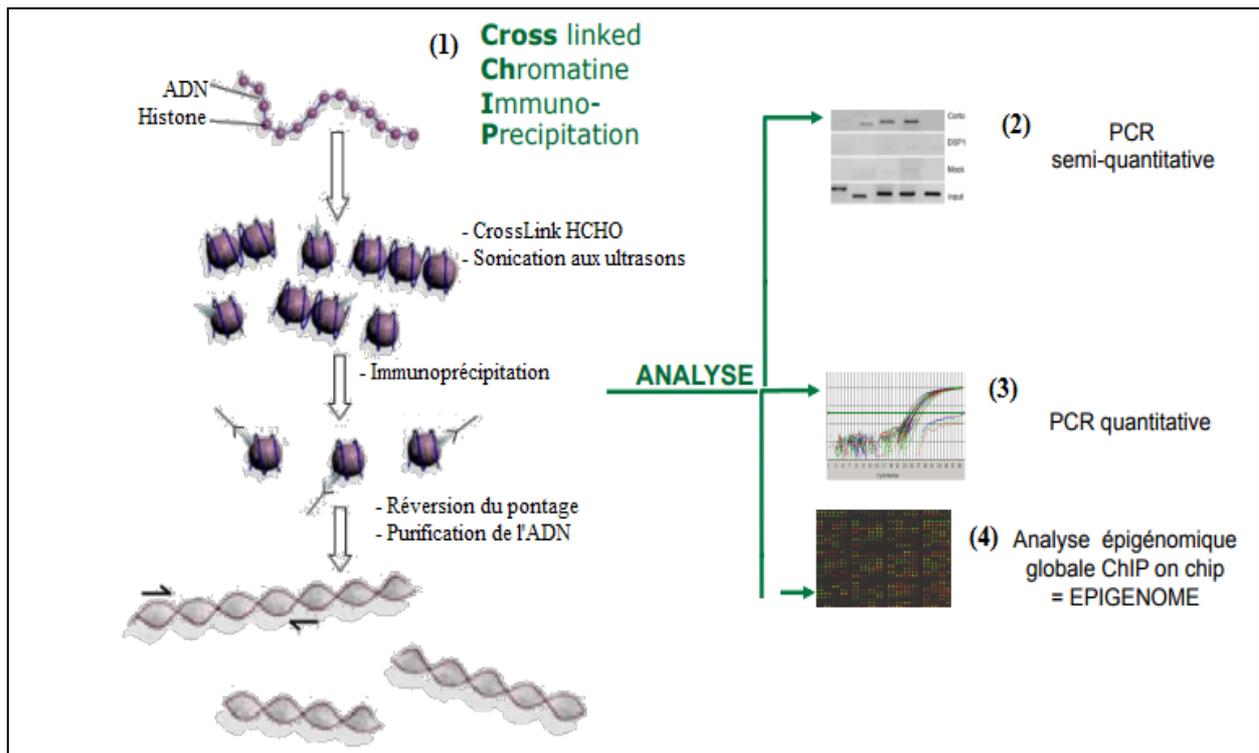


Figure 05 : méthode d'analyse des marques épigénétiques. Tirée de http://genetique.snv.jussieu.fr/OLD%20SITE/documents%202010/atelier%20epi_2010/Chromatine%20et%20mecanismes%20epigenetiques_FP_2010.pdf

2. ChIP on ChIP :

Si le site de modification d'histone est inconnu, un ChIP-on-chip peut être réalisé pour identifier les régions du génome portant les modifications d'histone spécifiques. Dans ce système, les fragments d'ADN de départ (IP input) et dans l'IP elle-même, sont marqués avec différents fluorophores. Les échantillons sont passés sur un chip présentant des sondes ADN, l'enrichissement d'un fragment d'ADN donné dans la fraction IP est en corrélation avec la localisation de l'histone modifiée d'intérêt avec un site donné du génome (Buck et Lieb 2004).

Les expériences de ChIP et ChIP-on-chip peuvent fournir des informations sur les modifications d'histones sur un promoteur d'intérêt, les cinétiques de changement dans le statut de modification, de même que sur la location des modifications d'histone concernant un gène ou une séquence régulatrice, ou sur l'ensemble du génome. Ces changements

épigénétiques peuvent apporter des informations sur la régulation de gènes dans les fonctions normales ou sur la dérégulation qui se produit lors de maladie.

V. Petits ARN et régulations :

Grace à des technologies de séquençage, la transcriptomique a pris une ampleur sans précédent. Il a été possible de mettre en évidence des ARN non codants, impliqués dans la régulation de la structure chromatinienne des eucaryotes (Holoch et Moazed 2015). Ces petits ARN ont un mécanisme d'interférence (ARNi) qui permet la répression de l'expression génique, et module la méthylation de l'ADN et les modifications d'histones (Holoch et Moazed 2015).

Les ARN interférents sont de petits ARNs non codants, double brin de 20 à 30 nucléotides (nts). Ils sont issus de la maturation d'ARNs précurseurs plus longs dans le noyau et/ou dans le cytoplasme.

L'ARNi désigne actuellement l'ensemble des régulations spécifiques de l'expression des gènes qui sont dirigées par une molécule d'ARN de petite taille qui sert de séquence guide. Ces régulations peuvent induire l'arrêt de la transcription du gène ciblé, c'est la voie nucléaire de l'ARNi (Castel et Martienssen 2013), ou agir au niveau de l'ARNm soit par un mécanisme de dégradation soit par inhibition de la traduction ; il s'agit des voies de l'extinction post-transcriptionnelle des gènes :

- La voie des siRNA (small interfering RNA) :

Les siARNs sont des petits ARN double brin d'environ 21 nts, impliqués dans la dégradation séquence spécifique des ARNm cibles. Ils sont formés de deux brins de 19 nts complètement complémentaires et de deux nts sortants sur chacune des extrémités 3'. Ces petits ARNs sont issus d'ARNdb qui peut être d'origine endogène ou exogène ; l'ARNdb exogène peut être virale ou introduit par injection dans l'organisme ou encore transcrit à partir d'un transgène dupliqué avec répétition inverse. Ils sont capables d'inhiber l'expression d'un gène par complémentarité parfaite avec les séquences d'ARNm. De nombreuses études ont montré que cette voie de l'ARNi est spécifique de la lignée somatique et impliquée dans l'intégrité du génome en le protégeant contre les ADN parasites comme les transposons et les virus (Ghildiyal et Zamore 2009)

- La voie des miRNA (micro RNA) :

Les miRNAs sont une catégorie d'ARN simple brin non codant d'environ 22 nts. Leur maturation requiert l'intervention de deux enzymes de type RNaseIII : Drosha et Dicer. Les gènes régulés par cette voie sont impliqués dans un grand nombre de fonctions physiologiques essentielles telles que le métabolisme (Moore et al. 2010), la croissance (Shenoy et Blalock 2014), la différenciation cellulaire (Ivey et Srivastava 2010), le développement des plantes (Chen, Liu, et Bradley 2004) etc.

- La voie des piRNA (PIWI interacting RNA) :

Les piRNAs (*PIWI Interacting RNA*) sont des petits ARN non codants de 26 à 31 nucléotides. Ils s'associent avec les protéines de type PIWI pour former des complexes ribonucléoprotéiques impliqués notamment dans la répression des retrotransposons au sein de la lignée germinale (Lau et al. 2006).

1. Mode d'action de l'interférence :

L'ARNsi s'associe à un complexe protéique en formant un nouveau complexe appelé RISC (RNA Induced Silencing Complex). C'est en cet équipage qu'il se porte sur sa cible : l'ARNm auquel il s'apparie.

En cas d'appariement parfait (ARNsi), l'ARNm est détruit et par conséquent il n'est pas traduit. Et les RISC qui sont à l'origine de cette destruction restent ensuite parfaitement fonctionnels, ce qui leur permet d'opérer de nouveau sur d'autres ARNm de même spécificité. Lorsque l'appariement est imparfait (ARNmi), il y a tout de même barrage à la traduction de l'ARNm (figure 04).

Les ARNmi comme les ARNsi réduisent donc les gènes au silence en agissant au stade post-transcriptionnel.

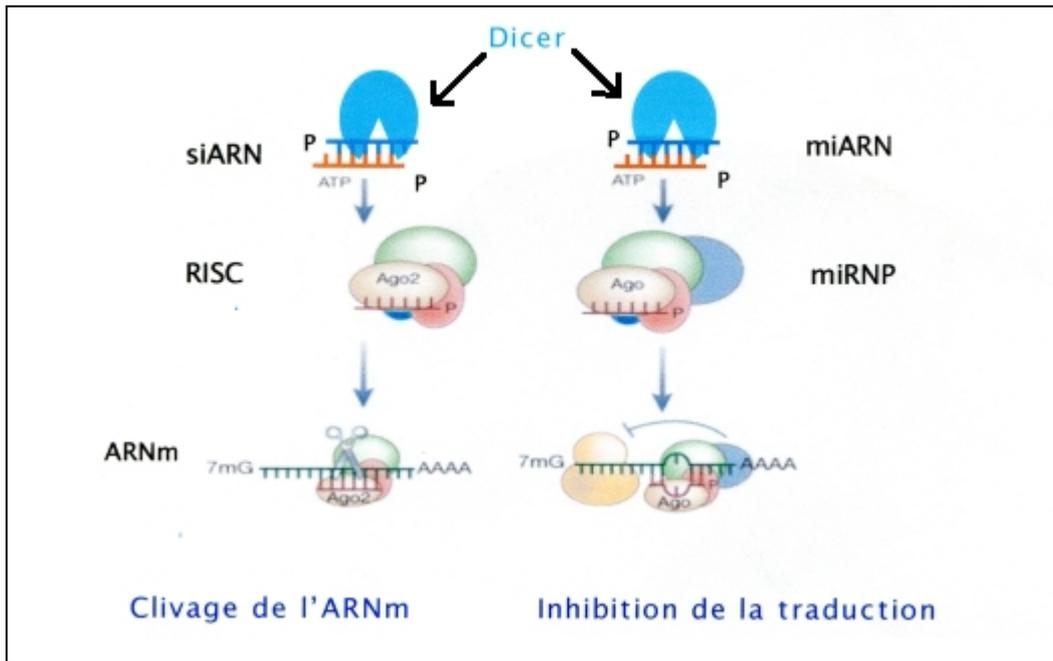


Figure 04 : mécanisme général de la voie de l'iARN.

Dicer est une RNase III qui clive le pré-miARN en un duplex miARN dans la voie endogène. Dans la voie exogène l'ARNdb est clivé par la ribonucléase en siARN.

Ago est une protéine basique qui existe sous plusieurs formes (Ago1, 2, 3 et 4). Ces protéines possèdent un domaine Piwi/argonaute/zwiller (PAZ) qui permet la liaison du brin d'ARN catalytique. Tirée de (Meister et Tuschl 2004).

- **Les premières applications :**

Ces petits ARN (ARNsi ou ARNm), susceptibles de détruire spécifiquement un ARNm cible, n'ont pas été longs à entrer dans la panoplie des nouveaux outils de la biologie moléculaire. Ils présentent en effet un double intérêt :

1. de révélateur de la fonction des gènes, puisqu'une fonction qui n'est plus accomplie dit, par défaut, celle que tenait le gène lorsque son ARNm pouvait être traduit en protéine ;
2. d'outil thérapeutique, puisque le message nocif de tel ou tel gène peut être interdit d'expression.

Des recherches effectuées plusieurs groupes ont montré que l'interférence ARN était capable de diminuer la réplication de HIV-1 dans des lymphocytes en ciblant soit des gènes viraux (Tat, Gag et Rev) soit des gènes de la cellule hôte (CCR5 et CD4) (Li et al. 2003).

VI. Epigénétique et mode de vie : lien entre l'environnement et génome :

Il est devenu évident que la vaste majorité des maladies humaines ne sont ni le résultat d'une exposition environnementale isolée ni celui de la mutation d'un gène unique, mais sont le plus souvent dues à des facteurs de risque génétiques et/ou environnementaux dont les effets peuvent se conjuguer.

L'épigénétique représenterait l'interface sur laquelle l'environnement agit pour modifier l'expression de nos gènes et induire des changements comportementaux. En effet, de récentes découvertes démontrent que l'adversité durant l'enfance se traduit par des modifications épigénétiques qui persistent à l'âge adulte, et qui modifient l'expression de certains gènes impliqués dans la régulation de fonctions comportementales comme, par exemple, la réponse au stress (Gnansia 2017).

Des études sur le cerveau de personnes suicidaires ont démontré la présence de différents schémas de méthylation avec des variations d'expression différentes. Par exemple, le récepteur tyrosine kinase (trkB) (Ernst et al. 2009), le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) (Keller S et al. 2010), un récepteur GABAergique (GABAA) (Poulter et al. 2008) et certains gènes des polyamines (Fiori et Turecki 2010).

Des études similaires se sont intéressées aux différences de méthylation dans les promoteurs de chaque gène du génome dans le cerveau de suicidaires victimes d'abus. Les résultats suggèrent que les niveaux de méthylation des promoteurs sont plus élevés dans l'hippocampe des suicidaires abusés que chez les contrôles sains. Les différences significatives entre suicidaires abusés et contrôles sains se retrouvent évidemment dans plusieurs gènes. Par contre, il a été noté que ces différences de méthylation se retrouvent enrichies dans un ensemble de gènes impliqués dans la plasticité cellulaire (Labonte et al. 2012).

Références bibliographiques

- Abbs, S., S. Tuffery-Giraud, E. Bakker, A. Ferlini, T. Sejersen, et C. R. Mueller. 2010. « Best Practice Guidelines on Molecular Diagnostics in Duchenne/Becker Muscular Dystrophies ». *Neuromuscular Disorders*, juin, 422-427. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2010.04.005>.
- Angelini, C, M Fanin, M. P Freda, F Martinello, M Miorin, P Melacini, G Siciliano, E Pegoraro, M Rosa, et G. A Danieli. 1996. « Prognostic factors in mild dystrophinopathies ». *Journal of the Neurological Sciences* 142 (1):70-78. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(96\)00144-X](https://doi.org/10.1016/0022-510X(96)00144-X).
- Ataga, Kenneth I., Laura M. DeCastro, Paul Swerdlow, Yogen Saunthararajah, Wally Smith, et The ICA-17043 Study Investigators. 2004. « Efficacy and Safety of the Gardos Channel Inhibitor, ICA-17043, in Patients with Sickle Cell Anemia. » *Blood* 104 (11):103-103.
- Bagnall, Richard D., Naushin Waseem, Peter M. Green, et Francesco Giannelli. 2002. « Recurrent Inversion Breaking Intron 1 of the Factor VIII Gene Is a Frequent Cause of Severe Hemophilia A ». *Blood* 99 (1):168-174. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.1.168>.
- Barth, Teresa K., et Axel Imhof. 2010. « Fast signals and slow marks: the dynamics of histone modifications ». *Trends in Biochemical Sciences* 35 (11):618-626. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.05.006>.
- Beggs, Alan H., Michel Koenig, Frederick M. Boyce, et Louis M. Kunkel. 1990. « Detection of 98% of DMD/BMD Gene Deletions by Polymerase Chain Reaction ». *Human Genetics* 86 (1):45-48. <https://doi.org/10.1007/BF00205170>.
- Berntorp, E. 2001. « Immune Tolerance Induction: Recombinant vs. Human-Derived Product ». *Haemophilia* 7 (1):109-113. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2001.00466.x>.
- Bertoni, Carmen, Sohail Jarrahan, Thurman M. Wheeler, Yining Li, Eric C. Olivares, Michele P. Calos, et Thomas A. Rando. 2006. « Enhancement of plasmid-mediated gene therapy for muscular dystrophy by directed plasmid integration ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (2):419-424. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504505102>.
- Bertoni, Carmen, et Thomas A. Rando. 2002. « Dystrophin Gene Repair in Mdx Muscle Precursor Cells in Vitro and in Vivo Mediated by RNA-DNA Chimeric Oligonucleotides ». *Human Gene Therapy* 13 (6):707-718. <https://doi.org/10.1089/104303402317322276>.
- Blake, Derek J., Andrew Weir, Sarah E. Newey, et Kay E. Davies. 2002. « Function and Genetics of Dystrophin and Dystrophin-Related Proteins in Muscle ». *Physiological Reviews* 82 (2):291-329. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2001>.
- Bolton-Maggs P, Pasi KJ. Haemophilia A and B. *Lancet* 2003;361:1801-9
- Evatt BL, Farrugia A, Shapiro AD et al. Haemophilia 2002: emerging risks of treatment. *Haemophilia* 2002;8:221-9
- Bougeon, Pierre. 2008. « Les myopathies innées et acquises ». *Actualités pharmaceutiques* 471 (47):10-21. [https://doi.org/10.1016/S0515-3700\(08\)70281-7](https://doi.org/10.1016/S0515-3700(08)70281-7).

- Brugnara, C, L de Franceschi, et S L Alper. 1993. « Inhibition of Ca(2+)-dependent K⁺ transport and cell dehydration in sickle erythrocytes by clotrimazole and other imidazole derivatives. » *Journal of Clinical Investigation* 92 (1):520-526.
- Buck, Michael J., et Jason D. Lieb. 2004. « ChIP-Chip: Considerations for the Design, Analysis, and Application of Genome-Wide Chromatin Immunoprecipitation Experiments ». *Genomics* 83 (3):349-360.
- Camirand G. (2004). Développement d'un protocole d'induction de tolérance immunologique applicable à la transplantation de myoblastes comme traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne. Thèse présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval dans le cadre du programme de doctorat en Microbiologie et Immunologie pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor. Faculté de Médecine Université Laval Québec. 1-26.
- Castel, Stephane E., et Robert A. Martienssen. 2013. « RNA Interference in the Nucleus: Roles for Small RNAs in Transcription, Epigenetics and beyond ». *Nature Reviews Genetics*. 1 février 2013. <http://link.galegroup.com/apps/doc/A316939556/AONE?sid=googlescholar>.
- Chamberlain, Jeffrey S., Richard A. Gibbs, Joel E. Rainer, Phi Nga Nguyen, et C. Thomas. 1988. « Deletion Screening of the Duchenne Muscular Dystrophy Locus via Multiplex DNA Amplification ». *Nucleic Acids Research* 16 (23):11141-11146. <https://doi.org/10.1093/nar/16.23.11141>.
- Chen, You-Tzung, Pentao Liu, et Allan Bradley. 2004. « Inducible Gene Trapping with Drug-Selectable Markers and Cre/loxP To Identify Developmentally Regulated Genes ». *Molecular and Cellular Biology* 24 (22):9930-9941. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.22.9930-9941.2004>.
- Darabi, Radbod, Kimberly Gehlbach, Robert M. Bachoo, Shwetha Kamath, Mitsujiro Osawa, Kristine E. Kamm, Michael Kyba, et Rita C. R. Perlingeiro. 2008. « Functional Skeletal Muscle Regeneration from Differentiating Embryonic Stem Cells ». *Nature Medicine* 14 (2):134-143. <https://doi.org/10.1038/nm1705>.
- Deaton, Aimée M., et Adrian Bird. 2011. « CpG Islands and the Regulation of Transcription ». *Genes & Development* 25 (10):1010-1022. <https://doi.org/10.1101/gad.2037511>.
- Dubowitz, V. 1992. « The muscular dystrophies. » *Postgraduate Medical Journal* 68 (801):500-506.
- Ernst, C., Vesselina Deleva, Xiaoming Deng, Adolfo Sequeira, Amanda Pomarenski, T. Klempan, Neil Ernst, et al. 2009. « Alternative Splicing, Methylation State, and Expression Profile of Tropomyosin-Related Kinase B in the Frontal Cortex of Suicide Completers ». *Archives of General Psychiatry* 66 (1):22-32. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.66.1.22>.
- Fiori, Laura M., et Gustavo Turecki. 2010. « Genetic and Epigenetic Influences on Expression of Spermine Synthase and Spermine Oxidase in Suicide Completers ». *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 13 (6):725-736. <https://doi.org/10.1017/S1461145709991167>.

- Ghildiyal, Megha, et Phillip D. Zamore. 2009. « Small Silencing RNAs: An Expanding Universe ». *Nature Reviews Genetics* 10 (2):94. <https://doi.org/10.1038/nrg2504>.
- Girot R. ;(2003). La bêta-thalassémie. Encyclopédie Orphanet. Octobre.
- Girot R. ;(1999) -Thalassémie, drépanocytose. Physiopathologie et diagnostic.Rev Prat ; 49 : 667-674.
- Girot R. ;(1994). Thalassémies : physiopathologie et diagnostic .Revue du praticien, 44 : 52- 28.)
- Gitschier, J., W. I. Wood, T. M. Goralka, K. L. Wion, E. Y. Chen, D. H. Eaton, G. A. Vehar, D. J. Capon, et R. M. Lawn. 1984. « Characterization of the Human Factor VIII Gene ». *Nature* 312 (5992):326-330.
- Gnansia, E. 2017. « Environnement, génétique et épigénétique ». *Revue de médecine périnatale* 2 (9):66-72. <https://doi.org/10.1007/s12611-017-0413-4>.
- Goll, Mary Grace, Finn Kirpekar, Keith A. Maggert, Jeffrey A. Yoder, Chih-Lin Hsieh, Xiaoyu Zhang, Kent G. Golic, Steven E. Jacobsen, et Timothy H. Bestor. 2006. « Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA Methyltransferase Homolog Dnmt2 ». *Science* 311 (5759):395-398. <https://doi.org/10.1126/science.1120976>.
- Gowers WR. (1879). Clinical lecture on pseudo-hypertrophic muscular paralysis. *Lancet*. 2: 37-39.
- He, Xin-Jian, Taiping Chen, et Jian-Kang Zhu. 2011. « Regulation and function of DNA methylation in plants and animals ». *Cell Research* 21 (3):442-465. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.23>.
- Herrick JB. ; (1910). Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. *Arch Intern Med*; 6: 517- 521.
- Higgs DR. ;(1993). alpha-Thalassemia. In: Higgs DR&Weatherall DJ. *The haemoglobinopathies, Clinical Haematology*. Bailliere's.
- Hoën, Peter AC 't, Caroline GC van der Wees, Annemieke Aartsma-Rus, Rolf Turk, Aurélie Goyenvalle, Olivier Danos, Luis Garcia, Gert-Jan B van Ommen, Johan T den Dunnen, et Judith CT van Deutekom. 2006. « Gene expression profiling to monitor therapeutic and adverse effects of antisense therapies for Duchenne muscular dystrophy ». *Pharmacogenomics* 7 (3):281-297. <https://doi.org/10.2217/14622416.7.3.281>.
- Hoffman, E. P., et L. M. Kunkel. 1989. « Dystrophin Abnormalities in Duchenne/Becker Muscular Dystrophy ». *Neuron* 2 (1):1019-1029.
- Holoch, Daniel, et Danesh Moazed. 2015. « RNA-Mediated Epigenetic Regulation of Gene Expression ». *Nature Reviews Genetics* 16 (2):71. <https://doi.org/10.1038/nrg3863>.
- Ivey, Kathryn N., et Deepak Srivastava. 2010. « MicroRNAs as Regulators of Differentiation and Cell Fate Decisions ». *Cell Stem Cell* 7 (1):36-41. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.06.012>.
- Kafando, Eleonore, Léon Savadogo, J. Ayéroué, Éric William Camille Nacoulma, Françoise Vertongen, Alina Ferster, Frédéric Cotton, et Béatrice Gulbis. 2008. « Les Syndromes

- Drépanocytaires Majeurs: Une Enquête Anonyme Auprès Du Corps Médical Au Burkina Faso ». *Médecine Tropicale* 68 (3):241-46.
- Kaplan JC ;Delpuch M. ;(1989).Génétique moléculaire de quelques maladies constitutionnelles. In : Biologie moléculaire et médecine. Flammarion Médecine-Sciences, Paris , 273-338.
- Labonte, Benoit, Volodymyr Yerko, Jeffrey Gross, Naguib Mechawar, Michael J. Meaney, Moshe Szyf, et Gustavo Turecki. 2012. « Differential Glucocorticoid Receptor Exon 1B, 1C, and 1H Expression and Methylation in Suicide Completers with a History of Childhood Abuse ». *Biological Psychiatry, Endocrinology, Epigenetics, Extinction, and Early Life Traumatization*, 72 (1):41-48. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.01.034>.
- Lau, Nelson C., Anita G. Seto, Jinkuk Kim, Satomi Kuramochi-Miyagawa, Toru Nakano, David P. Bartel, et Robert E. Kingston. 2006. « Characterization of the piRNA Complex from Rat Testes ». *Science* 313 (5785):363-67. <https://doi.org/10.1126/science.1130164>.
- Law, Alice Y. S., et Chris K. C. Wong. 2010. « Stanniocalcin-2 Is a HIF-1 Target Gene That Promotes Cell Proliferation in Hypoxia ». *Experimental Cell Research* 316 (3):466-76. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.09.018>.
- Law, Julie A., et Steven E. Jacobsen. 2010. « Establishing, Maintaining and Modifying DNA Methylation Patterns in Plants and Animals ». *Nature Reviews Genetics* 11 (3):204. <https://doi.org/10.1038/nrg2719>.
- Li, Ming-Jie, Gerhard Bauer, Alessandro Michienzi, Jiing-Kuan Yee, Nan-Sook Lee, James Kim, Shirley Li, Daniela Castanotto, John Zaia, et John J. Rossi. 2003. « Inhibition of HIV-1 Infection by Lentiviral Vectors Expressing Pol III-Promoted Anti-HIV RNAs ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 8 (2):196-206.
- Lu, Q.L., G.E. Morris, S.D. Wilton, T. Ly, O.V. Artem'yeva, P. Strong, et T.A. Partridge. 2000. « Massive Idiosyncratic Exon Skipping Corrects the Nonsense Mutation in Dystrophic Mouse Muscle and Produces Functional Revertant Fibers by Clonal Expansion ». *The Journal of Cell Biology* 148 (5):985-96.
- MacDonald, C. Bruce, Paul W Bauer, L. Clarke Cox, et Lillian McMahon. 1999. « Otolologic findings in a pediatric cohort with sickle cell disease ». *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 47 (1):23-28. [https://doi.org/10.1016/S0165-5876\(98\)90152-5](https://doi.org/10.1016/S0165-5876(98)90152-5).
- Matouk, Charles C., et Philip A. Marsden. 2008. « Epigenetic Regulation of Vascular Endothelial Gene Expression ». *Circulation Research* 102 (8):873-87. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.171025>.
- Marques MJ. (2004). Structural biology of the dystrophin-deficient muscle fiber. *Braz. J. morphol. Sci.* 21 (3): 145-152.
- Meister, Gunter, et Thomas Tuschl. 2004. « Mechanisms of Gene Silencing by Double-Stranded RNA ». *Special Features. Nature.* 15 septembre 2004. <https://doi.org/10.1038/nature02873>.

- Moore, Kathryn J., Katey J. Rayner, Yajaira Suárez, et Carlos Fernández-Hernando. 2010. « microRNAs and cholesterol metabolism ». *Trends in Endocrinology & Metabolism* 21 (12):699-706. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.08.008>.
- Montalembert M. ;(2002). Syndromes thalassémiques. *Encycl Med Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier), Hématologie*, 13-006-D17.
- Morris, Claudia R., Gregory J. Kato, Mirjana Poljakovic, Xunde Wang, William C. Blackwelder, Vandana Sanchdev, Stanley L. Hazen, Elliott P. Vichinsky, Sidney M. Morris, et Mark T. Gladwin. 2005. « Dysregulated Arginine Metabolism, Hemolysis-Associated Pulmonary Hypertension and Mortality in Sickle Cell Disease ». *JAMA : the journal of the American Medical Association* 294 (1):81-90. <https://doi.org/10.1001/jama.294.1.81>.
- Mukoyama, Masakuni, Kiyotaro Kondo, Kazuo Hizawa, et Hiroshi Nishitani. 1987. « Life spans of Duchenne muscular dystrophy patients in the hospital care program in Japan ». *Journal of the Neurological Sciences* 81 (2):155-58. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(87\)90092-X](https://doi.org/10.1016/0022-510X(87)90092-X).
- Oldenburg, Johannes, et Osman El-Maarri. 2006. « New Insight into the Molecular Basis of Hemophilia A ». *International Journal of Hematology* 83 (2):96-102. <https://doi.org/10.1532/IJH97.06012>.
- Péault, Bruno, Michael Rudnicki, Yvan Torrente, Giulio Cossu, Jacques P. Tremblay, Terry Partridge, Emanuela Gussoni, Louis M. Kunkel, et Johnny Huard. 2007. « Stem and Progenitor Cells in Skeletal Muscle Development, Maintenance, and Therapy ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 15 (5):867-77. <https://doi.org/10.1038/mt.sj.6300145>.
- Pélissier J. et Urtizberea JA. (1996). Les maladies neuromusculaires. De la génétique à la réadaptation. (Ed) Masson. Paris. 19-23.
- Poulter, Michael O., Lisheng Du, Ian C. G. Weaver, Miklós Palkovits, Gábor Faludi, Zul Merali, Moshe Szyf, et Hymie Anisman. 2008. « GABAA Receptor Promoter Hypermethylation in Suicide Brain: Implications for the Involvement of Epigenetic Processes ». *Biological Psychiatry* 64 (8):645-52. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.05.028>.
- Prelle, A., R. Medori, M. Moggio, H. W. Chan, A. Gallanti, G. Scarlato, et E. Bonilla. 1992. « Dystrophin Deficiency in a Case of Congenital Myopathy ». *Journal of Neurology* 239 (2):76-78. <https://doi.org/10.1007/BF00862976>.
- Ragusa, Angela, Silvestra Amata, Turi Lombardo, Lucia Castiglia, Micheline Maier-Redelsperger, Dominique Labie, et Luigi Bernini. 2003. « Asymptomatic and Mild Beta-Thalassemia in Homozygotes and Compound Heterozygotes for the IVS2+1G-->A Mutation: Role of the Beta-Globin Gene Haplotype ». *Haematologica* 88 (10):1099-1105.
- Rando, Thomas A., Marie-Helene Disatnik, et Lucy Z.-H. Zhou. 2000. « Rescue of dystrophin expression in mdx mouse muscle by RNA/DNA oligonucleotides ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (10):5363-68.

- Robertson, Keith D. 2005. « DNA Methylation and Human Disease ». *Nature Reviews Genetics* 6 (8):597. <https://doi.org/10.1038/nrg1655>.
- Rodríguez-Paredes, Manuel, et Manel Esteller. 2011. « Cancer Epigenetics Reaches Mainstream Oncology ». *Nature Medicine* 17 (3):330. <https://doi.org/10.1038/nm.2305>.
- Rossiter, J. P., M. Young, M. L. Kimberland, P. Hutter, R. P. Ketterling, J. Gitschier, J. Horst, M. A. Morris, D. J. Schaid, et P. Moerloose De. 1994. « Factor VIII Gene Inversions Causing Severe Hemophilia A Originate Almost Exclusively in Male Germ Cells. » *Human Molecular Genetics* 3 (7):1035-1039. <https://doi.org/10.1093/hmg/3.7.1035>.
- S, Keller, Sarchiapone M, Zarrilli F, Videtic A, Ferraro A, Carli V, Sacchetti S, et al. 2010. « Increased BDNF Promoter Methylation in the Wernicke Area of Suicide Subjects. » *Arch Gen Psychiatry* 67 (3):258-267.
- Salima, Benseghier. 2017. « Diagnostic moléculaire des dystrophinopathies (étude phénotypique et génotypique) », janvier. <http://archives.umc.edu.dz/handle/123456789/11884>.
- Sampaolesi, Maurilio, Stephane Blot, Giuseppe D'Antona, Nicolas Granger, Rossana Tonlorenzi, Anna Innocenzi, Paolo Mognol, et al. 2006. « Mesoangioblast Stem Cells Ameliorate Muscle Function in Dystrophic Dogs ». *Nature* 444 (7119):574-579. <https://doi.org/10.1038/nature05282>.
- Serratrice, G. (2006) Introduction aux affections musculaires. *EMC (Elsevier Masson SAS, Paris)*, 17-171-A-80.
- Shenoy, Archana, et Robert H. Blelloch. 2014. « Regulation of microRNA Function in Somatic Stem Cell Proliferation and Differentiation ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (9):565. <https://doi.org/10.1038/nrm3854>.
- Skuk, Daniel, Marlyne Goulet, Brigitte Roy, Vincent Piette, Claude H. Côté, Pierre Chapdelaine, Jean-Yves Hogrel, et al. 2007. « First test of a “high-density injection” protocol for myogenic cell transplantation throughout large volumes of muscles in a Duchenne muscular dystrophy patient: eighteen months follow-up ». *Neuromuscular Disorders* 17 (1):38-46. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2006.10.003>.
- Skuk, Daniel, Jean Thomas Vilquin, et Jacques P. Tremblay. 2002. « Experimental and Therapeutic Approaches to Muscular Dystrophies ». *Current Opinion in Neurology* 15 (5):563-569.
- Smith, Zachary D., et Alexander Meissner. 2013. « DNA Methylation: Roles in Mammalian Development ». *Nature Reviews Genetics* 14 (3):204. <https://doi.org/10.1038/nrg3354>.
- Solovey, A. A., A. N. Solovey, J. Harkness, et R. P. Hebbel. 2001. « Modulation of Endothelial Cell Activation in Sickle Cell Disease: A Pilot Study ». *Blood* 97 (7):1937-1941.
- Spencer, Virginia A., Jian-Min Sun, Lin Li, et James R. Davie. 2003. « Chromatin Immunoprecipitation: A Tool for Studying Histone Acetylation and Transcription Factor Binding ». *Methods (San Diego, Calif.)* 31 (1):67-75.
- Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso FJ, Cutting GR. Cystic fibrosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Vogelstein B, editors. : The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. 8th ed. New York: McGraw Hill; 2001. p. 5121- 88.

- White GC, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J, Subcommittee FVFI (2001) Definitions in hemophilia - Recommendation of the Scientific Subcommittee on factor VIII and factor IX of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thrombosis and Haemostasis* 85: 560-560
- Whitehead, R. E., C. B. MacDonald, E. R. Melhem, et L. McMahon. 1998. « Spontaneous Labyrinthine Hemorrhage in Sickle Cell Disease ». *AJNR. American Journal of Neuroradiology* 19 (8):1437-40.
- Zatz, M., R. T. Betti, et O. Frota-Pessoa. 1986. « Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy with Growth Hormone Inhibitors ». *American Journal of Medical Genetics* 24 (3):549-66. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320240322>.
- Zhang, Y., et D. Reinberg. 2001. « Transcription Regulation by Histone Methylation: Interplay between Different Covalent Modifications of the Core Histone Tails ». *Genes & Development* 15 (18):2343-60. <https://doi.org/10.1101/gad.927301>.

WEB :

1. <http://www.haemophilia-forum.org> Haemophilia Forum
2. <http://www.hemophilia.org> Natl Hemophilia Foundation
3. <http://www.haemophilia.org.uk> Haemophilia Society
4. <http://www.wfh.org> World Fed Hemophilia
5. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/hemophilia.html> Medline Plus
6. <http://med.unc.edu/isth/welcome> International Society of Thrombosis and Hemostasis
7. www.ands.dz
8. tiquesnet.wiv-isp.be